

**Н. В. Криничная, М. В. Воронов, П. К. Бойченко,
С. В. Кизименко**

ГЕНОМИКА

С ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

Учебное пособие

для студентов очной формы обучения
по направлению подготовки 06.04.01 Биология,
магистерская программа: Генетика



**МИНИСТЕРСТВО ПРОСВЕЩЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЛУГАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «ЛГПУ»)**

**Н. В. Криничная, М. В. Воронов, П. К. Бойченко,
С. В. Кизименко**

ГЕНОМИКА

С ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

Учебное пособие

для студентов очной формы обучения
по направлению подготовки 06.04.01 Биология,
магистерская программа: Генетика


КНИТА
Луганск
2023

УДК 575 (075.8)
ББК 52.54я73
К82

Рецензенты:

- Билык О. В.** – доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки», кандидат биологических наук, доцент;
- Дяченко В. Д.** – заведующий кафедрой химии и биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Луганский государственный педагогический университет», доктор химических наук, профессор;
- Косогова Т. М.** – доцент кафедры биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Луганский государственный педагогический университет», кандидат биологических наук, доцент.

**Криничная, Н. В., Воронов, М. В., Бойченко П. К.,
Кизименко С. В.**

К82 **Геномика с основами молекулярной генетики** : учебное пособие / Н. В. Криничная, М. В. Воронов, П. К. Бойченко, С. В. Кизименко. – ФГБОУ ВО «ЛГПУ». – Луганск : Книта, 2023. – 96 с.

Геномика – это наука, изучающая молекулярную структуру геномов живых организмов. Методы высокопроизводительного секвенирования позволяют ученым получать огромные массивы геномных данных, а биоинформатические подходы делают возможным глубокий анализ таких данных и получение ценнейшей информации об ассоциации изменений в геноме человека с развитием различных болезней.

Учебное пособие предназначено для студентов очной формы обучения по направлению подготовки 06.04.01 Биология, магистерская программа: Генетика.

УДК 575 (075.8)
ББК 52.54я73

*Рекомендовано Учебно-методическим советом
ФГБОУ ВО «ЛГПУ» в качестве учебного пособия для студентов очной
формы обучения по направлению подготовки 06.04.01 Биология,
магистерская программа: Генетика (протокол № 10 от 24.05.2023 г.)*

© Криничная Н. В., 2023
© ФГБОУ ВО «ЛГПУ», 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Тема 1. Разделы геномики. Изучение генома	6
Тема 2. Ядерный геном	31
Тема 3. Структура генома человека	42
Тема 4. Неядерный геном	51
Тема 5. Редактирование генома	57
Самостоятельная работа студента	68
Практикум	69
Темы учебных докладов	83
Методические рекомендации для написания учебного доклада	85
Глоссарий	88
Список рекомендованной литературы	92
Заключение	94

ВВЕДЕНИЕ

Геномика – это наука, изучающая молекулярную структуру геномов живых организмов. Некоторые учёные считают, что формирование геномики как общепринятого научного направления приходится на первые годы 21 в., т.е. время завершения проекта «Геном человека» (его чернового варианта), другие, что геномика сформировалась как особое направление в 1980–1990-х годах вместе с возникновением первых проектов по секвенированию геномов некоторых видов живых организмов.

Как и классическая генетика, геномика занимается изучением структуры и механизмов работы генов. Однако, генетика изучает отдельные гены (или наборы генов), которые вовлечены в регуляцию конкретного биологического процесса, а геномика направлена на анализ структуры генома как целого и занимается изучением всей совокупности происходящих процессов и обеспечивающих их механизмов. Генетика, молекулярная биология и геномика тесно связанные между собой науки, так как не существует машины, детали которой работали бы независимо друг от друга.

Полный набор кодирующих и некодирующих последовательностей в ДНК человека называется *геномом*. Геном несёт информацию обо всех белках, необходимых для нормальной жизни организма.

Геном человека – это свод сборочных инструкций, управляющий развитием организма. В каждой клетке организма есть ДНК, контролирующая онтогенетическое развитие. По сути, в каждой клетке человеческого тела зашифрована целая энциклопедия данных.

Данный процесс невероятно сложен, поскольку в организме взрослого человека примерно 37 трлн. клеток. Учёные, стоявшие в своё время у истоков исследований ДНК, пытались выявить базовые механизмы работы генов: почему количество одних белков во много раз больше, чем других? многие гены включаются лишь в конкретных клетках или в

определённый период жизни клетки?; как обеспечивается такое срабатывание? На эти и другие вопросы старается отвечать геномика, задействуя новейшие современные методы исследования.

В середине 20 в. учёные начали активно изучать структурные и функциональные особенности генома человека. Это дало толчок к развитию геномики. После того, как учёным удалось расшифровать геном человека, геномика стала настоящим фундаментальной наукой.

Задачи при написании учебного пособия:

1) сформировать у студентов систему знаний в области геномных исследований и технологий;

2) познакомить студентов с основными технологиями структурного и функционального анализа и редактирования генома, включая компьютерные программы и алгоритмы исследования нуклеотидных последовательностей;

3) обучить студентов важнейшим методам, применяемым для геномных исследований.

В учебное пособие включены теоретические (лекционный курс) и практические материалы (практикум), необходимые для успешного освоения учебной дисциплины «Геномика с основами молекулярной генетики». Пособие содержит последние достижения в области геномики, генетики и молекулярной биологии.

Тема 1. РАЗДЕЛЫ ГЕНОМИКИ. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОМА

Геномика является комплексной наукой, которая использует арсенал разработок и методы исследований генетики, молекулярной биологии, биохимии, бionформатики и других смежных наук. В зависимости от предмета и объекта изучения геномика имеет свою структурную организацию.

Разделы геномики:

1) структурная – изучает последовательность нуклеотидов в геномах, определяет строение и границы генов, межгенных участков и других структурных генетических элементов (т.е. изучает содержание и организацию геномной информации);

2) функциональная – определяет функции генов и их взаимодействие, изучает механизмы регуляции, взаимодействия генов друг с другом и с факторами среды в норме и при патологии. После расшифровки генома усилия исследователей сфокусировались на изучении белковых продуктов генов. Изучением белков занимается *протеомика*, её задача определить все белки, синтезируемые в клетке, выяснить их строение, количество, локализацию и механизмы взаимодействия. Ещё одно важное направление функциональной геномики – *транскриптомика*, она изучает координированную работу генов;

3) сравнительная – изучает сходства и различия в организации геномов разных организмов с целью выяснения общих закономерностей их строения и функционирования. С конца 1980-х гг. началось создание баз данных, в которых хранится информация о миллионах последовательностей нуклеотидов в ДНК и РНК или аминокислот в белках;

4) эволюционная – изучает эволюцию генома, время и механизмы появления новых генов;

5) медицинская – решает прикладные вопросы клинической и профилактической медицины на основе знания

геномов человека и патогенных организмов (вопросы генодиагностики, генотерапии наследственных болезней).

Термин «геном» был предложен Гансом Винклером в 1920 г. в работе, посвящённой межвидовым амфидиплоидным растительным гибридам, для описания совокупности генов, заключённых в гаплоидном наборе хромосом организмов одного биологического вида. В Оксфордском энциклопедическом словаре указано, что термин образован слиянием слов «ген» и «хромосома».

Геном – это наследственный материал клетки (ядерный и неядерный), содержащий весь объём информации, необходимый для развития организма, его существования в определённых условиях среды, эволюции и передачи всех наследственных свойств в ряду поколений.

Также, **геном** – это совокупность генетического материала гаплоидного набора хромосом данного вида. Когда говорят о размерах генома эукариот, то подразумевают именно это определение генома, то есть размер эукариотического генома измеряют в парах нуклеотидов (п.н.) ДНК на гаплоидный геном.

Единицей длины ДНК служит пара нуклеотидов, при этом 1 000 п.н. называют тысячей пар нуклеотидов (т.п.н. – килобаза), а 1 000 000 п.н. – миллион пар нуклеотидов (м.п.н. – мегабаза).

Уровни организации генома (последовательная иерархия элементов):

1) нуклеотиды – группа органических соединений, представляют собой фосфорные эфиры нуклеозидов. Типы нуклеотидов, характерные для молекулы ДНК, – аденин (А), тимин (Т), гуанин (Г), цитозин (Ц); типы нуклеотидов, характерные для РНК, – аденин (А), урацил (У), гуанин (Г), цистеин (Ц);

2) триплеты – комбинация из трёх последовательно расположенных нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующих одну аминокислоту;

3) гены (**ген** – участок молекулы ДНК, кодирующий структуру одного белка) и межгенные участки – участки

последовательностей ДНК, расположенные между генами. Межгенные области представляют собой подмножество некодирующей ДНК. Иногда межгенная ДНК контролирует близлежащие гены, но большая её часть пока не имеет известной функции;

5) сложные гены (у эукариот) – экзон–интронная структура гена;

6) хромосомы – нуклеопротеидные структуры в ядре эукариотической клетки, в которых сосредоточена большая часть наследственной информации и которые предназначены для её хранения, реализации и передачи. Набор всех хромосом клетки, называется *кариотипом* и является видоспецифичным признаком, для которого характерен относительно низкий уровень индивидуальной изменчивости;

7) гаплоидный набор хромосом – набор хромосом в гаметах (у человека гаплоидный набор (n) равен 23 хромосомам) + внехромосомная, неядерная ДНК (например, митохондриальная ДНК (мтДНК)).

Свойства генома:

1) видоспецифичность – геном содержит полную информацию о формировании признаков и свойств организма в онтогенезе, информацию о том, как выжить в неблагоприятных условиях и как предотвратить повреждения в наследственном аппарате;

2) дискретность – гены дискретны. Структура гена является прерывистой, о чём свидетельствует современное представление о строении транскриптона;

3) избыточность – хромосомная ДНК подразделяется на две группы: участки с уникальной последовательностью пар нуклеотидов и участки с повторяющимися последовательностями;

4) наличие мобильных генетических элементов – особенность организации генома заключается в наличии мобильных (подвижных) генетических элементов, так называемых «прыгающих» генов. Это короткие нуклеотидные последовательности, которые активно перемещаются либо внутри генома из одного сайта в другой в пределах одной

хромосомы, так и между хромосомами. Различают два основных класса подвижных генетических элементов: транспозоны и ретротранспозоны. В основу классификации заложен механизм их перемещения. Подвижные генетические элементы, являясь факторами изменчивости генов и участвуя в перестройках хромосом, имеют большое значение в процессах эволюции генома.

Полиморфизм генов

Любые изменения в структуре ДНК ведут к *генетическому полиморфизму*. Главная форма генетического полиморфизма – однонуклеотидный полиморфизм. Различие в ДНК разных людей соответствует одной паре нуклеотидов на каждые 1 000–2 000 нуклеотидов. Таким образом, два человека на 99,9 % идентичны по нуклеотидным последовательностям и только 0,1% различий по одному нуклеотиду создаёт огромные индивидуальные фенотипические вариации. В каждом гене примерно 50–100 тыс. пар нуклеотидов и можно ожидать от 30 до 100 мутаций, которые необходимо правильно интерпретировать то ли как нормальную вариацию, то ли как фактор наследственной патологии.

Внешний (а также внутренний, например, биохимический) полиморфизм может быть обусловлен внутривидовыми генетическими различиями. С другой стороны, возможен полиморфизм, при котором организмы с практически идентичным геномом в зависимости от внешних условий приобретают различные фенотипические формы.

Однонуклеотидный полиморфизм (SNP), произносится как *снип*) – отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, Г или Ц) в геноме представителей одного вида. Однонуклеотидные полиморфизмы (*SNPs*) возникают в результате точечных мутаций. Однонуклеотидный полиморфизм (наряду с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов (*RFLP*) и ПДАФ (*AFLP*)) широко используют в качестве молекулярно-генетических маркеров.

Изучение генома

В настоящее время эффективные генетические исследования уже невозможно представить без этапа

расшифровки генома. Геномные последовательности являются фундаментальной основой для решения таких важных задач, как идентификация генов и генных сетей. Определение набора генов – это отправная точка для детальной характеристики функций генов, биохимических и регуляторных путей или локусов количественных признаков.

Наибольший интерес представляет не сама последовательность генома, а понимание того, как он функционирует: какие гены обеспечивают жизнедеятельность клетки, как происходит регуляция (включение или выключение генов) или какие генные пути начинают работать в ответ на стрессовые факторы.

Новые технологии опираются на информацию о маркерах и ассоциированных с ними количественных признаках, при этом наличие данных о геноме позволяет использовать самый широкий спектр маркеров, включая и повторы. Структурно-функциональная разметка геномов помогает существенно облегчить определение молекулярных механизмов, обеспечивающих формирование признаков.

Нужно отметить, что благодаря развитию технологий секвенирования и улучшению алгоритмов сборки и анализа геномов, количество и качество секвенированных геномов организмов постоянно растёт. В идеале геномная сборка представляет собой набор молекул ДНК всех хромосом с суммарной длиной, равной размеру гаплоидного генома. Такие модели геномов служат основой для решения большого числа задач, связанных с поиском генов и идентификацией маркеров. Полные хромосомные последовательности служат основой (*«референсным» геномом*) для изучения других геномов того же вида с использованием гораздо меньших ресурсов, чем было затрачено на получение «референсной» последовательности.

Несмотря на то, что последовательности большинства из опубликованных геномов организмов представлены пока лишь фрагментами ДНК, а информация об их порядке в хромосомах может отсутствовать, даже такая модель геномной последовательности содержит в себе достаточно информации для идентификации участков, кодирующих гены и подбора маркеров для генетических задач.

Секвенирование генома

С момента разработки Фредериком Сэнгером и его коллегами революционного метода секвенирования ДНК прошло несколько десятилетий. Это исследование дало толчок усовершенствованию новых методов, которые открыли большие возможности для недорогого и быстрого секвенирования ДНК. После проекта «Геном человека» временной интервал между технологиями секвенирования начал сокращаться, в то время как объём научных знаний продолжал расти в геометрической прогрессии. Вслед за секвенированием Сэнгера, рассматриваемым как первое поколение, последовательно в практику были введены новые поколения секвенирования ДНК. Развитие технологий секвенирования следующего поколения (*NGS*) внесло существенный вклад в эту тенденцию за счёт снижения затрат и получения массивов данных секвенирования. К настоящему времени выделяют три поколения технологий секвенирования.

Секвенирование второго поколения, которое в настоящее время является наиболее часто используемой технологией, состоит из этапов подготовки библиотеки, амплификации и секвенирования, в то время как при секвенировании третьего поколения отдельные нуклеиновые кислоты секвенируются напрямую, чтобы избежать систематических ошибок и иметь более высокую пропускную способность. Развитие новых поколений секвенирования позволило преодолеть ограничения традиционных методов секвенирования ДНК и нашло применение в широком спектре приложений молекулярной биологии.

С другой стороны, с развитием технологий следующих поколений возникает множество технических проблем, которые необходимо глубоко анализировать и решать. Каждое поколение и платформа секвенирования в силу своего методологического подхода имеет характерные преимущества и недостатки, которые определяют пригодность для тех или иных приложений. Таким образом, оценка этих характеристик, ограничений и потенциальных возможностей помогает

сформировать направления дальнейших исследований технологий секвенирования.

Секвенирование – это процесс определения точного порядка расположения нуклеотидов в молекуле ДНК; экспериментальный метод определения последовательного расположения оснований нуклеиновых кислот (А, Т, G и С) в полинуклеотиде. В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде. Обычно до начала секвенирования производят амплификацию участка ДНК при помощи ПЦР.

Для интуитивного понимания технологии секвенирования, можно провести следующую аналогию: стопку одинаковых журналов разрезают на небольшие кусочки, а, затем, каждый из этих кусочков читают и из этих прочтений восстанавливают первоначальный текст журнала.

Чтобы секвенировать ДНК, сначала её выделяют из исследуемого образца, затем режут на небольшие фрагменты случайным образом, фрагменты называются *ридами*. От каждого рида оставляют по одной цепочке, и на этой цепочке, как на матрице, синтезируют вторую. Таким образом, записывая последовательность присоединившихся нуклеотидов, восстанавливают их последовательность в каждом риде. Затем, из последовательностей ридов с помощью компьютерных программ реконструируют геном.

Важный момент: суммарная длина ридов должна многократно превышать длину исследуемой ДНК. Делается это потому, что, когда ДНК выделяют из образца, и когда её режут, часть её теряется, так что никто не гарантирует, что каждый её участок попадёт хотя бы в один рид. Поэтому, чтобы каждый участок гарантированно был бы прочтен, ДНК берут с большим запасом. Кроме того, при секвенировании возможны ошибки, и, чтобы более надёжно прочитать ДНК, каждый её участок следует прочитать несколько раз (рис. 1).

