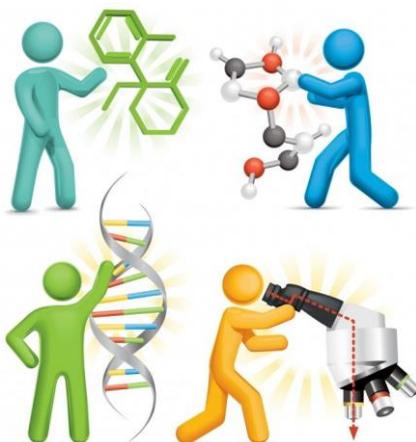


Н.В. Криничная, М.В. Воронов

Молекулярная биология

Учебное пособие

для студентов очной и заочной форм обучения
по направлению подготовки 06.03.01 «Биология»,
профили: «Биомедицина и лабораторная диагностика», «Общая
биология»; по направлению подготовки 44.03.05 «Педагогическое
образование (с двумя профилями подготовки)». «Химия. Биология»



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
ЛУГАНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ЛУГАНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
«ЛУГАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ГОУ ВО ЛНР «ЛГПУ»)

Н.В. Криничная, М.В. Воронов

Молекулярная биология

Учебное пособие

для студентов очной и заочной форм обучения
по направлению подготовки 06.03.01 «Биология»,
профили: «Биомедицина и лабораторная диагностика», «Общая
биология»; по направлению подготовки 44.03.05 «Педагогическое
образование (с двумя профилями подготовки)». «Химия. Биология»

УДК 577.2 (075.8)
ББК 28.070я73
К82

Рецензенты:

Билык О.В.

– доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ГУ ЛНР «Луганский государственный медицинский университет имени Святого Луки», кандидат биологических наук, доцент;

Дяченко В.Д.

– заведующий кафедрой химии и биохимии Государственного образовательного учреждения высшего образования Луганской Народной Республики «Луганский государственный педагогический университет», доктор химических наук, профессор;

Косогова Т.М.

– доцент кафедры биологии Государственного образовательного учреждения высшего образования Луганской Народной Республики «Луганский государственный педагогический университет», кандидат биологических наук, доцент.

Криничная Н.В., Воронов М.В.

К82 Молекулярная биология : учебное пособие / сост. Н.В. Криничная, М.В. Воронов. ГОУ ВО ЛНР «ЛГПУ». – Луганск : Книта, 2022. – 120 с.

В учебном пособии изложены основные положения и достижения современной молекулярной биологии: генетические и молекулярные механизмы клеточных процессов, методы исследования нуклеиновых кислот, принципы конструирования ДНК.

Учебное пособие предназначено для студентов очной и заочной форм обучения по направлению подготовки 06.03.01 «Биология», профили: «Биомедицина и лабораторная диагностика», «Общая биология»; по направлению подготовки 44.03.05 «Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки)». «Химия. Биология».

УДК 577.2 (075.8)
ББК 28.070я73

Рекомендовано Учебно-методическим советом ГОУ ВО ЛНР «ЛГПУ» в качестве учебного пособия для студентов очной и заочной форм обучения по направлению подготовки 06.03.01 «Биология», профили: «Биомедицина и лабораторная диагностика», «Общая биология»; по направлению подготовки 44.03.05 «Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки)».

«Химия. Биология».

(протокол № 7 от 23.03.2022 г.)

© Криничная Н.В., Воронов М.В., 2022
© ГОУ ВО ЛНР «ЛГПУ», 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Раздел I. Молекулярная биохимия	5
Тема 1. Биополимеры клетки как объекты изучения молекулярной биологии	5
Тема 2. Репликация молекулы ДНК	16
Тема 3. Формы ДНК	21
Тема 4. Теломеры ДНК как индикатор биологического возраста	23
Тема 5. Синтез белка. Регуляция биосинтеза белка	28
Тема 6. Строение и экспрессия генов в клетках прокариот и эукариот	33
Тема 7. Нуклеосома, хроматин, хромосома	41
Раздел II. Молекулярные основы генетической инженерии	46
Тема 8. Полимеразная цепная реакция	46
Тема 9. Секвенирование биополимеров	52
Тема 10. Генная терапия	60
Тема 11. Горизонтальный перенос генов	62
Тема 12. Особенности молекулярного клонирования	68
Практикум	77
Темы рефератов	101
Методические рекомендации для написания реферата	103
Задания для самостоятельной работы	105
Глоссарий	106
Список рекомендованной литературы	112
Заключение	114
Приложения	115