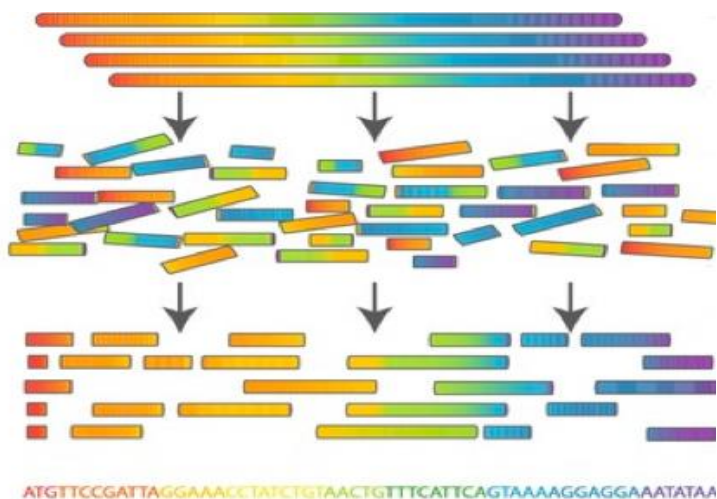


Рис. 1. ДНК разрезают на риды, которые читают, и из них восстанавливают первоначальную последовательность нуклеотидов

Такая методика усложняет работу. Она добавляет множество трудностей, но у неё есть две причины:

1) это ошибки, происходящие при чтении каждого нуклеотида. Они постепенно накапливаются, и, каждый следующий нуклеотид читается хуже предыдущего, и, в какой-то момент качество чтения настолько снижается, что дальше продолжать процесс бессмысленно. У разных методов секвенирования длина ридов, которые они могут хорошо прочесть, составляет порядка нескольких десятков или сотен нуклеотидов;

2) вторая заключается в том, что ДНК – это очень длинная молекула, и, при скрупулёзном чтении каждой буквы секвенирование заняло бы неприлично много времени, а в данном случае этот процесс легко «распараллеливается», и можно одновременно читать миллионы и миллиарды ридов.

Такая схема в общих чертах описывает все популярные методики секвенирования. Различаются они лишь методами

детекции присоединившихся нуклеотидов при синтезе и методикой подготовки материала.

Сборка и аннотирование генома

Если геномы родственных организмов раньше не секвенировались, то из ридов, затем, с помощью программ, пытаются собрать единую последовательность нуклеотидов. Риды частично перекрываются, и, с помощью этих перекрытий пытаются выстроить единую последовательность. Здесь есть множество моментов, которые существенно осложняют дело. Например, можно загрязнить образец, и программа будет пытаться выстроить одну последовательность из ДНК разных организмов; секвенатор может ошибиться при чтении рида, или неверно связать два места в геноме, потому что они очень похожи. На самом деле, сложностей много. И, некоторые из них сложно поддаются устранению.

Когда последовательность генома собрана, то нужно понять, что она значит. На ней находят участки, которые похожи на гены. Делается это следующим образом: в начале и конце генов находятся определенные «метки» из нуклеотидов (промотор, терминатор), и, если на ДНК находят такие последовательности на таком расстоянии, что между ними может уместиться ген, то такое место заносится в список потенциальных генов. Затем, этого претендента сравнивают с базой данных уже известных генов других организмов, и, если в ней находят ген, достаточно сильно похожий на этот участок, то ему присваивают функцию этого гена.

Если геном другого организма этого вида уже секвенировался, то его используют, для сборки. Так как геномы разных организмов одного вида различаются лишь незначительно, то для каждого рида находят место на секвенированном геноме, к которому он ближе всего, и на основе этого генома собирают новый.

Технологической основой для геномных исследований служат секвенаторы, поставляемые различными коммерческими компаниями, такими как *Illumina*, *Thermo Fisher Scientific*, *Oxford Nanopore Technologies*, *Pacific Biosciences* и др.

Секвенсор ДНК (секвенатор) – научный прибор или устройство, с помощью которого выполняется автоматизированное определение последовательности нуклеотидов в цепи ДНК – секвенирование. Результатом работы секвенатора является набор последовательностей оснований аденина, тимина, гуанина, цитозина.

Поколения секвенаторов ДНК:

- 1) секвенаторы первого поколения;
- 2) секвенаторы второго поколения (SGS) или секвенаторы следующего поколения (NGS);
- 3) секвенаторы третьего поколения.

Первые автоматизированные секвенаторы были представлены *Applied Biosystems* в 1987 г. и использовали метод Сэнгера. Этот метод лежит в основе секвенаторов первого поколения. С его помощью был завершён проект «Геном человека» в 2001 г. Установки первого поколения представляли собой автоматизацию электрофорезных систем, которые определяли миграцию меченых фрагментов ДНК в геле, разделяя их по массе (длине).

Метод Сэнгера – один из наиболее популярных методов секвенирования обязан своим появлением английскому биофизику Фредерику Сэнгеру (1918–2013) – единственному учёному в истории мировой науки, получившему сразу две Нобелевские премии по химии (в 1958 и 1980 годах).

Суть метода Сэнгера (метода «терминаторов», метода «обрыва цепи») заключается в том, что в реакционную смесь добавляют аналоги привычных нуклеотидов (дидезоксинуклеозидтрифосфаты), включение которых в синтезируемую цепь приводит к невозможности её дальнейшего синтеза (терминации), а по образовавшемуся «обломку» можно установить последнюю букву секвенируемого фрагмента ДНК.

Автоматизированные модификации метода «терминаторов» применяют до сих пор. Открытие многочисленных флуоресцентных молекул позволило отказаться от использования радиоактивной метки и сделало возможным проведение реакции в пробирке. Реакционную смесь разделяют капиллярным электрофорезом, а

выстроившиеся в синтезируемую цепочку ДНК меченые нуклеотиды затем регистрируют детекторами флуоресценции, предоставляя возможность считывать последовательность всего секвенируемого ДНК-фрагмента.

Капиллярные секвенаторы ДНК *Applied Biosystems* (*Thermo Fisher Scientific*) – золотой стандарт секвенирования по Сэнгеру (рис. 2). Производительность – 4, 8, 24, 48 и 96 образцов. Они предназначены для секвенирования относительно небольших фрагментов ДНК длиной до 1 000 нуклеотидов, характеризуются высокой точностью и используются для генотипирования человека, животных и других организмов (в том числе в медицине – трансплантологии, перинатологии, онкологии, фармакогенетике и др.), для выявления точечных мутаций, делеций и инсерций, для валидации мутаций, выявленных NGS-секвенированием, для анализа метилирования ДНК, для идентификации личности в криминалистике и др.



Рис. 2. Капиллярный секвенатор *SeqStudio* (*Applied Biosystems*)

Наиболее популярными секвенаторами, использующими технологию секвенирования по Сэнгеру, являются приборы, производимые компанией *Thermo Fisher Scientific*: *3730xL*, *3730*, *3500xL*, *3500*, *3130xL*, *3130*, *310*.

Секвенирование по Сэнгеру – это высокая точность (достоверность) полученных данных и невысокая стоимость работ при анализе небольшого количества ДНК-фрагментов –

сохраняют актуальность этого типа определения последовательности нуклеиновых кислот.

Секвенирование «нового поколения» – next-generation sequencing (NGS)

За последние полтора десятилетия были разработаны, коммерциализированы и продолжают успешно развиваться совершенно новые технологии определения последовательности нуклеиновых кислот, в основе которых лежит стремление к:

- 1) миниатюризации;
- 2) автоматизации;
- 3) увеличению объёма получаемых данных;
- 4) удешевлению процесса.

Появление *NGS* позволило значительно ускорить и удешевить определение геномов. Более того, появилась реальная возможность одновременно оценивать экспрессию (работу) тысяч генов в организме, тканях и единичных клетках (секвенирование транскриптомов), а также анализировать регуляцию их активности. Появление высокопроизводительных технологий секвенирования сопровождается прогрессом программного обеспечения. Новые математические и информационные технологии позволяют геномике развиваться быстрее.

Секвенирование «нового поколения» применяется как для анализа геномов организмов, для которых уже доступен референсный геном (ресеквенирование), так и для того, чтобы впервые расшифровать геном организма (секвенирование *de novo*). **Референсный геном** – последовательность ДНК в цифровом виде, составленную как общий репрезентативный пример последовательности генома конкретного вида. **Секвенирования *de novo*** – сборка новых, ранее не прочитанных, геномов.

Типы NGS:

1. Пиросеквенирование.

Пиросеквенирование – это метод секвенирования ДНК (определение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК), основанный на принципе «секвенирование путём синтеза».

Основной смысл этого типа секвенирования заключается в последовательном синтезе ДНК на ДНК-фрагментах изучаемого организма в специальных пиколитровых «реакторах». В ходе синтеза дочерней цепочки ДНК детектируют пирофосфаты, высвобождающиеся при включении нуклеотида в синтезируемую на матрице (участке молекулы ДНК, служащим матрицей для синтеза) комплементарную цепь (рис. 3).



Рис. 3. Пиросеквенатор *PyroMark*

2. Секвенирование на молекулярных кластерах.

Технология секвенирования на молекулярных кластерах, так же, как и пиросеквенирование, подразумевает синтез новой молекулы ДНК по матрице. Принцип секвенирования на молекулярных кластерах — это полимеризация (синтез «дочерней» цепочки) ДНК с использованием флуоресцентно меченых нуклеотидов внутри специальной камеры, регистрирующей флуоресценцию.

3. Циклическое лигазное секвенирование.

Суть метода заключается в определении нуклеотидной последовательности фрагментов геномной ДНК размером 25–75 п.н. К обоим концам предварительно фрагментированной ДНК лигируют адаптеры, необходимые для ПЦР на магнитных сферах и последующего секвенирования на проточной ячейке. Магнитные сферы с нанесённой на них клональной библиотекой помещают на проточную ячейку, где и происходит

секвенирование с помощью лигирования восьминуклеотидных зондов, несущих четыре различных флуорофора на 5'-конце. Флуоресценция считывается с помощью специальной камеры после каждого цикла секвенирования и, затем переводится в последовательность нуклеотидов.

4. *Одномолекулярное секвенирование в реальном времени – SMRT-секвенирование (single molecule real time sequencing).*

SMRT-секвенирование, предложенное сотрудниками компании *Pacific Biosciences*, не только позволило отказаться от проведения полимеразной цепной реакции при пробоподготовке, но и дало возможность наблюдать за работой ДНК-полимеразы, наращивающей синтезируемую цепь, в реальном времени.

Смысл SMRT-секвенирования схож с описанными ранее методами NGS – ДНК-полимераза достраивает вторую цепь исследуемой молекулы ДНК, используя нуклеотиды, меченные различными флуоресцентными метками, которые регистрируют при помощи конфокальной микроскопии.

Другой способ одномолекулярного секвенирования – *нанопоровое секвенирование.*

Суть работы нанопоровых систем (*MinION, GridION X5, PromethION и SmidgION*), предложенных британской компанией, – реакционная камера, в которой проходит процесс считывания последовательности нуклеиновой кислоты, разделена двухслойной мембраной с единичной порой. К камере прикладывается напряжение, вызывающее движение ионов и молекул ДНК или РНК через пору. При прохождении молекулы нуклеиновой кислоты сечение поры (доступное для миграции ионов) уменьшается, в результате чего сила тока падает. Таким образом, считывая изменение силы тока, можно определять тип нуклеотида, проходящего через пору в конкретный отрезок времени (рис. 4).



Рис. 4. *MinION* – нанопоровый секвенатор производства компании *Oxford Nanopore Technologies* с максимальной производительностью до 30 млрд. нуклеотидов за один запуск и без ограничений по длине прочтений

Секвенирование третьего поколения

Технологию одномолекулярного секвенирования можно также назвать технологией третьего поколения, поскольку она работает по принципу, совершенно отличному от того, который применяется в секвенаторах второго поколения. Кроме того, характерной особенностью таких секвенаторов является их сверхкомпактность. Самый компактный портативный секвенатор *MiniION* имеет вес всего 100 г и работает от USB обычного компьютера или ноутбука. Первые приборы *MiniION* уже применяют и в России (рис. 5).



Рис. 5. Портативный *MinION* для секвенирования ДНК

В настоящее время *Oxford Nanopore* работает над созданием модели секвенатора *SmidgION*, который будет работать от обычного смартфона и сможет применяться в полевых условиях, где нет лаборатории и даже компьютера.

Производительность и относительная доступность NGS-методов привели к настоящей революции в биологической и медицинской науке. Более того, благодаря новым подходам появилась реальная возможность проводить ранее технически недоступные исследования.

Сегодня происходит бурное развитие технологий, связанных с исследованием геномов. Разрабатываются портативные, быстрые, точные и универсальные методы исследований биологических объектов. Появление высокопроизводительных технологий секвенирования нуклеиновых кислот сопровождается развитием в области программного обеспечения. Новые математические и информационные технологии позволяют геномике развиваться быстрее и использовать более сложные алгоритмы.

На сегодняшний день объёмы получаемой секвенаторами информации значительно обогнали возможности математического анализа получаемых результатов. Но даже несмотря на это, биомедицинская наука вовлечена в круговорот геномной революции, когда новые данные появляются ежедневно, а биотехнологические компании предлагают решения, значительно облегчающие диагностику заболеваний, приближая мир к новому направлению – персонализированной медицине.

Молекулярные базы данных и аннотация геномных последовательностей

Биологические базы данных – это архивы согласованных данных, хранящихся в единой форме. Данные от проектов по секвенированию геномов могут даже не иметь ссылок в научных журналах, но быть занесены в генетические базы данных.

Биологические знания распределены по бесчисленным базам данных. Это иногда затрудняет обеспечение согласованности информации, например, когда для одного и

того же вида используются разные названия или разные форматы данных. Правильное взаимодействие является постоянной проблемой для обмена информацией. Например, если в базе данных последовательностей ДНК последовательность ДНК хранится вместе с названием вида, изменение названия этого вида может привести к разрыву ссылок на другие базы данных, которые могут использовать другое название. *Интегративная биоинформатика* – это одна из областей, пытающихся решить эту проблему путём предоставления унифицированного доступа. Одно из решений заключается в том, как биологические базы данных делают перекрестные ссылки на другие базы данных с регистрационными номерами, чтобы связать связанные с ними знания вместе (например, чтобы регистрационный номер оставался неизменным, даже если меняется название вида). Избыточность – ещё одна проблема, поскольку многие базы данных должны хранить одну и ту же информацию, например, базы данных о структуре белков также содержат последовательность белков, которые они покрывают, их последовательность и их библиографическую информацию.

Типы биологических баз данных:

- 1) бесплатные / платные (по подписке);
- 2) свободно доступные / ограниченно доступные;
- 3) большие ресурсы (NCBI, EBI/EMBL и т.д.), интегрирующие многие базы данных (поддерживаются государством);
- 4) коллаборации между университетами (например, PDB);
- 5) коммерческие компании;
- 6) локальные базы данных, поддерживаемые силами научных групп.

Крупные центры биологических баз данных:

1. Национальный центр биотехнологической информации США (англ. *National Center for Biotechnological Information, NCBI*) – генбанк (рис. 6).



Рис. 6. NCBI, США

2. Европейский институт биоинформатики (*EMBL*) – содержит европейский архив нуклеотидов (*ENA*) – это хранилище, предоставляющее свободный и неограниченный доступ к аннотированным последовательностям ДНК и РНК (рис. 7).



Рис. 7. Европейский институт биоинформатики, Хинкстон, Кембридж, Великобритания

3. *The International Nucleotide Sequence Database Collaboration* – совместный проект *EMBL-Bank* в Европейском институте биоинформатики (*EBI*), японского банка данных ДНК (*DDBJ*) в Центре информационной биологии (*CIB*) и *GenBank* в Национальном центре биотехнологической информации (*NCBI*).

Нуклеотидные базы данных – это хранилища, принимающие данные от научного сообщества и предоставляющие их широкой общественности. Различные базы данных отличаются по источнику последовательностей, их надёжности, широте аннотирования и т.д.

Аннотация – это выявление биологической информации из генома, а именно – функций генов и свойств их взаимодействий. Наиболее важным этапом аннотации является определение кодирующих последовательностей в геноме (поиск генов), предсказание их работы. На данный момент для решения задачи предсказания работы генов разработано множество программ, например: GeneMark, Grail, GenScan, GeneBuilder, также Glimmer, MetaGene, FragGeneScan, Prodigal.

В ходе аннотации геномных последовательностей решаются следующие основные задачи:

- 1) идентификация кодирующих последовательностей;

- 2) идентификация регуляторных последовательностей;
- 3) идентификация функций генов.

Их решение возможно, как экспериментально, так и методами биоинформатики. Для идентификации кодирующих последовательностей применяются сложные алгоритмы. Наиболее надёжными при идентификации генов являются программы, использующие все доступные критерии кодирующих и регуляторных последовательностей.

Основу функционального анализа последовательностей ДНК заложили алгоритмы сравнения последовательностей. Первые работы в этом направлении были выполнены М. Дайхофф и её коллегами в 1960–70-х гг. – это создание первой базы данных белковых последовательностей (*PIR*, 1965 г.) и предложение использовать аминокислотные матрицы замещения для сравнения белковых последовательностей (1972 г.). Первый достаточно быстрый алгоритм (*FASTA*) поиска гомологичных нуклеотидных последовательностей в базах данных был предложен в 1985 г. Сегодня основным является сходный алгоритм *BLAST*. Эти алгоритмы используют эвристический подход, пытаясь найти не оптимальное, а «достаточно хорошее» решение, и поэтому работают значительно быстрее.

Анализ нуклеотидных и белковых последовательностей сегодня сложно представить без молекулярных баз данных. Их незаменимость обусловлена:

- 1) экспоненциальным ростом объёма генетической информации;
- 2) тем, что многие экспериментальные данные (последовательности, трёхмерные структуры, данные масс-спектрометрии и т.д.) могут не публиковаться и присутствуют только в базах данных;
- 3) возможностью использовать мощные современные аналитические инструменты в биологических исследованиях.

Основные молекулярные базы данных:

- 1) нуклеотидные: *EMBL/GenBank/DBJ*;

2) белковые: аннотированные последовательности: *SWISS-PROT*; *PIR*; трёхмерные структуры: *Protein Data Bank (PDB)* – банк данных трёхмерных структур белков.

Проект «Геном человека»

Проект «Геном человека» – международный проект по секвенированию хромосом человека. Одной из важнейших задач, решавшихся в рамках проекта «Геном человека», была сборка «геномной ведомости» организма человека. Каталогизировано примерно 20 тыс. генов, что во много раз меньше, чем было озвучено первоначально (изначально называлась цифра в 100 тыс. генов). Логотип проекта на рисунке 8.

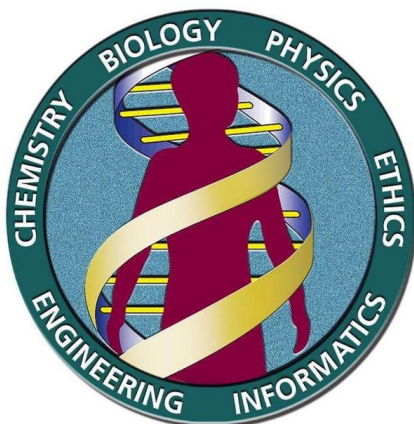


Рис. 8. Логотип международного проекта «Геном человека»

Одним из результатов проекта «Геном человека» стало генетическое картирование человека. При генетическом картировании определяют относительные позиции (локусы) генов, положение «контрольных точек» на хромосоме. Генетическое картирование позволяет очертить базовую структуру генома. Пример генетического картирования для различных организмов представлен на рисунке 9.

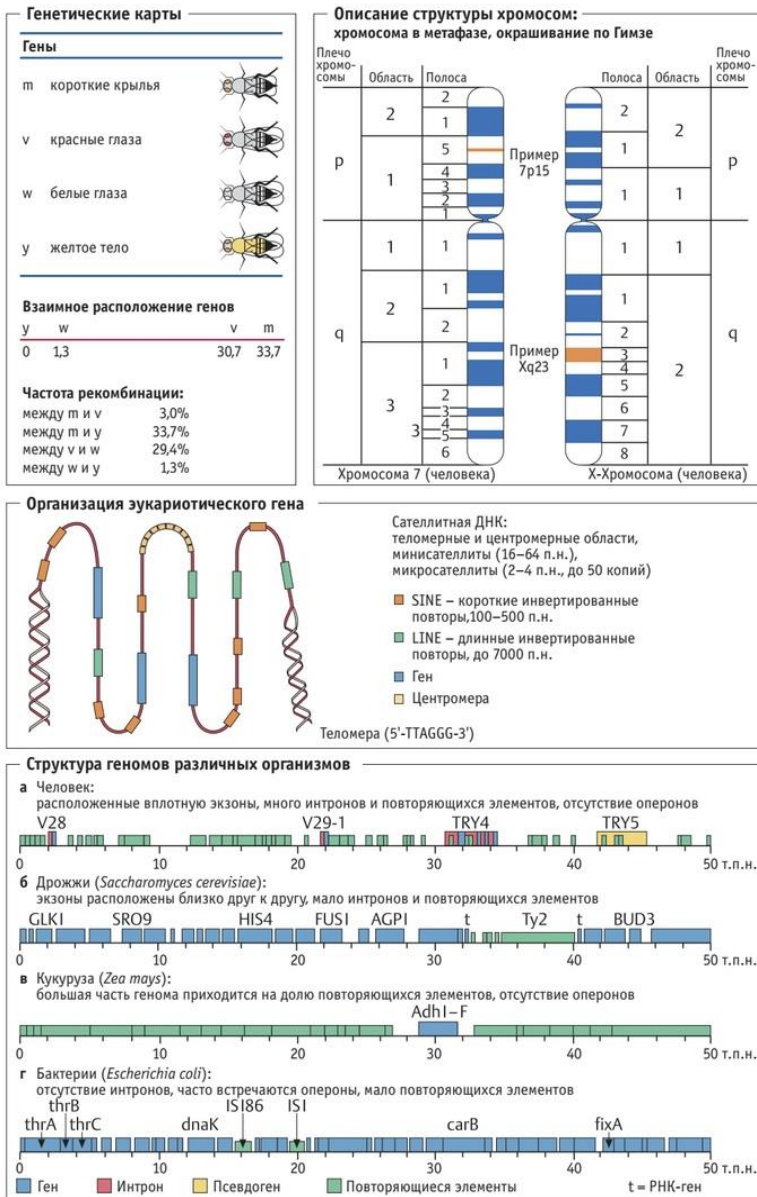


Рис. 9. Результат генетического картирования

Идея создания проекта принадлежит группе американских учёных, участвующих в реализации программы по изучению скорости мутирования у человека, которые осознали, что с совершенствованием методов секвенирования ДНК появилась возможность изучать мутации на молекулярном уровне. Однако для поиска и изучения мутаций на уровне ДНК необходимо знать также исходную (нормальную) последовательность ДНК. Так было положено начало проекту «Геном человека». Проект сразу стал международным. Страны, которые участвовали в проекте, образовали Международный консорциум по секвенированию генома человека.

С самого начала работ по геномному проекту учёные договорились об открытости и доступности всей получаемой информации для его участников независимо от их вклада и государственной принадлежности. Работа над всеми 23 хромосомами человека была поделена между странами-участницами. Российские учёные должны были исследовать структуру 3-й и 19-й хромосом. Однако вскоре финансирование этих работ было урезано и реального участия в секвенировании генома человека Россия, к сожалению, не принимала.

Исходной задачей проекта «Геном человека», было создание генетической и физической карт генома человека, которые должны были стать основой расшифровки точной последовательности четырёх нуклеотидов всех молекул ДНК, образующих геном, для чего были разработаны специальные методы секвенирования ДНК. Первоначально программа была запланирована на 15 лет и её стоимость оценивалась в 3 млрд. долларов США: цена одного шага, т.е. установление положения одного нуклеотида в цепи ДНК, составляла тогда около одного доллара. Однако серьёзные технические и методические усовершенствования процесса секвенирования позволили сделать его более эффективным, быстрым и экономичным.

В июне 2000 г. было объявлено о завершении первого этапа проекта – создании *«чернового варианта»* генома человека. Нужно отметить, что программа включала более 100 центров по секвенированию ДНК и около 1 100 учёных разных стран. Основные итоги расшифровки «чернового

варианта» генома человека были опубликованы этими центрами в февральских номерах ведущих научных журналов «*Nature*» (Vol. 409, № 6822, Feb. 15, 2001) и «*Science*» (Feb. 16, 2001) (рис. 10).



Рис. 10. Учёные из Лейчестерского университета полностью распечатали всю последовательность генома человека. Каждая стопка книг соответствует одной из хромосом

Технически наиболее сложными для секвенирования оказались сателлитная ДНК теломерных и околоцентромерных участков хромосом, сильно спирализованные области интеркалярного (внутрихромосомного) гетерохроматина (районы, ярко окрашивающиеся красителем Гимза или флуорохромами), а также небольшие интерстициальные фрагменты, так называемые гэпы (*gap*). Эти участки генома пока остаются нерасшифрованными.

К 2003 г. идентифицированы, клонированы и изучены на присутствие мутаций гены практически всех наиболее частых

наследственных заболеваний.

В настоящее время ежедневно идентифицируют около 100 генов.

Указанные достижения ещё не являются расшифровкой генетического «текста». Настоящее чтение генетического текста, т.е. перевод его из языка последовательности нуклеотидов в ДНК на язык характеристик (морфологических и функциональных) ещё в процессе.

Самое поразительное открытие программы – в геноме человека очень мало генов, кодирующих белки (структурных генов). Ожидалось, что обнаружится не меньше 100 тыс. генов. По окончании тотального секвенирования, разные компьютерные программы выдали оценки от 21 до 39 тыс. генов (можно задавать критерии с разной степенью строгости). Одна из лучших программ насчитала 26 688 генов. Точное количество структурных генов, кодирующих белки, до сих пор не известно. Со всеми экзонами и интронами, промоторными районами и другими обслуживающими транскрипцию последовательностями, всё это вместе занимает около 5% генома. Если считать только то, из чего получается белок (не считая интроны, промоторы), получается 1% генома. А 99% ДНК генома не имеют никакого выражения в белке. В основном это повторяющаяся ДНК.

Практическое значение программы «Геном человека»:

1) диагностика и лечение наследственных заболеваний по результатам секвенирования генов;

2) идентификация генов и выявление предрасположенности к заболеваниям;

3) предотвращение отрицательных реакций у людей на лекарства (геномная фармакогенетика);

4) геномная дактилоскопия и этногенетика, установление родственных связей.

Работа над интерпретацией данных генома человека продолжается.

Тема 2. ЯДЕРНЫЙ ГЕНОМ

Геном – это совокупность всех молекул ДНК организма. Кроме ДНК хромосом в него входит ДНК плазмид (для прокариот) и молекулы ДНК эукариотических органелл. Размер генома прокариот пропорционален количеству генов и варьирует в пределах от 500 тыс. до 14 млн. пар нуклеотидов. Для прокариот характерны компактные геномы с очень небольшой долей некодирующей ДНК (не более 5–10%), представленной, в основном, регуляторными последовательностями.

Средний размер гена прокариот – 1 000 пар нуклеотидов (чуть меньше для некоторых архей, чуть больше для самых больших геномов). Повторы (в том числе мобильные генетические элементы) присутствуют, однако занимают не более нескольких процентов генома. В связи с такой организацией и размер генома, и количество генов являются хорошими показателями сложности прокариотического организма.

Для большинства эукариот нет жёстких эволюционных ограничений на увеличение размера генома. Размер генома эукариот определяется в основном некодирующей белки ДНК, количество которой может существенно различаться даже у близких представителей одной таксономической группы. Для эукариот не прослеживается прямая корреляция между сложностью организма и размером его генома или количеством содержащихся в нём генов.

У эукариот геном – это вся генетическая информация клетки, заложенная в ядре (хромосомный набор – ядерный геном) и в цитоплазме (мтДНК) – неядерный геном).

Главная функция генома – определять специфический синтез молекул РНК (транскрипция). Большинство структурных генов (кроме мультигенных семейств) содержится в уникальных последовательностях ДНК: уникальные (неповторяющиеся) последовательности ДНК (*unique DNA sequences, non-repetitious DNA sequences*) – это фракции ДНК, состоящие из нуклеотидных последовательностей, которые представлены в

гаплоидном геноме в виде одной копии; активность их регулируется гормонами.

Избыточность генома

Размер генома эукариотического организма определяется в первую очередь различными повторяющимися последовательностями. **Повторяющиеся последовательности ДНК** – это участки ДНК, включённые в геном, последовательность которых состоит из повторяющихся фрагментов. Выделяют 2 типа таких повторяющихся последовательностей:

1. Тандемные повторы:
 - а. Сателлитная ДНК;
 - б. Минисателлиты;
 - в. Микросателлиты.
2. Диспергированные повторы:
 - а. SINEs;
 - б. LINEs.

Повторы участков молекулы ДНК в геноме эукариот классифицируют на:

- 1) умеренные повторы – до 1 000 повторов в одном локусе;
- 2) частые – свыше 1 000 повторов.

Около 10% ядерной ДНК состоит из 500 000 копий повторов последовательностей ДНК, средний размер которых составляет примерно 800 п.н. (длинные рассеянные повторы, или *LINEs*). Существует около миллиона копий коротких повторов (примерно 300 п.н.), известных как *Alu*, и 400 000 других повторов, состоящих из 130 пар нуклеотидов, называемых *MIR*. Все вместе они составляют 10% ядерного генома, их называют короткими рассеянными повторами (*SINEs*).

Диспергированные повторы – повторяющиеся последовательности нуклеотидов в геноме. Отличаются от тандемных повторов тем, что расположены не последовательно друг за другом, а на расстоянии. Встречаются в эукариотических и прокариотических геномах.

Последовательности и количество повторов зависят от конкретного вида.

Тандемные повторы – последовательности повторяющихся фрагментов ДНК (например, –АЦА–АЦА–АЦА–АЦА–АЦА–). В зависимости от размера подразделяются на три класса:

- 1) сателлитная ДНК;
- 2) минисателлиты;
- 3) микросателлиты.

Сателлитная ДНК – не кодирует белки и локализована в гетерохроматине хромосом. Характерна для теломерных и центромерных областей хромосом. Сателлитная ДНК состоит из множественных тандемных повторов одной и той же последовательности, длина которой варьирует от одной нуклеотидной пары до нескольких тысяч пар нуклеотидов (табл. 1).

Таблица 1

Некоторые типы сателлитной ДНК, обнаруженные у человека

Тип	Размер повторяющегося фрагмента (п.н.)	Местонахождение
α	171	Все хромосомы
β	68	Центромеры хромосом: 1, 9, 13, 14, 15, 21, 22 и Y
Сателлит 1	25–48	Центромеры и другие области гетерохроматина большинства хромосом
Сателлит 2	5	Большинство хромосом
Сателлит 3	5	Большинство хромосом

Следует чётко разграничить термины сателлитная ДНК и мини- и микросателлитные ДНК. Основное различие между ними заключается, во-первых, в том, что мини- и микросателлиты, в отличие от сателлитной ДНК, обнаруживаются в эухроматине, во-вторых, число копий

повторов в мини- и микросателлитах намного меньше по сравнению с сателлитной ДНК.

Общим для всех трёх компонентов является наличие тандемно расположенных повторов, а «мини-» и «микро-» отражают различия в длине повторяющихся единиц.

Минисателлиты (МнС) – повторы из 10–100 п.н., умеренные, общей протяженностью 100–100 000 п.н.

Микросателлиты (МкС) – для повторяющейся единицы – менее 10 пар (2–6 п.н.), повторяются от 5 до 50 раз, общей протяжённостью несколько сотен п.н.

Длина повторяющегося мотива сателлитной ДНК не имеет каких-либо ограничений. Она варьирует от 2 до нескольких сотен пар.

Избыточность генома, помимо многочисленных повторов, представлена участками, не несущими информацию. *К таким участкам относятся:*

1) **спейсеры** – последовательности нуклеотидов, которые отделяют один транскриптон от другого;

2) **сайты рестрикции** – последовательности нуклеотидов по которым с помощью рестриктаз можно разрезать ДНК и выделить нужный ген;

3) **интроны** – последовательности нуклеотидов между экзонами, благодаря которым, в геноме может происходить перекомпоновка и образование новых генов;

4) **донорные сайты сплайсинга** – последовательности нуклеотидов, по которым происходит вырезание интронов во время процессинга.

Экзоны, интроны

Формальная (классическая) генетика определяет **ген** как структурно-функциональную единицу наследственной информации, которая занимает определённое положение (локус) на хромосоме и мутационные изменения которой приводят к изменению фенотипа. Это определение не лишено недостатков, поскольку не учитывает ряд особенностей структурно-функциональной организации генов. Так, разные мутации одного и того же гена могут приводить не только к одинаковому изменению фенотипа, но и к совершенно разным изменениям,

вплоть до комплементарных. Кроме того, установлено, что одна и та же последовательность ДНК благодаря альтернативному сплайсингу может кодировать несколько различных белков, а в крупных интронах ряда генов обнаружены смысловые последовательности других генов, считываемые в противоположном направлении. Более того, транскрипционные единицы генома могут перекрываться за счёт наличия разных промоторов.

Уточнённое определение понятия «ген» даёт молекулярная биология. В молекулярной биологии *ген* – это ассоциированный с регуляторными последовательностями фрагмент ДНК, соответствующий определённой единице транскрипции.

Кроме приведенного выше определения в ряде случаев целесообразно использовать введённое в последнее время молекулярными биологами понятие «считываемый ген». **Считываемый ген** – это отдельная транскрибируемая единица ДНК или её часть, которая может транслироваться в одну или несколько взаимосвязанных аминокислотных последовательностей. С учётом этого, последовательность, дающую два транскрипта за счёт альтернативного сплайсинга и, как следствие, два разных белка, можно принимать за один ген. Однако, если степень гомологии двух генетических продуктов, имеющих общий транскрибируемый участок, невелика, то эти последовательности следует расценивать как два разных гена. В целом же необходимо признать, что, по-видимому, ни одно из существующих определений понятия «ген» не может быть полностью исчерпывающим и не может быть приемлемым во всех случаях.

В составе гена, как единицы считывания (транскрипционной единицы, транскриптон), могут присутствовать так называемые кодирующие (экзоны) и некодирующие последовательности.

Классификация генов в геноме:

1) **структурные** – гены, которые кодируют структурные белки и белки–ферменты;

2) **регуляторные** – гены, которые кодируют белки, контролирующие работу структурных генов.

Гаплоидный геном человека состоит из ~ 23 тыс. генов. На долю генов, кодирующих белки, приходится 1–2% всего генома – эти участки называются **экзоны**. Некодирующая ДНК составляет 99% от всей фракции геномной ДНК ядра.

Некодирующая ДНК представлена:

- 1) псевдогенами;
- 2) интронами;
- 3) фрагментами генов;
- 4) усечёнными генами;
- 5) регуляторными сайтами.

Псевдоген – это последовательность ДНК, которая обладает высокой степенью гомологии с нормальным неаллельным геном, но сама по себе функционально не активна.