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярная биология – это наука о механизмах хранения, воспроизведения, передачи и реализации генетической информации, о структуре и функциях биополимеров – нуклеиновых кислот и белков. Является комплексной наукой, основу которой составляют биохимия, генетика и биоинформатика. Одни из важнейших её разделов – генная инженерия и молекулярная медицина.

Начав с изучения биологических процессов на молекулярно-атомном уровне, молекулярная биология перешла к сложным надмолекулярным клеточным структурам и в настоящее время успешно решает проблемы генетики, физиологии, эволюции и медицины.

Важной областью прикладного использования достижений молекулярной биологии является генетическая инженерия, разрабатывающая методы конструирования наследственных структур в виде рекомбинантных молекул ДНК. Целенаправленное изменение структуры генов и их регуляторных областей и введение таких генов в бактериальные, животные и растительные клетки позволило создавать трансгенные организмы с новыми свойствами. Возможность направленного и контролируемого изменения наследственного аппарата обуславливает важное практическое значение молекулярной биологии в развитии различных разделов медицины.

В учебное пособие включены краткие сведения о строении молекул генетического аппарата клетки и их функциях, молекулярных механизмах генетических процессов, синтезе и функциях нуклеиновых кислот и белков.

Пособие содержит максимальное количество иллюстраций, облегчающих восприятие непростых молекулярно-биологических терминов.

РАЗДЕЛ I. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОХИМИЯ

Тема 1: БИОПОЛИМЕРЫ КЛЕТКИ КАК ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Клетка – это элементарная единица строения и жизнедеятельности всех организмов; по существу – элементарная единица живого. Живые организмы обладают рядом признаков, отсутствующих у большинства неживых тел, но среди них нет ни одного такого, который бы был присущ только живому. Единственный способ описать жизнь – это перечислить основные свойства (критерии) живого.

Критерии живого:

- 1) обмен веществ;
- 2) высокоупорядоченное строение;
- 3) активно реагируют на окружающую среду;
- 4) развиваются;
- 5) размножаются;
- 6) адаптированы к окружающей среде;
- 7) живые организмы обладают генетическим материалом, который передают потомкам.

Современная формулировка клеточной теории:

- 1) клетка – основная единица строения и развития всех живых организмов; наименьшая единица живого;
- 2) клетки всех одноклеточных и многоклеточных организмов сходны по своему строению, ассимиляционному составу, основным проявлениям жизнедеятельности и обмену веществ;
- 3) размножение клеток происходит путём их деления, и каждая новая клетка образуется в результате деления исходной (материнской) клетки;
- 4) в сложных многоклеточных организмах клетки специализированы по выполняемым ими функциям и образуют ткани; из тканей состоят органы, которые тесно связаны между собой и подчинены нервным и гуморальным системам регуляции.

Органические вещества клетки

Из простых органических молекул синтезируются более крупные макромолекулы. Макромолекула – это крупная молекула, построенная из многих повторяющихся единиц. Она представляет собой полимер, состоящий из мономеров.

Органическими называют молекулы, в состав которых входят углерод и водород. Некоторые из них очень большие и сложные. Поэтому в органической химии принято выделять внутри молекул характерные, часто встречающиеся группы атомов, – функциональные группы. Каждая функциональная группа придаёт молекулам, в составе которых она встречается, определенные свойства. Поэтому удобно дать определенное название любым молекулам, в которых есть данная функциональная группа. Кроме углерода и водорода, в органических молекулах часто встречаются кислород (O), азот (N), сера (S) и фосфор (P).