Интрон – некодирующий фрагмент ДНК, который разделяет два соседних экзона. Во время экспрессии гена интроны, подобно экзонам, транскрибируются в РНК, но в дальнейшем удаляются при сплайсинге этой молекулы. У человека известно лишь немного генов, которые лишены интронов. Главным образом это митохондриальные гены и несколько групп ядерных генов: гены гистонов, гены малых РНК, гены гормональных рецепторов, процессированные копии интронсодержащих генов и некоторые другие. В большинстве же своём гены человека имеют мозаичную структуру, т. е. состоят из экзонов и интронов.

Некоторые гены особенно богаты интронами. Например, у человека есть ген фактора свертываемости крови VIII (он может мутировать у людей, страдающих гемофилией), который содержит двадцать пять интронов. Фактор VIII – большой белок, его длина составляет около двух тысяч аминокислот, но на кодирующие экзоны в нем приходится всего около 4% общей длины гена. Оставшиеся 96% – это интроны.

Каков функционал интронов? Ведь очевидно, что их наличие радикально усложняет все клеточные процессы, поскольку при формировании матричной РНК их всегда требуется вырезать, а это сложное дело, особенно с учётом того, что единственной ошибки при вырезании интрона при подготовке матричной РНК достаточно, чтобы, допустим,

фактор свертываемости крови VIII приобрёл мутацию сдвига рамки считывания, которая «испортит» весь белок. Существует теория, что такие молекулярные вкрапления – эволюционный рудимент.

Усечённые гены – короткие нуклеотидные последовательности идентичные 5'– или 3'–концам функциональных генов в составе сцепленных мультигенных семейств. Пример: регион 6-й хромосомы p21.31, где локализованы гены HLA класса I, содержит около 5 усечённых генов.

Генный фрагмент – это очень маленький сегмент функционального гена, не связанный ни с 5'–лидерной, ни с 3'–трейлерной областью транскриптона: чаще это 1 экзон многоэкзонного гена. Причина – неравный кроссинговер между сестринскими или несестринскими хроматидами.

Регуляторные сайты – представлены некодирующими последовательностями – энхансеры, сайленсеры, инсуляторы.

Энхансер – небольшой участок ДНК, который после связывания с ним факторов транскрипции стимулирует транскрипцию с основных промоторов гена или группы генов. Энхансеры не обязательно находятся в непосредственной близости от генов, активность которых они регулируют, и даже не обязательно располагаются с ними на одной хромосоме. Энхансеры могут располагаться как в 5'–, так и в 3'–положении относительно матричной цепи регулируемого гена и в любой ориентации к ней. Энхансеры также могут находиться внутри интронов. Тем не менее для работы энхансера необходим его физический контакт с промотором, который осуществляется за счёт «выпетливания» ДНК между энхансером и промотором. Молекулярный механизм действия энхансера заключается в том, что он благодаря собранному на нём белковому комплексу привлекает РНК-полимеразу и кофакторы транскрипции в область промотора.

Сайленсеры репрессируют активность генов, они действуют вне зависимости от их положения относительно направления транскрипции и не обладают специфичностью действия. Прямое подавление инициации транскрипции путём

разрушения транскрипционного комплекса на промоторе или посредством его инактивации иным способом.

Инсуляторы (англ. *insulate* – изолировать) как и все регуляторные области локусов, такие участки ДНК «изолируют» ген, находящийся между ними, способствуя сохранению его обычной пространственной структуры. Введение одного из таких элементов между энхансером и промотором регулируемого гена приводит к функциональной изоляции энхансера и подавлению экспрессии гена.

Геном прокариот и эукариот

Рассмотрим геном прокариот на примере кишечной палочки (*Echerihia coli*). Структурные гены бактерии имеют тенденцию быть организованными в кластеры генов, кодирующих белки, чьи функции связаны. Примером кластерной организации у *E. coli* являются лактозные гены, которые индуцируются и репрессируются под действием субстрата. Вся система, включающая структурные гены и элементы, контролируемые их экспрессию, формирует общую систему регуляции, называемую **опероном**. Модель оперона была предложена Ф. Жакобом и Ж. Моно в 1961 г. У кишечной палочки обнаружено 2 584 оперона. У эукариот опероны не обнаружены. Последовательность расположения генов в опероне следующая: промотор→оператор→структурные гены (отвечающие за метаболизм лактозы)→терминатор.

Характеристика генома прокариот:

- 1) геном содержит порядка 1 000 генов, локализованных в одной кольцевой молекуле ДНК, – ядерный аппарат бактерий;
- 2) отсутствие интронов;
- 3) имеются сложные транскриптоны, содержащие группу последовательно расположенных структурных генов, на одном конце которого расположен инициатор, а на другом терминатор. Как правило, структурные гены оперона контролируют комплекс взаимосвязанных или последовательно реализуемых биохимических функций (например, лактозный оперон).

Механизм работы лактозного оперона:

- 1) клетки *E. coli* обычно растут на среде, используя в

качестве источника углерода глюкозу;

2) если в среде культивирования глюкозу заменить на дисахарид лактозу, то клетки адаптируются к изменившимся условиям, начав синтез трёх белков, обеспечивающих утилизацию лактозы;

3) один из этих белков – фермент β -галактозидаза, катализирующий гидролитическое расщепление лактозы до глюкозы и галактозы;

4) в отсутствии индуктора (лактозы) белок-репрессор связан с оператором. РНК-полимераза не может присоединиться к промотору, транскрипция структурных генов оперона не идёт;

5) в присутствии лактозы белок-репрессор присоединяет её, изменяет свою конформацию и теряет сродство к оператору. РНК-полимераза связывается с промотором и транскрибирует структурные гены (рис. 11)

Лактозный оперон

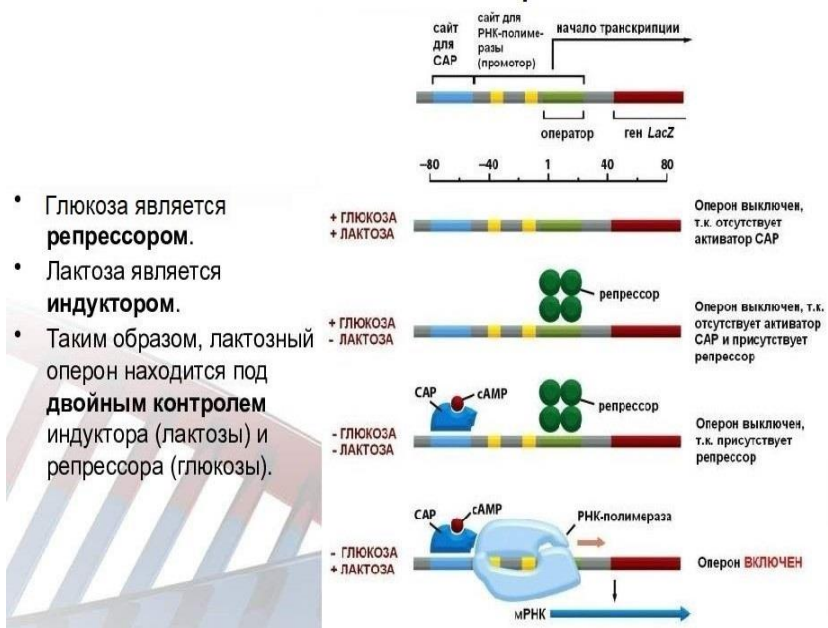


Рис. 11. Строение лактозного оперона

Характеристика генома эукариот:

1) генетический материал имеется не только в ядерном аппарате (хромосомы ядра), но и в некоторых органоидах, поэтому геном эукариот состоит из нескольких разных компонентов – ядерный и неядерный: ядерный геном содержит ядерные гены (в хромосомах) и неядерный – митохондриальный геном содержит митохондриальные гены; пластидный геном содержит пластидные гены;

2) имеется экзон–интронная структура гена. Каждый транскриптон включает в себя, как правило, только один структурный ген.

Мобильные генетические элементы генома

Особенность организации генома заключается в наличие **мобильных (подвижных) генетических элементов**, так называемых «прыгающих» генов. Они относятся к диспергированным повторам. Это короткие нуклеотидные последовательности, которые активно перемещаются либо внутри генома из одного сайта в другой в пределах одной хромосомы, так и между хромосомами. Подвижные генетические элементы, являясь факторами изменчивости генов и участвуя в перестройках хромосом, имеют значение в процессах эволюции генома (рис. 12).



Рис. 12. Строение мобильного генетического элемента

Различают два основных класса подвижных генетических элементов: транспозоны и ретротранспозоны. В основу классификации заложен механизм их перемещения.

Транспозоны – участки ДНК организмов, способные к передвижению (транспозиции) и размножению в пределах генома. Транспозоны перемещаются с участием комплекса белков, которые обеспечивают активность фермента транспозазы, которая узнаёт транспозон и переносит его в новое место. Транспозоны на концах имеют инвертированные участки (повторы), которые сближаются и точно отрезаются от участков исходной ДНК. Разрыв и зашивание обеспечивает транспозаза и вспомогательные белки. Транспозаза может кодироваться как самим подвижным элементом, так и его копией.

Ретротранспозоны – мобильные генетические элементы первого типа, которые могут самовоспроизводиться в геноме и являются вездесущими компонентами ДНК многих эукариотических организмов. Ретротранспозоны являются подклассом транспозонов. Широко распространены у растений, где они часто являются важным компонентом ядерной ДНК.

Значение мобильных элементов:

- 1) повышают выживаемость генома;
- 2) закрывают бреши в ДНК, если не сработала репарация;
- 3) могут регулировать активность генов;
- 4) если встраиваются перед онкогеном, могут выполнять функцию промотора и могут индуцировать канцерогенез;
- 5) индуцируют хромосомные перестройки;
- 6) участвуют в эволюции геномов.

Тема 3. СТРУКТУРА ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

Геном человека – это совокупность наследственного материала, заключённого в клетке человека. Согласно этому определению геном человека состоит из 23 пар хромосом, находящихся в ядре, а также множества копий митохондриальной ДНК. Как мы указывали выше, существует и другое определение генома, в котором под *геномом* подразумевают совокупность генетического материала гаплоидного набора хромосом. Так, двадцать две аутосомы, две половые хромосомы XX и XY, а также митохондриальная ДНК человека содержат вместе 3 099 734 149 пар нуклеотидных оснований.

Геном – это, по сути, полный набор генетических инструкций, содержащийся в ядре каждой клетки. Фактически любая клетка содержит два генома – по одному от каждого родителя; две копии каждой хромосомы, которые мы наследуем; каждая хромосома содержит свою копию гена (аллельное состояние), поэтому – у человека две копии гаплоидного генома (n), который носит название диплоидный набор хромосом и обозначается (2n).

В одной хромосоме человека находится одна молекула ДНК. В 46 хромосомах – 46 молекул ДНК. Длина всех молекул ДНК одной клетки около 2 м.

Идентификация и классификация хромосом

Все живые организмы содержат в ядрах клеток определённый набор генетического материала. В эукариотических клетках он представлен хромосомами. Для удобства учёта и научных изысканий кариотип систематизируют при помощи различных методик. Познакомимся с приёмами упорядочивания генетического материала на примере хромосом человека.

Классификация хромосом человека

Кариотип – хромосомный набор (диплоидный), находящийся в любой из соматических клеток организма. Он является характерным для организма и одинаков во всех клетках, за исключением половых. Хромосомы в кариотипе

бывают: *аутосомы*, не отличаются у особей разного пола; *половые* (гетерохромосомы), отличаются по строению у особей разного пола.

Клетки организма человека содержат 46 нитей ДНК, из них 22 пары аутосом и одна – половых. Это диплоидный ($2n$) набор генетического материала. Пара половых хромосом у женщин обозначается XX, у мужчин – XY; обозначение кариотипа, соответственно, $44+XX$ и $44+XY$. В половых клетках (гаметах) присутствует гаплоидный или одинарный (n) набор ДНК. Яйцеклетки содержат 22 аутосомы и одну X-хромосому, сперматозоиды – 22 аутосомы и одну из гетерохромосом: X или Y.

Общий подход нужен для правильного представления и интерпретации результатов исследований в области генетики, кариосистематики, селекции. *Денверская и Парижская системы классификации наследственного материала*, являются общепризнанными в мировом научном сообществе, широко используются и призваны унифицировать и обобщить представления о кариотипе (рис. 13).



Рис. 13. Общепризнанные системы классификации наследственного материала

Схематически кариотип изображают при помощи **идиограммы** – последовательности систематизированных и расположенных по убыванию размера хромосом. Идиограмма отражает не только размеры спирализованных ДНК, но и некоторые морфологические характеристики, а также особенности их первичной структуры (области гетеро- и эухроматина). При помощи анализа этих графиков устанавливают степень родства между различными систематическими группами организмов. В кариотипе могут

находиться пары аутосом, практически одинаковые по размеру, что затрудняет их правильное расположение и нумерацию.

Рассмотрим, какие параметры учитывают Денверская и Парижская классификация хромосом человека. В 1960 г. в городе Денвер (США) состоялась конференция по хромосомам человека. На ней различные подходы к систематизированию хромосом (по размеру, положению центромер, участкам с разной степенью спирализации и т.д.) были объединены в единую систему. Решением конференции стала так называемая Денверская классификация хромосом человека. Основные принципы классификации разработал Патау. В классификации учтены длина и форма хромосом. Все пары аутосом нумеруют арабскими цифрами от 1 до 22 в порядке уменьшения их длины. Половые хромосомы обозначают латинскими буквами X и Y и располагают в конце раскладки. *Данная система руководствуется принципами* (рис. 14):

1) все аутосомы человека пронумерованы по порядку от 1 до 22 по мере уменьшения их длины, половым хроматидам присвоены обозначения X и Y;

2) хромосомы кариотипа разбиты на 7 групп с учётом положения центромер, наличия спутников и вторичных перетяжек на хроматидах;

3) для упрощения классификации используется *центромерный индекс*, который рассчитывается делением длины короткого плеча на всю длину хромосомы и выражается в процентах.

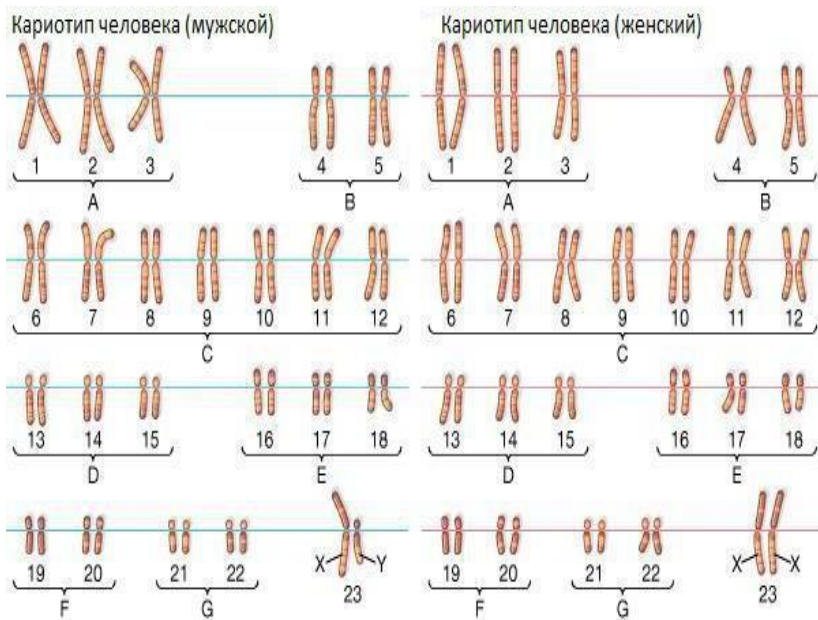


Рис. 14. Денверская классификация хромосом

Группы хромосом и их характеристика представлены в таблице 2.

Таблица 2

Классификация хромосом человека по размеру и расположению центромер (Денверская классификация)

<i>Группа хромосом</i>	<i>Номер по кариотипу</i>	<i>Характеристика хромосом</i>
A (I)	1–3	1 и 3 почти метацентрические, 2 – крупная субметацентрическая
B (II)	4, 5	Крупные субacroцентрические
C (III)	6–12	Средние субметацентрические
A (IV)	13–15	Средние акроцентрические
E (V)	16–18	Мелкие субметацентрические
F (VI)	19–20	Самые мелкие метацентрические
G (VII)	21, 22	Самые мелкие акроцентрические
X	23	Средняя почти метацентрическая
Y	23	Мелкая акроцентрическая

Парижская классификация основывается на методах специального дифференциального окрашивания, при котором каждая хромосома имеет индивидуальный порядок чередующихся светлых и тёмных сегментов. Базируется на анализе морфологии хромосом без каких-либо манипуляций с ДНК (рис. 15).

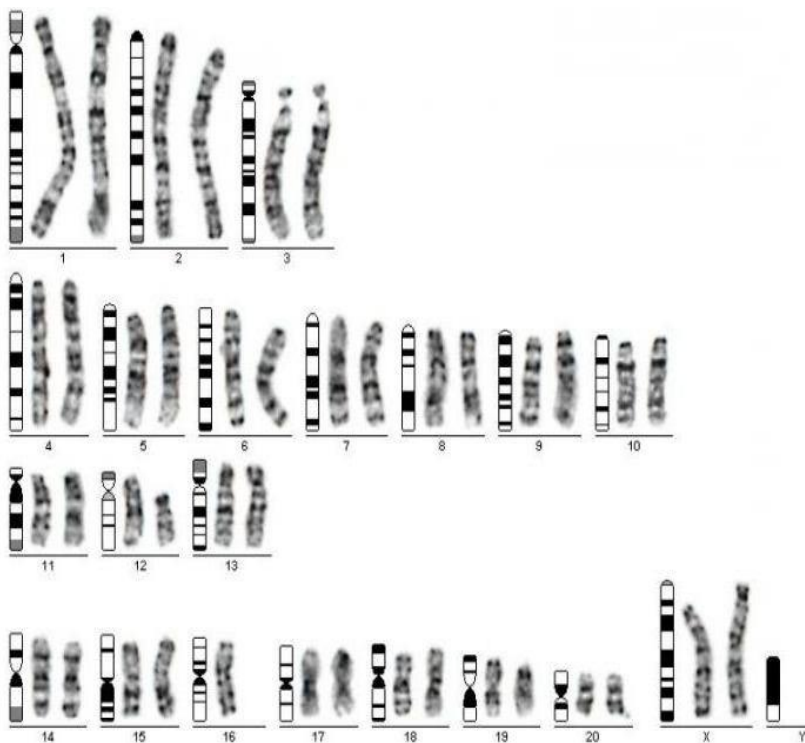


Рис. 15. Парижская классификация хромосом

При обработке хромосом различными красителями выявляются отдельные сегменты: Q-сегменты хромосом флуоресцируют в результате применения красителя акрихин-иприта. G-сегменты проявляются после окрашивания по методу Гимза (совпадают с Q-сегментами). Окрашиванию R-сегментов предшествует контролируемая термическая денатурация.

Для указания местоположений генов на хромосомах вводятся дополнительные обозначения:

1) в соответствии с Парижской номенклатурой короткое плечо хромосомы обозначается латинской буквой *p*, а длинное – *q*.

2) плечи делятся на районы (регионы), районы – на сегменты;

3) нумерация идет от центromеры к теломере. Например: 5p15.2 – пятая хромосома, короткое плечо, 1-й район, 5-й – сегмент, 2-й – подсегмент (рис. 16).

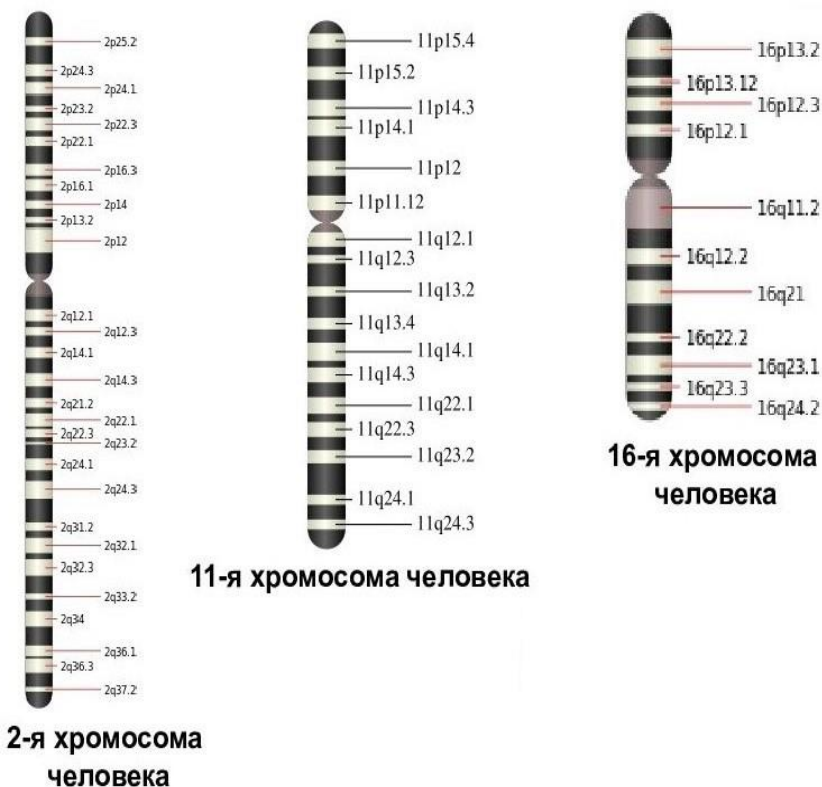


Рис. 16. Дополнительные обозначения генов на хромосомах

Для точного картирования хромосом, изучения мутагенеза и гибридизации какой-либо одной методикой не обойтись. Денверская и Парижская классификации хромосом, в данном случае, неразрывно связаны и дополняют друг друга.

Общая характеристика хромосом человека представлена в таблице 3.

Таблица 3

Общая характеристика хромосом человека

<i>Хромосома</i>	<i>Относительная длина*</i>	<i>Центромерный индекс</i>	<i>Количество ДНК (Мб)</i>
1	8,44 ± 0,433	48,36 ± 1,166	250
2	8,02 ± 0,397	39,23 ± 1,824	240
3	6,83 ± 0,315	46,95 ± 1,557	190
4	6,30 ± 0,284	29,07 ± 1,867	180
5	6,08 ± 0,305	29,25 ± 1,739	175
6	5,90 ± 0,264	39,05 ± 1,665	165
7	5,36 ± 0,271	39,05 ± 1,771	155
8	4,93 ± 0,261	34,08 ± 1,975	135
9	4,80 ± 0,244	35,43 ± 2,559	130
10	4,59 ± 0,221	33,95 ± 2,243	130
11	4,61 ± 0,227	40,14 ± 2,328	130
12	4,66 ± 0,212	30,16 ± 2,339	120
13	3,74 ± 0,236	17,08 ± 3,227	110
14	3,56 ± 0,229	18,74 ± 3,596	105
15	3,46 ± 0,214	20,30 ± 3,702	100
16	3,36 ± 0,183	41,33 ± 2,740	85
17	3,25 ± 0,189	33,86 ± 2,771	80
18	2,93 ± 0,164	30,93 ± 3,044	75
19	2,67 ± 0,174	46,54 ± 2,299	70
20	2,56 ± 0,165	45,45 ± 2,526	65
21	1,90 ± 0,170	30,89 ± 5,002	55
22	2,04 ± 0,182	30,48 ± 4,932	60
X	5,12 ± 0,261	40,12 ± 2,117	140
Y	2,15 ± 0,137	27,17 ± 3,182	60

Примечание: * – *Относительная длина* (%) вычисляется по формуле: длина хромосомы / общая длина хромосом гаплоидного набора $\times 100$.

Некоторые болезни человека, вызванные аномалиями кариотипов представлены в таблице 4.

Таблица 4

Некоторые болезни человека,
вызванные аномалиями кариотипов

<i>Кариотипы</i>	<i>Болезнь</i>	<i>Комментарий</i>
47,XXY; 48,XXXY;	Синдром Клайнфельтера	Полисомия по X-хромосоме у мужчин
45X0; 45X0/46XX; 45,X/46,XY; 46,X iso (Xq)	Синдром Шерешевского – Тёрнера	Моносомия по X хромосоме, в том числе и мозаицизм
47,XXX; 48,XXXX; 49,XXXXX	Полисомии по X хромосоме	Наиболее часто – трисомия X
47,XX, 21+; 47,XY, 21+	Синдром Дауна	Трисомия по 21-й хромосоме
47,XX, 18+; 47,XY, 18+	Синдром Эдвардса	Трисомия по 18-й хромосоме
47,XX, 13+; 47,XY, 13+	Синдром Патау	Трисомия по 13-й хромосоме
46,XX, 5p-	Синдром кошачьего крика	Делеция короткого плеча 5-й хромосомы
46 XX или XY, del 15q11-q13	Синдром Прадера–Вилли	Делеция в длинном плече 15-й хромосомы

Тема 4. НЕЯДЕРНЫЙ ГЕНОМ

Геном эукариот состоит из ядерного генома и генома органелл. Основная часть генетической информации заключена в ядерном геноме, который содержится в хромосомах ядра клеток, и намного меньшая часть локализована в митохондриях и хлоропластах (в случае фотосинтезирующих организмов). *Как и все цитоплазматические элементы, неядерный геном наследуется по материнской линии, а не по законам Менделя.*

Большинство белков, из которых построены функциональные и структурные компоненты митохондрий и хлоропластов, кодируются хромосомной ДНК, синтезируются на рибосомах в цитоплазме и транспортируются в соответствующие органеллы. Однако несколько белков кодируются неядерной ДНК и синтезируются на особых рибосомах органелл.

Геномы органелл представляют собой кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК. Исключение составляют инфузории, у которых митохондриальная ДНК представлена линейной молекулой. Структура генома органелл скорее напоминает структуру бактериального генома, чем хроматин эукариот.

Геном митохондрий

У млекопитающих каждая молекула мтДНК содержит 15 000–17 000 пар оснований (у человека – 16 565 пар нуклеотидов – исследование закончено в 1981 г., по другому источнику – 16 569 пар и содержит 37 генов – 13 кодируют белки, 22 – гены тРНК, 2 – рРНК (по одному гену для 12S и 16S рРНК).

В клетке человека насчитывается от 100 до 1 000 митохондрий, в каждой из которых содержится от 2 до 10 молекул кольцевой мтДНК.

Белковые цепи входят в состав белков, которые участвуют в основном в важнейшем внутриклеточном процессе, называемом окислительным фосфорилированием, который обеспечивает клетку энергией. За счёт окислительного фосфорилирования в митохондриях осуществляется

производство более 90 % молекул АТФ, являющихся основной энергетикой клетки.

Гены мтДНК не содержат интронов. В мтДНК транскрибируются обе цепи.

Мутации в мтДНК приводят к присутствию в клетке различных мтДНК (гетероплазмия); если все мтДНК в клетке одинаковые – гомоплазмия (рис. 17).

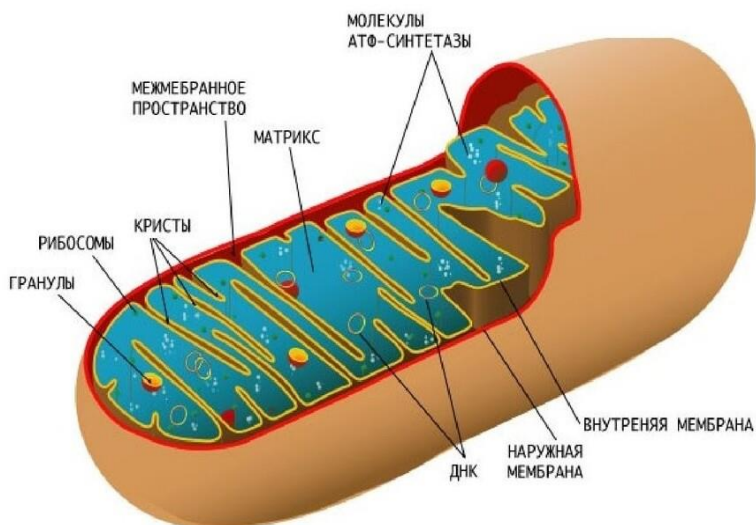


Рис. 17. Строение митохондрий

Отличия митохондриального генома от ядерного:

- 1) ДНК не связана с гистонами;
- 2) не содержит интронов;
- 3) транскрибируются обе цепи;
- 4) нет системы репарации ДНК (мутации происходят в 10 раз чаще);
- 5) комбинативная изменчивость отсутствует;
- 6) мтДНК наследуется по материнской линии.

Геномы митохондрий существенно различаются по размеру. У животных они относительно малы и обычно не

превышают 20 т.п.н. Однако дрожжевые митохондриальные ДНК состоят из примерно 80 т.п.н. Митохондриальные ДНК млекопитающих организованы весьма рационально и между генами почти нет промежутков.

Митохондриальная ДНК эволюционирует гораздо быстрее, чем ядерная, и мутации в ней происходят в десять раз чаще. В результате возникает широкий внутривидовой полиморфизм. У млекопитающих большинство генов, кодирующих рРНК или белки, разделены одним или более тРНК-генами. Промежутки между генами, как правило, не превышают 25 п.н. Обе цепи всего митохондриального генома транскрибируются с образованием одной молекулы рРНК специфической митохондриальной рРНК-полимеразой. (рис. 18).



Рис. 18. Карта мтДНК у человека

Особенность трансляции у митохондрий состоит в использовании необычных кодонов для инициации и

терминации трансляции, а также для кодирования некоторых аминокислот. Необычному генетическому коду соответствует специфическое семейство тРНК.

Ещё одной необычной особенностью митохондриальных геномов является наличие рибонуклеотидов вместо дезоксирибонуклеотидов. Возможно, это остатки РНК-праймеров.

Митохондриальные заболевания

Митохондриальные заболевания – группа наследственных заболеваний, связанных с дефектами в функционировании митохондрий, приводящими к нарушениям энергетических функций в клетках эукариот. На 2021 г. известно более 350 генов, приводящих к таким заболеваниям.

Митохондриальные заболевания обусловлены генетическими, структурными, биохимическими дефектами митохондрий, приводящими к нарушениям тканевого дыхания. Они передаются только по женской линии к детям обоих полов, так как сперматозоиды передают зиготе половину ядерного генома, а яйцеклетка – и вторую половину генома, и митохондрии. Патологические нарушения клеточного энергетического обмена могут проявляться в виде дефектов различных звеньев в цикле Кребса, в дыхательной цепи, процессах бета-окисления и т. д.

Митохондрии наследуются иначе, чем ядерные гены. Ядерные гены в каждой соматической клетке обычно представлены двумя аллелями (за исключением большинства сцепленных с полом генов у гетерогаметного пола). Один аллель унаследован от отца, другой от матери. Когда митохондрия делится, копии ДНК случайным образом распределяются между её потомками. Если только одна из исходных молекул ДНК содержит мутацию, в результате случайного распределения такие мутантные молекулы могут накопиться в некоторых митохондриях. Митохондриальная болезнь начинает проявляться в тот момент, когда заметное число митохондрий во многих клетках данной ткани приобретают мутантные копии ДНК. Происходит так называемая «пороговая экспрессия».

Мутации в митохондриальной ДНК происходят, по разным причинам, намного чаще, чем в ядерной. Это означает, что митохондриальные болезни достаточно часто проявляются из-за спонтанных вновь возникающих мутаций. Иногда темп мутирования увеличивается из-за мутаций в ядерных генах, кодирующих ферменты, которые контролируют репликацию ДНК митохондрий.

Эффекты митохондриальных заболеваний очень разнообразны. Из-за различного распределения дефектных митохондрий в разных органах мутация у одного человека может привести к заболеванию печени, а у другого – к заболеванию мозга. Величина проявления дефекта может быть большой или малой, и она может существенно изменяться, медленно нарастая во времени. Некоторые небольшие дефекты приводят лишь к неспособности пациента выдерживать физическую нагрузку, соответствующую его возрасту, и не сопровождаются серьёзными болезненными проявлениями. Другие дефекты могут быть более опасны, приводя к серьёзной патологии.

В общем случае митохондриальные заболевания проявляются сильнее при локализации дефектных митохондрий в мышцах, мозге, нервной ткани, поскольку эти органы требуют больше всего энергии для выполнения соответствующих функций.

Можно выделить две группы митохондриальных заболеваний:

1) ярко выраженные наследственные синдромы, обусловленные мутациями генов, ответственных за митохондриальные белки (синдром Барта, синдром Кернса-Сейра, синдром Пирсона, синдром MELAS, синдром MERRF и другие);

2) вторичные митохондриальные заболевания, включающие нарушение клеточного энергообмена как важное звено формирования патогенеза (болезни соединительной ткани, синдром хронической усталости, гликогеноз, кардиомиопатия, мигрень, печёночная недостаточность, панцитопения, а также гипопаратиреоз, диабет, рахит и др.).

Обобщенная современная классификация
митохондриальных заболеваний.

1. Заболевания, возникающие при мутациях мтДНК. Дефекты могут быть вызваны точечными мутациями генов белков, тРНК или рРНК (наследуются преимущественно по материнской линии), или структурными перестановками – спорадическими дупликациями и делециями. первичные митохондриальные заболевания синдром Кернса–Сейра, синдром Лебера, синдром Пирсона, синдром NARP, синдром MERRF и др.;

2. Заболевания, которые вызваны дефектами ядерной ДНК. Ядерные мутации могут нарушать функции митохондрий – окислительное фосфолирование, работу электронотранспортной цепи, утилизацию или транспорт субстратов. Также мутации ядерной ДНК вызывают дефекты ферментов цикла Кребса. К данной группе относят синдром Люффа, атаксию Фридрейха, синдром Альперса, болезни соединительной ткани;

3. Заболевания, которые возникают в результате нарушений в ядерной ДНК и вызванных этими нарушениями вторичных изменений в митохондриальной ДНК. Вторичными дефектами являются тканеспецифические делеции или дупликации митохондриальной ДНК и уменьшение количества копий митохондриальной ДНК или их отсутствие в тканях. В данную группу входят печеночная недостаточность (генетически обусловленная), синдром Де Тони-Дебре-Фанкони.

В настоящее время лечение митохондриальных заболеваний находится в стадии разработки, но распространённым терапевтическим методом служит симптоматическая профилактика с помощью витаминов.

Тема 5. РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА

Использование методик *CRISPR-Cas* для направленного редактирования геномов является перспективным направлением в современной генной инженерии. **CRISPR** (от англ. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) – особые локусы бактерий и архей, состоящие из прямых повторяющихся последовательностей, которые разделены уникальными последовательностями (спейсерами). Спейсеры заимствуются из чужеродных генетических элементов, с которыми сталкивалась клетка (бактериофагов, плазмид).