Основные органические вещества клетки представлены в табл. 1

Таблица 1

Полимеры и их мономеры, входящие в состав клеток

<i>Полимеры</i>	<i>Мономеры</i>
Белки	Аминокислоты
Углеводы	Моносахариды
Жиры	Глицерин и жирные кислоты
Нуклеиновые кислоты:	Нуклеотиды
РНК	Нуклеотиды РНК (урацил, аденин, гуанин, цитозин)
ДНК	Нуклеотиды ДНК (тимин, аденин, гуанин, цитозин)

Опишем их подробнее:

1) **жиры** – это низкомолекулярные вещества с гидрофобными свойствами, состоят из глицерина и жирных кислот.

Функции жиров:

1) строительная – входят в состав мембран, обеспечивая их полупроницаемость;

2) энергетическая – при расщеплении 1 г жира выделяется 38,9 кдж энергии;

- 3) теплорегуляционная;
- 4) источник воды в животных организмах;
- 5) жиры – главная форма хранения энергии, т.к. они могут храниться в концентрированном виде, без воды.

2) **углеводы** – биологические полимеры, мономером является глюкоза. Классификация углеводов: а) моносахариды: глюкоза (виноградный сахар), фруктоза (плодовый сахар), галактоза, рибоза, дезоксирибоза; б) дисахариды: сахароза (свекловичный сахар), мальтоза (молочный сахар); в) полисахариды: инулин, пектины, крахмал, клетчатка, хитин, гликоген (рис. 1).



Рис. 1. Классификация углеводов

Функции углеводов:

- 1) энергетическая – при полном расщеплении 1 г выделяется 17,6 кДж энергии;
- 2) Строительная – входит в состав мембран и оболочек;
- 3) запасующая (гликоген, крахмал);
- 4) рибоза и дезоксирибоза входят в состав нуклеиновых кислот (РНК и ДНК).

3) **белки** – полипептиды, которые составляют 50–80% всех органических веществ в клетке. В живых организмах аминокислотный состав белков определяется генетическим кодом, при синтезе в большинстве случаев используется 20 стандартных аминокислот (Приложение 1). Мономерами белков являются аминокислоты. **Пептидная связь** – это связь между двумя аминокислотами, возникающая при взаимодействии карбоксильной группы одной аминокислоты и аминогруппы другой аминокислоты. Простые белки при расщеплении разлагаются только на аминокислоты, сложные белки при расщеплении кроме аминокислот образуют вещества небелковой природы (нуклеопротеиды, гликопротеиды).

Пространственная структура белков:

1) первичная структура белка – это последовательность аминокислот;

2) вторичная структура – это спираль, поддерживаемая водородными связями;

3) третичная структура – пространственная конфигурация белка, специфичная для каждого белка;

4) четвертичная структура – один из способов укладки в пространстве отдельных полипептидных цепей. Например, у некоторых белков (гемоглобин) пространственная структура состоит из нескольких полипептидных цепей (рис. 2).