РНК, транскрибирующиеся с локусов *CRISPR*, совместно с ассоциированными белками *Cas* обеспечивают адаптивный иммунитет за счёт комплементарного связывания РНК с нуклеиновыми кислотами чужеродных элементов и последующего разрушения их белками *Cas*. Впрочем, к настоящему моменту имеется немало свидетельств участия *CRISPR* в процессах, не связанных с иммунитетом.

CRISPR позволяет изменять фрагменты ДНК с высокой скоростью и эффективностью. Открытие этого метода в 2020 г. удостоилось Нобелевской премии по химии (рис. 19).

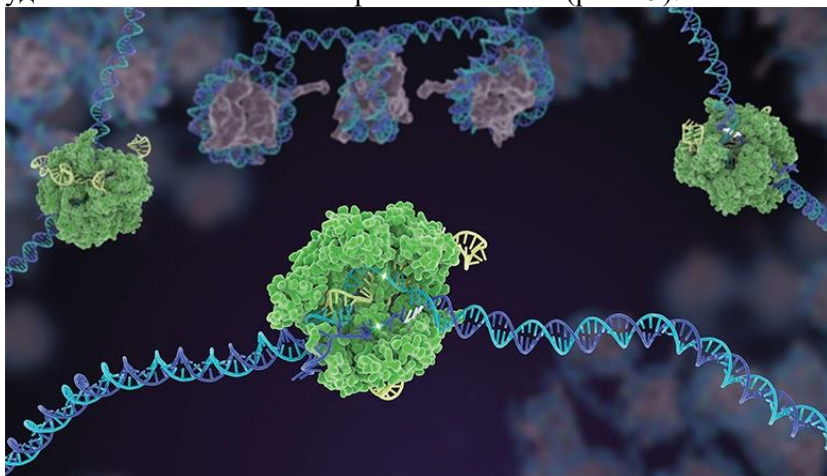


Рис. 19. Резка молекулы ДНК с помощью *CRISPR-Cas9*

Аббревиатура *CRISPR* появилась в конце 80-х годов 20 в. Аспирант Франсиско Мохика изучал археобактерии и наткнулся на странные палиндромные последовательности в их геноме. Фрагменты длиной около 30 нуклеотидов повторялись много раз и отделялись друг от друга уникальными участками ДНК примерно такой же длины. Упрощенно обнаруженная структура выглядела так (рис. 20):

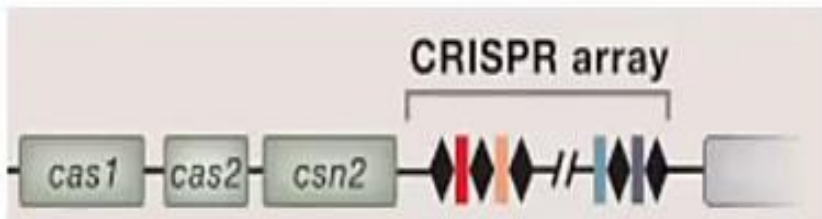


Рис. 20. CRISPR-массив

Структурам сначала дали название *SRSR* (*Short Regularly Spaced Repeats*), а потом переименовали в *CRISPR* (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Продолжив работу в том же направлении, Мохика нашёл похожие повторы у многих других бактерий. И эта закономерность привлекла внимание.

В 2002 г. рядом с CRISPR-массивами у всех бактерий выявили похожие на них структуры – группу белок-кодирующих генов, которую назвали – *CAS* (*CRISPR-Associated Genes*).

Продвинуться дальше помог своего рода «генетический Google» – *GenBank*, куда учёные складывают все прочитанные последовательности ДНК. К началу 2000-х годов там накопилось уже достаточно информации, чтобы при помощи алгоритмов *BLAST* найти, в каких организмах встречаются похожие *CRISPR*-последовательности.

Поиск выявил интересную вещь: фрагменты *CRISPR* встречаются в ДНК бактериофагов – вирусов, которые инфицируют бактерии.

Так возникла догадка о том, что *CRISPR* – это иммунная память бактерий, сохраняющих информацию о вирусах, которыми болели.

Бактериальная клетка, которая перенесла инфекцию бактериофагом и не умерла, нарезает его геном на мелкие участки, встраивает в *CRISPR*-массивы и передаёт эту информацию своим потомкам, которые становятся устойчивыми к бактериофагу.

Общий механизм CRISPR-Cas9:

1) бактериальная клетка синтезирует на сохранённых фрагментах ДНК короткие образцы молекулы РНК;

2) каждый из этих РНК-«гидов» (гРНК, *guideRNA*) связывается с белком Cas, способным разрезать ДНК, подходящую под этот образец. Эти комплексы постоянно патрулируют клетку, отслеживая появление любой вирусной ДНК и сопоставляя её с гРНК. Если совпадение есть, двойная спираль ДНК тут же разрезается на части и инактивируется.

Cas9 – это нуклеаза, фермент, который «умеет резать» ДНК. При помощи гРНК этот фермент наводится на специфический сегмент в ДНК бактериофага, садится на него и разрезает, как ножницами, чем нарушает размножение вируса. Резка – это и есть основной этап редактирования ДНК, а *CRISPR* – генетические ножницы.

Сегодня определено целое семейство белков *Cas*, но наиболее изученным и освоенным оказался белок *Cas9*, выделенный из бактерий *Streptococcus pyogenes* – возбудителей скарлатины. Именно он лёг в основу новейшей методики генетической модификации живых организмов – *CRISPR-Cas9*.

Влияние технологии *CRISPR* проще всего проиллюстрировать, показав частоту упоминаний этой аббревиатуры в научной литературе (рис. 21).

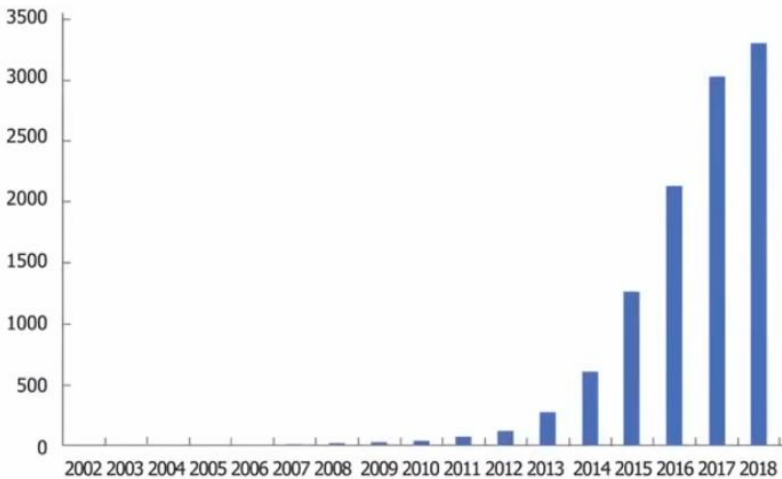


Рис. 21. Число упоминаний *CRISPR* в научной литературе

Второй показатель – количество патентов, которое, начиная с 2012 г., неуклонно растёт.

Важно понимать, что ДНК – это очень стабильная молекула. Однако молекула ДНК очень чувствительна к разрывам. Если это случается, клетка запускает процесс репарации ДНК, он может идти двумя путями:

1) *не гомологичный вариант* – когда место разрыва устраняется с дефектами. В результате в ДНК может появиться маленькая вставка или произойти потеря фрагмента. Генетический код – это триплеты, то есть три нуклеотида кодируют одну аминокислоту. Если вырезать два или вставить четыре нуклеотида, нарушится последовательность, кодирующая белок. Возникнет сдвиг рамки считывания, в результате которого ген фактически перестанет выполнять свою функцию, так как клетка не сможет использовать его информацию, чтобы синтезировать функциональный белок.

Сломать ген можно было и раньше, просто это довольно трудоёмко: надо облучать гены радиацией, месяцами искать мутации. Благодаря *CRISPR* процесс стал гораздо проще.

2) *гомологичная рекомбинация*. У всех животных в клетках как минимум две копии каждой хромосомы. Если возникает разрыв, клетка может использовать вторую хромосому и на её основании достроить повреждённый участок – скопировать его в поврежденную хромосому. В этой ситуации клетку можно «обмануть» и внедрить в неё вместо второй хромосомы похожий фрагмент ДНК, но с мутацией. Тогда клетка починит разрыв, встроив в него то, что мы внедрили, – так называемую матрицу.

За счёт прицельно вносимого разрыва, который делает *CRISPR*, появилась возможность очень просто и эффективно заменять фрагменты в геноме – вносить строго определённые мутации и чинить сломанные гены. Но есть проблема: репарация чаще всего проходит по не гомологичному пути. Существуют разные методы, позволяющие сдвинуть процесс в сторону гомологичной репликации, но пока они работают не очень хорошо.

Применение CRISPR-Cas9:

1) с помощью *CRISPR* можно сломать, починить, заменить практически любой ген в геноме;

2) можно сделать хромосомную перестройку;

3) на определённом этапе технологию улучшили, лишив Cas-нуклеазу активности – сделали её не режущей. Одновременно «пристегнули» к ней другие ферменты. В итоге она просто садится на строго определённый фрагмент ДНК и может его редактировать, не вызывая повреждений. Например, менять азотистые основания без внесения разрывов в ДНК, что очень важно для биомедицинских задач;

4) при помощи *CRISPR* можно производить высокоточную микроскопию участков генома;

5) *CRISPR* позволяет вносить мутации, не оставляя следов.

Технологии редактирования генома предлагались и ранее, но ни одна из них не достигла такого успеха и, что важно, эффективности и точности.

Анти-CRISPR

Анти-CRISPR (англ. *Anti-CRISPR*) – система белков, благодаря которой бактериофаги (как бактерий, так и архей) противостоят разрушительному действию систем *CRISPR-Cas*. Системы анти-CRISPR описаны у многих бактериофагов. Белки этих систем в большинстве случаев мешают процессу узнавания мишени и работе белков *Cas*.

До открытия анти-CRISPR был известен только один способ, с помощью которого фагам удаётся избежать разрушения системой *CRISPR-Cas*, – приобретение точечных мутаций. Они практически не сказываются на жизнеспособности фага, зато нарушают комплементарность спаривания фаговой ДНК с направляющей РНК, из-за чего система *CRISPR-Cas* не может распознать вирусный генетический материал. Однако микроорганизмы быстро находят способ обойти эту защиту, вставляя в свой геном новые фрагменты чужеродной ДНК.

Недавно создали базу данных белков анти-CRISPR – *antiCRISPRdb*, – в которой любой желающий может найти известную информацию об интересующем белке анти-CRISPR.

Сегодня известно 22 семейства белков анти-CRISPR. Их объединяет лишь малый размер (от 50 до 150 аминокислотных остатков), они не имеют какого-либо общего мотива и ни один из них не похож на какой-либо белок с известной функцией. Поэтому предположить механизм действия анти-CRISPR с помощью биоинформатики оказалось невозможным. Пока удалось установить механизм действия шести белков анти-CRISPR с использованием генетического, биохимического и структурного подходов. Теоретически, белки анти-CRISPR могут влиять на работу *CRISPR-Cas* на нескольких этапах. *Они могут:*

- 1) препятствовать вставке новых фрагментов чужеродной ДНК в геном микроорганизма;
- 2) нарушать синтез белков *Cas*;
- 3) блокировать образование направляющей РНК;
- 4) препятствовать сборке активного комплекса белков *Cas* с РНК;

- 5) мешать связыванию комплекса с чужеродной ДНК;
- 6) блокировать способность комплекса к разрезанию ДНК-мишени.

Недавние исследования показали, что одних только точечных мутаций бактериофагам недостаточно, чтобы избежать действия *CRISPR-Cas*. Фагу необходимо иметь, по крайней мере, один ген анти-*CRISPR*, чтобы избежать полного уничтожения при совместном культивировании с бактериями с активными системами *CRISPR-Cas*.

Белки анти-*CRISPR* служат важными факторами эволюции микроорганизмов. Так, встраивание мобильных генетических элементов с генами таких белков в геном бактерии приводит к постоянной инаktivации систем *CRISPR-Cas* из-за стабильной экспрессии *анти-CRISPR*. Находящаяся в таком состоянии клетка не может сопротивляться проникновению других мобильных генетических элементов и, следовательно, горизонтальному переносу генов. При долговременной инаktivации *CRISPR-Cas* бактерия может совсем потерять гены *Cas* или накопить мутации, делающие их нефункциональными.

С помощью белков анти-*CRISPR* можно регулировать редактирование генома посредством *CRISPR-Cas*, например, оставляя систему активной только в некоторых тканях и органах, только на определенных этапах эмбрионального развития или только в определенные моменты клеточного цикла. Кроме того, применение *анти-CRISPR* поможет уменьшить частоту внеплановых мутаций, вносимых *Cas9*. Таким образом, в будущем, белки *анти-CRISPR* могут найти широкое применение в биотехнологии, генной инженерии и медицине.

Использование CRISPR-Cas9 в медицине

Для того чтобы вылечить генетическую болезнь, нужно исправить генетическую информацию, затронутую мутацией (рис. 22). Гемофилия, как и большинство генетических болезней, вызвана изменением только одной «буквы» в молекуле ДНК, а всего в нашем геноме 6 млрд. букв. Мы должны найти только одну «опечатку» и исправить её в заданном месте, не изменив ничего больше.

Генетический принцип классификации наследственных заболеваний

Аутосомно-доминантные,



Аутосомно-рецессивные,



X-сцепленные доминантные,



X-сцепленные рецессивные,



Y-сцепленные (голандрические),

Митохондриальные.

Отнесение болезни к той или иной группе помогает врачу сориентироваться относительно ситуации в семье и определить вид медико-генетической помощи

Рис. 22. Генетический принцип классификации наследственных заболеваний

Чтобы исправить «неправильный» ген, нужен очень точный молекулярный «скальпель», который найдет мутантную последовательность нуклеотидов и сможет «вырезать» её из ДНК. Таким «скальпелем» и является *Cas9*. С помощью гРНК, последовательность которой совпадает с искомым местом, он может внести разрыв в нужное место генома. Узнавание мишени происходит на участке длиной в 20–30 нуклеотидов. В среднем, последовательности такой длины встречаются в геноме человека единожды, что позволяет обеспечить точность. Клетка не погибнет от внесения разрыва в ДНК, так как он будет исправлен по здоровой копии из парной хромосомы за счёт естественного процесса репарации ДНК. Если парной хромосомы нет, как в случае гемофилии, можно внести в клетку участок «правильного» гена одновременно с *Cas9* и гРНК и использовать его как матрицу для заживления внесённого разрыва.

Ещё один пример использования технологии редактирования: при изменении единственного основания в последовательности ДНК (речь идет о гене бета-глобина человека) в белок встраивается не глутаминовая кислота, а аминокислота валин. Из-за этого единственного различия возникает серповидноклеточная анемия, при которой форма эритроцитов искажается, они приобретают характерную серповидную форму (рис. 23).

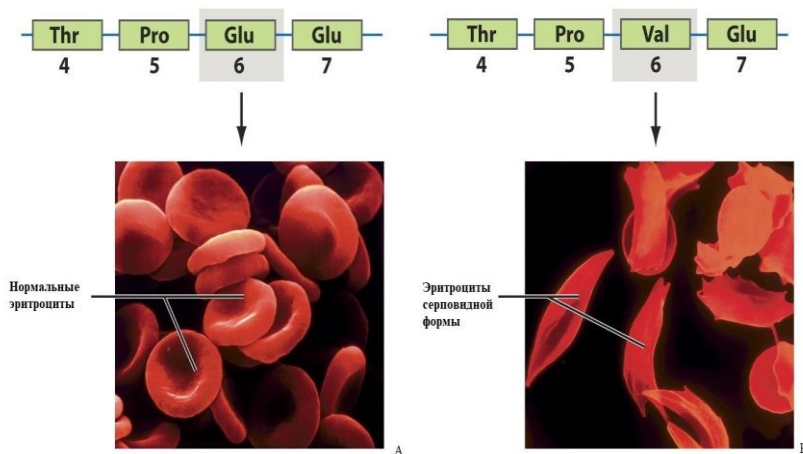


Рис. 23. А – эритроциты обычной формы, нормальная аминокислотная последовательность; Б – эритроциты серповидной формы, аминокислота – глутаминовая, заменена на валин (пара Г–Ц заменена на А–Т)

С помощью CRISPR-Cas9 можно делать мультиплексное редактирование сразу нескольких неправильных генов. Для этого достаточно ввести белок Cas9 и несколько разных gРНК. Каждый из них направит Cas9 к собственной мишени и вместе они устранят генетическую проблему.

В целом, описанный механизм функционирует за счёт принципа комплементарности. Цепочки двойной спирали ДНК «узнают» друг друга по правилам комплементарности. CRISPR РНК узнаёт свои мишени в двуцепочечной ДНК таким же образом, при этом образуется необычная структура, содержащая

двухпочечный участок взаимокплементарных РНК и одной из цепей ДНК-мишени, а другая цепь ДНК оказывается «вытесненной».

CRISPR-Cas9

в лечении наследственных заболеваний

В первую очередь с помощью *CRISPR-Cas9* можно лечить «простые», моногенные генетические заболевания: гемофилию, муковисцидоз, лейкемию. В этих случаях понятно, что именно нужно отредактировать. Но существуют заболевания, генетическая природа которых очень сложна. Такие болезни – сложный результат взаимодействия разных генов (5, 10 и больше), а также их вариантов. Такие болезни называются полигенными. И чтобы лечить такие сложные болезни с помощью *CRISPR-Cas9* потребуются мультиплексные подходы.

Надо понимать, что практическое применение *CRISPR-Cas9* в медицине – это скорее отдалённое будущее, т.к. ещё требуется работа по улучшению технологии, её надёжности и безопасности. В целом ситуация с болезнями крови лучше, так как испорченный ген нужен только для кроветворения, а технологии клеточной терапии для таких болезней хорошо отработаны. Используя систему *CRISPR-Cas9*, можно получить образец костного мозга пациента и вылечить его собственные кроветворные стволовые клетки, изменив неправильную букву. Затем пациента придётся облучить, чтобы убить пораженные кроветворные клетки, и ввести его же собственные отредактированные клетки обратно – не клетки ближайшего родственника или вообще незнакомого человека, а именно его, полностью совместимые. Они начнут делиться и производить здоровые кровяные клетки. Если же речь идет о редактировании, например, опухоли печени, все гораздо сложнее. Нужно будет решить главную медицинскую проблему – проблему доставки компонентов *CRISPR-Cas9*-системы именно к поражённым клеткам.

CRISPR-Cas9 – это совершенно новый уровень редактирования, дешёвый и точный. Его основное преимущество в том, что он основан на простом принципе

комплементарного узнавания, который используется для узнавания последовательности одних нуклеиновых кислот с помощью других, комплементарных им.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТА

Темы:

1. Репарация молекулы ДНК, её основные типы.
2. Эволюция геномов.
3. Биоинформатика в геномике и протеомике.
Кодирование наследственной информации.
4. Информационный анализ последовательностей нуклеиновых кислот и белков.
5. Теоретические методы геномного исследования и их программное обеспечение.
6. Программа «Протеом человека».

ПРАКТИКУМ

Рекомендуемые задания к практическим занятиям



Основными условиями успешного освоения учебного курса «Геномика с основами молекулярной генетики» для студента является:

- 1) плановость в организации учебной работы;
- 2) серьёзное отношение к изучению материала;
- 3) постоянный самоконтроль.

На занятия студент должен приходить, имея багаж знаний и вопросов по уже изученному материалу.

Для выполнения практических работ студенту необходимы знания, умения и навыки, формируемые предшествующими дисциплинами: «Генетика» и «Молекулярная биология». Также выполнение тем в разделе «Самостоятельная работа студента».

ПРАВИЛА ОФОРЛЕНИЯ РИСУНКОВ

Рисунки являются необходимым элементом изучения учебного материала, они нужны, чтобы лучше понять и закрепить предложенный материал. Все практические занятия должны сопровождаться графическим материалом.

Под каждым рисунком необходимо указать его номер и название. Стрелки схем и блоки рисуются простым карандашом.

При выполнении рисунков необходимо пользоваться простым и несколькими цветными карандашами.

Поскольку рисование на занятиях не самоцель, а метод

изучения, при зарисовке необходимо соблюдать следующие правила:

1) рисовать только на одной стороне листа, т.к. рисунки, сделанные на обеих сторонах, накладываются друг на друга и со временем портятся;

2) рисунок должен быть крупным, детали хорошо различимыми;

3) на каждом рисунке обязательно должны быть сделаны обозначения его отдельных частей/составляющих. Надписи выполняются авторучкой следующим способом: напротив отдельных частей объекта нужно поставить стрелки и рядом с ними поставить цифры, а затем расположить эти цифры в виде столбца под рисунком и написать напротив их обозначения.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 1

Тема: ИСТОРИЯ ГЕНОМИКИ

ЗАДАНИЕ:

Кратко ответьте на вопросы:

1. История развития геномных исследований.
2. Геномная революция конца 20 в.
3. Иерархический и шотган-подход к расшифровке геномных последовательностей.
4. Эволюция подходов к расшифровке геномных последовательностей.
5. Палеогеномика. Палеогеномные исследования.
6. Укажите сложности секвенирования «ископаемой» ДНК.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 2

Тема: ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ГЕНОМИКИ

ЗАДАНИЕ:

Кратко дайте ответы на вопросы:

1. Функциональная геномика. Подходы к идентификации генов в геномных последовательностях и определению их функций.

2. Концепция минимального генома. Природные минимальные геномы бактерий, архей, эукариот – их размер, число генов, особенности организации.

3. Синтетическая геномика. Методы синтеза, клонирования и трансплантации полных геномных последовательностей. Достижения и перспективы синтетической геномики.

4. Метагеномика. Геномные подходы к исследованию сообществ некультивируемых микроорганизмов.

5. Палеогеномика. Технические трудности, достижения и перспективы палеогеномных проектов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ № 3, 4

Тема: ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМОВ

ЗАДАНИЕ:

I. Кратко ответьте на вопросы:

1. Ранние этапы эволюции геномов.
2. Уровни изменений генома.
3. Относительный вклад мутационных процессов в эволюцию генома.
4. Относительный вклад рекомбинационных процессов в эволюцию генома.
5. Классификация, строение и основные свойства мобильных генетических элементов эукариот.
6. Классификация, строение и основные свойства мобильных генетических элементов прокариот.
7. Вклад горизонтального переноса генов в эволюцию геномов про- и эукариот.
8. Дайте определение термина «вид» для прокариот.
9. Что такое «пангеном»?

II. Впишите верные термины, соответствующие описанию:

1. Автономно реплицирующаяся молекула ДНК, в которую можно встраивать фрагменты чужой ДНК и вводить в клетку –

_____.

2. Короткие олигонуклеотиды (фрагменты ДНК), содержащие в своем составе нуклеотидную последовательность какого-либо сайта рестрикции _____.
3. Многократное удвоение плазмиды или фрагмента ДНК – _____.
4. Двухтяжевые олигонуклеотиды, предназначенные для объединения фрагментов ДНК с несовместимыми концами – _____.
5. Фермент, отвечающий за восстановление фосфодиэфирной связи в молекуле ДНК – _____.
6. Фермент, отвечающий за синтез комплементарной цепи ДНК – _____.
7. Фермент, вносящий разрывы в двойную цепь ДНК – _____.
8. За синтез ДНК на матрице РНК отвечает фермент – _____.
9. Рестриктаза, выделенная из *Bacillus subtilis*, называется – _____.
10. Этап полимеразной цепной реакции, когда образуются одноцепочечный фрагмент, связанный с праймером – _____.
12. Способ введения ДНК, основанный на изменении проницаемости цитоплазматической мембраны путём обработки электроимпульсами называется – _____.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 5

Тема: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БАЗЫ ДАННЫХ И АННОТАЦИЯ ГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

ЗАДАНИЕ:

Кратко ответьте на вопросы:

1. Аннотация геномных последовательностей: основные задачи и подходы к их решению.
2. Как можно найти кодирующие последовательности в неаннотированном геноме?

3. Как можно определить функции кодирующих последовательностей?

4. Молекулярные базы данных. Специализация, структура и методы поиска информации.

5. Основные алгоритмы сравнения нуклеотидных и белковых последовательностей между собой и программные пакеты, их реализующие.

6. Какая из молекулярных баз данных содержит больше всего информации?

7. Какая из основных молекулярных баз данных содержит наиболее достоверную информацию и почему?

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ № 6, 7

Тема: СТРУКТУРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ГЕНОМА

ЗАДАНИЕ:

I. Кратко ответьте на вопросы:

1. Синтез ДНК *in vivo* и *in vitro*: компоненты и продукты реакции, свойства ДНК-полимераз.
2. Способы использования реакции полимеризации ДНК для определения нуклеотидных последовательностей.
3. Хромосомы про- и эукариот: форма, количество, структурные элементы, обеспечивающие стабильность и репликацию.
4. Структура гена у различных организмов: прерывистые и непрерывные кодирующие последовательности, размеры и расположение регуляторных элементов.
5. Организация оперонов у прокариот. Зарисуйте лактозный оперон у бактерий, опишите механизм его работы.

II. Тестовые задания

1. Какая из перечисленных технологий является основой генетической инженерии:

1. Создание рекомбинантных ДНК;
2. Выделение ДНК из организмов;
3. Расщепление ДНК на фрагменты;
4. Выделение хромосом;
5. Получение плазмид.

2. Под термином «обратная генетика» понимают следующие манипуляции

1. ДНК – РНК – белок – модификация белка – клетка;
2. Белок – РНК – ДНК – модификация ДНК – клетка;
3. РНК – модификация РНК – ДНК – белок;
4. Клетка – ДНК – РНК – белок – модификация белка.

3. Трансгенные организмы получают путём ввода чужеродного гена в:

1. Соматическую клетку;
2. Яйцеклетку;
3. Сперматозоид;
4. Митохондрии.

4. Год, когда впервые показана роль нуклеиновых кислот в передаче наследственной информации:

1. 1940;
2. 1944;
3. 1953;
4. 1957.

5. Год, когда была создана модель двойной спирали ДНК:

1. 1940;
2. 1944;
3. 1953;
4. 1957.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 8
Тема: АНАЛИЗ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

ЗАДАНИЕ:

Кратко ответьте на вопросы:

1. Методы выделения ДНК.
2. Полимеразная цепная реакция.
3. Метод гель-электрофореза.
4. ПДРФ-анализ. Принцип действия, достоинства и недостатки.
5. SSCP-анализ. Принцип действия, достоинства и недостатки.
6. Секвенирование. Возможности и ограничения.
7. Опишите и зарисуйте структуру генома человека.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ № 9, 10
Тема: СЕКВЕНИРОВАНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ

ЗАДАНИЕ:

I. Кратко ответьте на вопросы:

1. Секвенирование ДНК по методу Сэнгера: возможности и ограничения.
2. Принцип действия, достоинства и недостатки геномных секвенаторов второго поколения, использующих реакцию пиросеквенирования.
3. Принцип действия, достоинства и недостатки геномных секвенаторов второго поколения, использующих ДНК-полимеразную реакцию (секвенирование путем синтеза, Illumina).
4. Принцип действия, достоинства и недостатки геномных секвенаторов второго поколения, использующих детекцию протонов (*Ion Torrent*).
5. Геномные секвенаторы третьего поколения, использующие технологию SMRT (*Pacific Biosciences*): принцип действия, преимущества и недостатки.
6. Нанопоровые геномные секвенаторы третьего поколения (*Oxford Nanopore*): принцип действия, преимущества и недостатки.

II. Тестовые задания

Тестовые задания:

1. В современных ДНК-секвенаторах используют:

- а) высокоэффективный капиллярный электрофорез;
- б) высокоэффективную жидкостную хроматографию;
- в) тонкослойную хроматографию;
- г) электрофорез в пластинах геля.

2. Не является методом ДНК-секвенирования:

- а) метод терминаторов по Сенгеру;
- б) плюс-минус метод по Сенгеру;
- в) метод ник-трансляции по Сенгеру;
- г) метод химической дегградации ДНК по Максому-Гилберту.

3. Что имеет наибольшую длину:

- а) контиг;

- б) скаффолд;
- в) рид;
- г) олигонуклеотид.

4. Флюорофор к нуклеотиду-терминатору пришивают:

- а) к 5'-концу;
- б) к 3'-концу;
- в) к 5'-концу и к 3'-концу;
- г) к основанию.

5. Пиросеквенирование основано на:

- а) использовании rfu-полимеразы из *Pirococcus furiosus*;
- б) детекции пирофосфата;
- в) применении пиросульфата для секвенирования;
- г) использовании чрезвычайно термостойких ДНК-полимераз.

3. Температура денатурации ДНК (°С):

- 1. 37;
- 2. 65;
- 3. 100.

4. Узнают и расщепляют молекулы ДНК строго в сайте узнавания или на фиксированном расстоянии от него нуклеазы:

- 1. 1 класса;
- 2. 2 класса;
- 3. 3 класса;
- 4. 1 и 3 класса;
- 5. 2 и 3 класса.

5. При разгоне ДНК в агарозном геле дальше всего от стартовой линии окажутся фрагменты:

- 1. Короткие;
- 2. Длинные;
- 3. Короткие.

6. Для построения рестрикционной карты необходимо фрагменты ДНК последовательно обработать:

- 1. 1 рестриктазой, затем 2 рестриктазой;
- 2. 1 рестриктазой и смесью 1 и 2 рестриктаз;
- 3. 1 рестриктазой, 2 рестриктазой и их смесью.

7. Название «метод дробовика» применяется по отношению к библиотекам:

- 1. Геномным;

2. Клоновой ДНК.

8. Полимеразную цепную реакцию разработал:

1. Берг;
2. Гилберт;
3. Саузерн;
4. Маллис.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 11
Тема: РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОМОВ

ЗАДАНИЕ:

I. Кратко ответьте на вопросы:

1. Характерные черты геномов прокариот.
2. Характерные черты геномов факультативных и облигатных патогенов.
3. Взаимная адаптация геномов патогена и его хозяина.
4. Разнообразие и характерные особенности геномов одноклеточных эукариот.
5. Основные характеристики геномов грибов.
6. Организация геномов нематод.
7. Организация генома *Drosophila melanogaster*.
8. Особенности организации геномов позвоночных животных.
9. Сравнительная характеристика геномов *Homo sapiens* и *Pan troglodytes*.
10. Отличительные черты геномов растений.

II. Задача

В результате секвенирования удалось установить порядок нуклеотидов:

CCCGTAGCTAGCTAGCTTTAGTCCT (25 нуклеотидов). Для секвенирования использовался праймер длиной 12 нуклеотидов. Определите: фрагменты какой длины образовывались в каждой пробирке в ходе секвенирования?

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ № 12, 13

Тема: БИОИНФОРМАТИКА

ЗАДАНИЕ:

I. Кратко ответьте на вопросы:

1. Аннотация геномных последовательностей: основные задачи и подходы к их решению.
2. Как можно найти кодирующие последовательности в неаннотированном геноме?
3. Как можно определить функции кодирующих последовательностей?
4. Молекулярные базы данных. Специализация, структура и методы поиска информации.
5. Основные алгоритмы сравнения нуклеотидных и белковых последовательностей между собой и программные пакеты, их реализующие.
6. Какая из молекулярных баз данных содержит больше всего информации?
7. Какая из основных молекулярных баз данных содержит наиболее достоверную информацию и почему?

II. Тестовые задания

1. Методику переноса ДНК на нитроцеллюлозный фильтр разработал:

1. Берг;
2. Гилберт;
3. Саузерн;
4. Маллис.

2. Наличие интронов и экзонов не характерно для ДНК:

1. Дрожжей;
2. Растений;
3. Животных;
4. Бактерий.

3. Для экспрессии эукариотических генов в клетке прокариот необходимо ставить их под контроль регуляторных элементов:

1. Эукариот;
2. Прокариот;

3. Прокариот и эукариот.

4. Аттенуаторы располагаются между:

1. 1 и 2 структурным геном;
2. В конце структурного гена;
3. Между промотором и 1-м структурным геном;
4. Между промотором и 2-м структурным геном.

5. Полимеразная цепная реакция – это:

1. Метод, позволяющий значительно увеличить количество копий (концентрацию) определённого фрагмента ДНК;
2. Метод, непосредственно позволяющий расшифровать первичную структуру ДНК;
3. Метод, позволяющий проводить экстракцию геномной ДНК из биологических образцов;
4. Метод, при котором молекулы разделяются на основе их подвижности в геле под действием электрического поля.

6. Направление синтеза (элонгации) новой цепочки ДНК при участии полимеразы:

1. 3'→5';
2. 5'→5';
3. 5'→3';
4. 5'→3' и 3'→5', в зависимости от класса используемой полимеразы.

6. Метод, при котором молекулы разделяются на основе их подвижности в геле под действием электрического поля:

1. Гель-электрофорез;
2. Спектрофотометрия;
3. Полимеразная цепная реакция;
4. Флуориметрия.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 14
Тема: РЕПАРАЦИЯ МОЛЕКУЛ ДНК

ЗАДАНИЕ:

Кратко дайте ответы на вопросы:

1. Дайте определение термину «репарация молекулы ДНК»;
2. История открытия репарации;
3. Репарационные системы ДНК;

4. Источники повреждения ДНК;
5. Основные типы повреждения ДНК;
6. Типы репарации ДНК;
7. SOS-репарация молекулы ДНК;
8. Репарация однонитевых и двухнитевых разрывов ДНК;
9. Опишите особенности и зарисуйте схему световой репарации молекулы ДНК;
10. Опишите особенности и зарисуйте схему темновой репарации молекулы ДНК.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 15
Тема: ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСДУКЦИЯ

ЗАДАНИЕ:

Кратко дайте ответы на вопросы:

1. Дайте определение термину «генетическая трансдукция»;
2. Трансдукционное картирование: определение, схема, значение;
3. Опишите общую (неспецифическую) трансдукцию;
4. Опишите специфическую трансдукцию;
5. Что значит «абортивная трансдукция»?;
6. Трансдукции клеток млекопитающих с вирусными векторами: этапы, схема;
7. Практическое использование генетической трансдукции;
8. Опишите и зарисуйте схему общей трансдукции между линиями *E. coli* с участием бактериофага λ .

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 16
Тема: МУТАГЕНЕЗ. ИЗМЕНЕНИЯ КАРИОТИПА ЧЕЛОВЕКА

ЗАДАНИЕ:

Кратко дайте ответы на вопросы:

1. Мутационная изменчивость у человека.
2. Молекулярные механизмы генных мутаций.

3. Классификация генных мутаций.
4. Понятие о моногенных наследственных заболеваниях.
5. Понятие о полигенных наследственных заболеваниях.
6. Молекулярные и цитологические механизмы хромосомных мутаций.
7. Современные методы изучения кариотипа человека.
8. Классификация мутаций по причинам возникновения.
9. Мутагенные факторы, методы определения мутагенной активности веществ.
10. Генеративные и соматические мутации, примеры заболеваний с ними связанные.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 17, 18
Тема: ИННОВАЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
В ПРОТЕОМИКЕ

ЗАДАНИЕ:

Кратко дайте ответы на вопросы:

1. Дайте определение термин «протеомика», её связь с геномикой и практическое применение.
2. Основные направления протеомных исследований.
3. Современные базы данных белков.
4. Опишите один из наиболее перспективных методов идентификации белков – масс-спектрометрия (*используйте схемы и фотографии приборов для наглядности в своей работе*).
5. Достижения структурной протеомики.
6. Дайте определение термину «диагностическая протеомика». Области исследования и возможности медицинской протеомики.
7. Опишите основные достижения геномных и протеомных исследований в кардиологии. Укажите спектр белковых маркеров в сердечно-сосудистой патологии. (*)
8. Протеомные технологии в молекулярной диабетологии. (*)
9. Опишите основные достижения геномных и протеомных исследований в онкологии. Роль онкопротеомики в

диагностике и терапии рака. Тесты для обнаружения биомаркеров определенного онкологического заболевания. (*)

10. Дайте определение термину «апоптоз». Протеомные исследования в изучении апоптоза. Причины запуска апоптоза клетки. Ингибирование или инициация процесса апоптоза.

11. Дайте определение термину «протеолиз». Заболевания, связанные с нарушениями протеолиза.

12. Опишите основные достижения геномных и протеомных исследований в фундаментальной биологии.

*– заполните таблицу

Таблица

<i>Патология</i>	<i>Генетические и белковые маркеры этих заболеваний</i>
Кардиология	
Диабетология	
Онкология	

ТЕМЫ УЧЕБНЫХ ДОКЛАДОВ

1. Геномика как наука: цель, задачи, разделы.
2. История развития геномики.
3. Программа «Геном человека».
4. Методы анализа геномов.
5. Основы геномного полиморфизма.
6. Структурный анализ геномов: физическое и генетическое картирование.
7. Геномы прокариот: строение и характерные особенности.
8. Основные структурные компоненты геномов прокариот и эукариот.
9. Геномы митохондрий.
10. Сателлитная ДНК: локализация, распределение, функциональная значимость.
11. Пути образования генных семейств: значимость и их роль в эволюции геномов.
12. Мобильные генетические элементы: принципы строения, передвижения и распространение в геномах.
13. Мобильные генетические элементы – вирусные ретротранспозоны. Строение, их роль в геноме человека.
14. Функциональная геномика.
15. Сравнительная геномика.
16. Протеомные исследования.
17. Транскриптом и транскриптон и методы его исследования.
18. Секвенирование первого поколения: преимущества и недостатки.
19. Роль мобильных элементов в эволюции геномов.
20. Методические подходы генетического картирования.
21. Геномные проекты.
22. Изучение полиморфизма геномов.
23. Секвенирование третьего поколения.
24. Полиморфизм и молекулярные маркеры.
25. Геномные подпроекты.
26. Организация некодирующей ДНК.
27. Структурные компоненты геномов.

28. Основы ДНК-полиморфизма.
29. Гаплотипы и гаплотипирование.
30. Неядерные мутации и болезни человека.
31. Комбинаторные перестройки геномов эукариот.
32. Геномы растений: размер, структура, особенности строения.
33. Неядерный геном растений.
34. Геном человека: размер, структура, особенности строения.
35. Протеом и его динамичность.
36. Медицинская геномика. Биомедицинские исследования геномов.
37. Генодиагностика. Развитие, методы.
38. Генотерапия. Развитие, методы.
39. Фармакогеномика. Развитие, методы.
40. Биологические базы данных.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ НАПИСАНИЯ УЧЕБНОГО ДОКЛАДА



Во время обучения в вузе студент должен выполнять различные виды работ, одной из них является доклад. Доклад является самостоятельным опытом исследования для студента. Доклад представляет собой научно-исследовательскую работу, автор которой раскрывает суть исследуемой темы, рассматривает её со всех точек зрения и высказывает собственный взгляд на проблему. В докладе должны сочетаться два качества исследователя:

- 1) умение провести анализ;
- 2) ответить на поставленные вопросы.

Учебный доклад – работа объёмом 6–7 печатных страниц, выполняемая магистрантом в течение определённого срока. Учебный доклад должен содержать основные фактические сведения и выводы по рассматриваемому вопросу. **Источниками информации являются:** научная литература, энциклопедии, словари, интернет-источники и т.д.

Подготовка любого учебного доклада начинается с ознакомления и осмысления, а затем анализа источника или группы источников, выявления основных сведений, которые должны войти в учебный доклад.

Доклад не заимствуется из первоисточника полностью, а представляет собой совокупность данных и их обобщение. Источники информации подбираются тщательно и отражают суть сообщения. Доклад аргументируется выступающим и преподносится последовательно.

Не допускается использование местоимения «я» или словосочетаний «я считаю», «на мой взгляд» и т.д.

Структура учебного доклада

Доклад предполагает письменное изложение и должен отличаться академическим стилем. Он должен быть правильно оформлен и содержать:

1. Титульный лист.

2. **Введение.** Во введении даётся краткая характеристика изучаемой темы, обосновывается её актуальность, личная заинтересованность автора в её исследовании, отмечается практическая значимость изучения данного вопроса, где это может быть использовано.

3. **Основная часть доклада.** В данном разделе должна быть раскрыта тема.

4. **Заключение.** В заключении подводятся итоги.

5. **Приложение (обязательно).** В состав приложений могут входить: фотографии, графики, таблицы, фотографии и т.д. Приложения располагаются в конце работы и они НЕ ВХОДЯТ В ПЕЧАТНЫЙ ОБЪЁМ РАБОТЫ.

6. Список литературы.

Правила оформления учебного доклада

Поля страницы: левое – 2 см, правое – 1,5 см, нижнее – 1,5 см, верхнее – 1,5 см до номера страницы. **Текст** печатается через 1,5 интервал. Рекомендуется использовать шрифт: Times New Roman, размер шрифта – 14 пт.

Этапы работы над докладом

Чтобы написать полноценный и качественный доклад студент должен придерживаться следующего плана работы:

1) прежде всего, необходимо подобрать и проанализировать источники по теме. Рекомендуется для работы использовать около 8–10 источников;

2) затем следует составить библиографию и приступить к обработке и систематизации материала, а также подготовке выводов и обобщений;

3) следующим этапом будет составление плана доклада и его написание;

4) завершающий шаг – публичное выступление.

Оформление титульного листа

МИНИСТЕРСТВО ПРОСВЕЩЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЛУГАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «ЛГПУ»)

Факультет естественных наук
Кафедра лабораторной диагностики, анатомии и физиологии

Учебный доклад на тему:

Выполнил (-ла):

студент (-ка) 1 курса, направления
подготовки
06.04.01 «Биология»,
магистерская программа «Генетика»

(Ф.И.О.)

Проверила:

доцент кафедры лабораторной
диагностики, анатомии
и физиологии,
канд. биол. наук, доцент
Криничная Н. В.

Луганск, 20__

ГЛОССАРИЙ

Аннотация генома – это процесс получения структурной и функциональной информации гена с использованием различных методов анализа, сравнения, оценки, точности и других методов интеллектуального анализа.

Анти-CRISPR – система белков, благодаря которой бактериофаги (как бактерий, так и архей) противостоят разрушительному действию систем CRISPR-Cas. Системы анти-CRISPR описаны у многих бактериофагов. Белки этих систем в большинстве случаев мешают процессу узнавания мишени и работе белков Cas. Системы анти-CRISPR могут иметь биотехнологическое значение, поскольку могут применяться для тонкой регуляции редактирования генома с помощью технологии CRISPR-Cas9.

Банк (библиотека) генов – полный набор генов данного организма, полученный в составе рекомбинантных ДНК.

Ген – участок ДНК, кодирующий структуру одного белка.

Генная инженерия – совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их организм.

Генная терапия – введение генетического материала (ДНК или РНК) в клетку для восстановления нормальной функции.

Генный банк – тип биорепоzitория, в котором сохраняется генетический материал.

Генетическая карта – схема расположения структурных генов и регуляторных элементов в хромосоме.

Генетическое разнообразие, или генетический полиморфизм, – разнообразие популяций по признакам или маркерам генетической природы. Один из видов биоразнообразия.

Геном – это наследственный материал клетки (ядерный и неядерный), содержащий весь объём информации, необходимый для развития организма, его существования в

определённых условиях среды, эволюции и передачи всех наследственных свойств в ряду поколений.

Ген структурный – любой ген, кодирующий какую-либо полипептидную цепь (первичную структуру белка) или молекулу РНК, и контролирующей развитие конкретного признака.

Гены «домашнего хозяйства» – это гены, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций организма, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне. Гены домашнего хозяйства функционируют повсеместно, на всех стадиях жизненного цикла организма.

Гены полимерные (полигены) – гены, действующие аддитивно, суммарно (кумулятивно) на один и тот же признак.

Гены-регуляторы – гены, кодирующие регуляторные белки, активирующие или подавляющие транскрипцию других генов.

Гены тканеспецифические – гены, которые работают только в определённых клетках организма и на определённых стадиях его развития (большинство генов).

Группа сцепления – совокупность всех генов, локализованных в одной хромосоме.

Доза гена – количественный показатель экспрессии гена.

Карта хромосом – графическое изображение последовательного расположения генов в хромосомах с указанием расстояния между ними в морганидах.

Картирование генов – определение положения данного гена на какой-либо хромосоме относительно других генов. Лежит в основе составления генетических карт.

Локус – место в хромосоме, в котором расположен ген.

Маркерный ген – это ген рекомбинантной ДНК, кодирующий селективный признак, используемый для определения того, была ли последовательность нуклеиновой кислоты успешно вставлена в ДНК организма.

Мобильные элементы генома – последовательности ДНК, способные перемещаться внутри генома.

Нестабильный ген – ген, с высокой частотой мутаций.

Оперон – совокупность совместно транскрибируемых генов у прокариот, обычно контролирующая родственные биохимические функции. Примеры: лактозный оперон (англ. *lac operon*), галактозный оперон.

Повторяющиеся последовательности ДНК – участки ДНК, включённые в геном, последовательность которых состоит из повторяющихся фрагментов.

Рекомбинантные молекулы ДНК – получаются в результате объединения, сшивки двух чужеродных фрагментов ДНК.

Репарация – особая функция клеток всех живых организмов, заключающаяся в способности исправлять химические повреждения и разрывы в молекулах ДНК, повреждённой при нормальном биосинтезе ДНК в клетке, а также в результате воздействия физических или химических агентов.

Рестриктазы – группа бактериальных сайт-специфических эндонуклеаз, которые узнают определённые участки ДНК длиной от четырёх и более пар нуклеотидов и расщепляют нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне его.

Рестрикты – фрагменты ДНК, образовавшиеся после её гидролиза рестриктазой.

Рестрикционная карта – схема молекулы ДНК, на которой указаны места разрезания её различными рестриктазами.

Риды – фрагменты ДНК (длиной от 25 до 20 000 нуклеотидов), считываемые с генома при помощи секвенатора.

Секвенирование ДНК или РНК – определение первичной последовательности нуклеотидов в составе этих макромолекул.

Секвенирование *de novo* – секвенирование нового для науки (ранее не прочитанного) генома.

Сплайсинг – процесс удаления интронов из предшественника РНК и объединение экзонов; процесс формирования и-РНК из про-и-РНК.

Терминация – процесс, приводящий к окончанию репликации, транскрипции или трансляции.

Транскрипция – синтез РНК на ДНК-матрице; осуществляется РНК-полимеразой.

Трансляция – это процесс биосинтеза белка, в результате которого информация с языка последовательности нуклеотидов в и-РНК переводится (транслируется) на язык последовательности аминокислот в полипептидной молекуле.

Эгоистичные генетические элементы (эгоистичные гены, эгоистичная ДНК) – это генетические сегменты, которые могут усиливать собственную передачу за счёт других генов в геноме, даже если это не имеет положительное или отрицательное влияние на приспособленность организма. Геномы традиционно рассматривались как сплоченные единицы, где гены действуют вместе, чтобы улучшить приспособленность организма. Однако, когда гены имеют некоторый контроль над своей собственной передачей, правила могут измениться.

Экзом – часть генома, представляющая экзоны, то есть последовательности, которые транскрибируются на матричную РНК после того, как интроны удаляются в процессе сплайсинга РНК. Таким образом, экзом отличается от транскриптона, включающего в себя всю совокупность транскриптов.

CRISPR (от англ. *clustered regularly interspaced short palindromic repeat* – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) – особые локусы бактерий и архей, состоящие из прямых повторяющихся последовательностей, которые разделены уникальными последовательностями (спейсерами).

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература:

1. Альбертс, Б. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс, А. Джонсон, Дж. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, П. Уолтер. В 3-х томах. – М.–Ижевск : НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2012. – 2 000 с.
2. Криничная, Н. В. Генетика : учебное пособие / И. Д. Соколов, П. К. Бойченко, М. В. Воронов. – Луганск : Книта, 2020. – 136 с.
3. Льюин, Б. Гены / Б. Льюин. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 896 с.
4. Примроуз, С. Геномика. Роль в медицине / С. Примроуз, Р. Тваймен. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 277 с.
5. Сорокина, И. А. Современная геномика и протеомика : учебное пособие для вузов / И. А. Сорокина, Е. М. Вечканов. – Ростов-на-Дону : Изд-во ЮФУ, 2010. – 60 с.
6. Рыбчин, В. Н. Основы генетической инженерии / В. Н. Рыбчин. – СПб : Изд-во СПбГТУ, 2002. – 521 с.
7. Сингер, М. Гены и геномы. В 2-х т. / М. Сингер, П. Берг. – М. : Мир, 1998.

Дополнительная литература:

1. Белясова, Н. А. Биохимия и молекулярная биология / Н. А. Белясова. – Книжный дом, 2004. – 415 с.
2. Кнорре, Д. Г. Биологическая химия / Д. Г. Кнорре, С. В. Мызина. – М., 2000. – 479 с.
3. Коничев, А. С. Молекулярная биология / А. С. Коничев. – М. : Академия, 2003. – 400 с.

4. Криничная, Н. В. Молекулярная биология : учебное пособие / М. В. Воронов. – Луганск : Книта, 2022. – 120 с.
5. Микашинович, З. И. Геномика и генная инженерия : учебное пособие / З. И. Микашинович, Н. Р. Телесманич, О. Г. Саркисян, Т. Э. Харатьян. – Ростов-на-Дону : Изд-во РостГМУ, 2018. – 90 с.
6. Павличенко, В. И. Основы молекулярной биологии и генетики / В. И. Павличенко, В. А. Абрамов. – Запорожье : Издательство ЗГМУ, 2007. – 293 с.
7. Попов, В. В. Геномика с молекулярно-генетическими основами / В. В. Попов. – М. : ЛИБРОКОМ, 2009. – 298 с.
8. Спирин, А. С. Молекулярная биология / А. С. Спирин. – М. : Академия, 2011. – 496 с.
9. Фаллер, Д. М. Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей / Д. М. Фаллер, Д. Шилдс. Пер. с англ. – М. : Бином-Пресс, 2003. – 272 с.
10. Штерн, К. Основы генетики человека / К. Штерн. – М. : Медицина, 1965. – 689 с.
11. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия / С. Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сибирское университетское издание, 2004. – 496 с.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Классическая генетика – наука о наследственности и изменчивости живых систем, а геномика – это наука, занимающаяся установлением структуры и выяснением механизма функционирования генов в живых системах. Геномика позволяет выразить потенциальные возможности живого организма, предвидеть реакцию на внешние воздействия.

Учебная дисциплина «Геномика с основами молекулярной генетики» является одним из основополагающих учебных предметов для студентов, обучающихся по направлению подготовки 06.04.01 Биология, магистерская программа: Генетика. Учебное пособие предусматривает знакомство студентов с основными разделами геномики и формирует у студента целостные, фундаментальные знания о ней. Темы пособия включают современные научные разработки, открытия в области геномики и молекулярной генетики.

Учебное пособие разработано в соответствии с рабочей программой дисциплины. В пособии представлены основные темы, предусмотренные программой, и в которых изложены современные подходы, методы исследования, новые разработки в геномике.

Авторы выражают благодарность рецензентам за ценные замечания и советы, способствующие улучшению учебного пособия.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Учебное издание

КРИНИЧНАЯ Наталия Викторовна
ВОРОНОВ Михаил Владимирович
БОЙЧЕНКО Павел Константинович
КИЗИМЕНКО Сергей Викторович

ГЕНОМИКА

С ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

Учебное пособие

В авторской редакции

Подписано в печать 02.06.2023. New Roman.

Печать ризографическая. Формат 60×84/16.

Усл. печ. л. 5,58.

Тираж 100 экз. Заказ № 67.

Издатель

ФГБОУ ВО «ЛГПУ»

«Книга»

ул. Оборонная, 2, г. Луганск, ЛНР, 291011.

Т/ф: (0642)58-03-20

e-mail: knitaizd@mail.ru