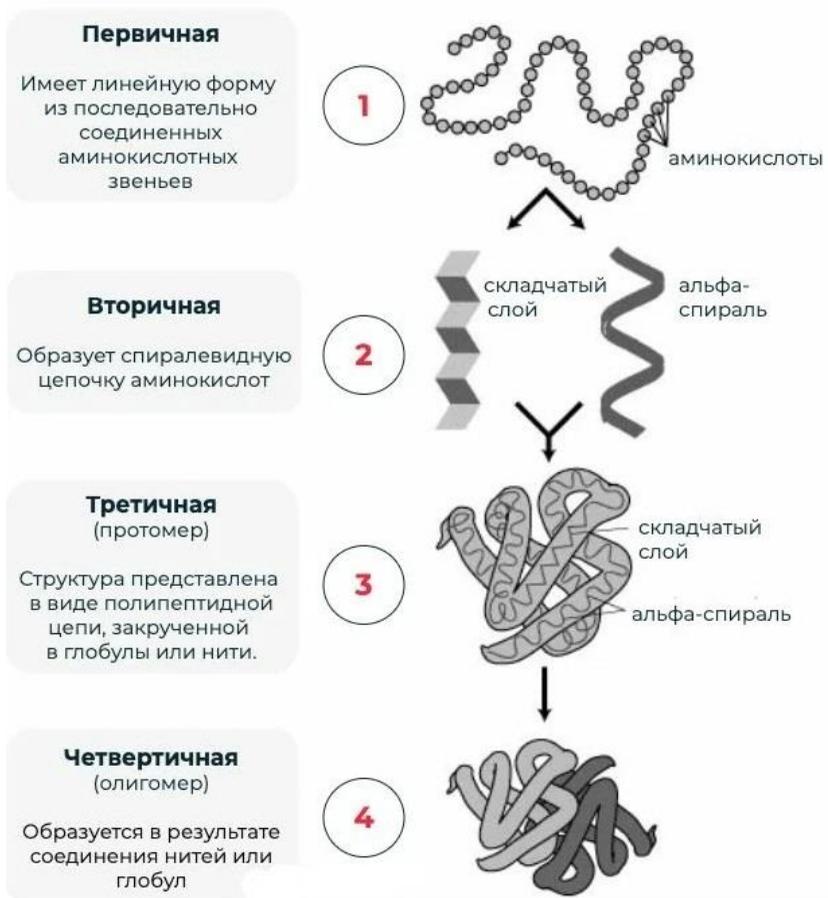


Рис. 2. Пространственная структура белка

Денатурация – это процесс разрушения нативной (природной) структуры белка. Репарация бывает полная: необратимая (всех структур) и частичная – обратимая (первичная структура сохраняется). **Ренатурация** – восстановление пространственной структуры белка.

Основные функции белков представлены в табл. 2.

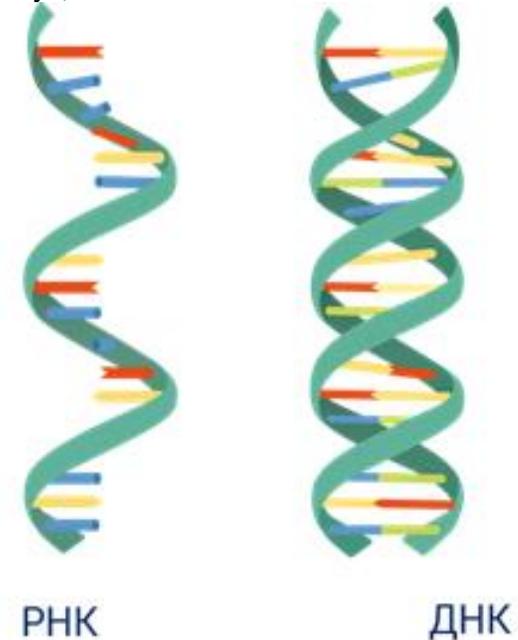
Основные функции белков

№ п/п	Функции белков	Примеры белков, выполняющих различные функции
1	Строительная	Белки, входящие в состав всех мембранных структур.
2	Каталитическая	Ферменты – это белки. Фермент каталаза – ускоряет распад перекиси водорода; фермент амилаза – ускоряет расщепление крахмала до глюкозы.
3	Сигнальная	Мембранные белки обеспечивают приём сигналов и передачу команд в клетку.
4	Двигательная	Актин, миозин – белки, обеспечивающие мышечное сокращение
5	Транспортная	Гемоглобин транспортирует сывороточный альбумин, переносит молекулы жирных кислот.
6	Защитная	Антитела – вырабатываются при проникновении в организм чужеродных белков.
7	Энергетическая	При полном расщеплении 1 г белков выделяется 17,6 кДж энергии.
8	Механическая	Белок-кератин – главный компонент волос, ногтей; коллаген – главный компонент сухожилий, связок, хряща.

Ферменты – это сложные белковые соединения, ускоряющие химические реакции в живых клетках. Они способны увеличивать реакции в миллионы и миллиарды раз. Молекулы одних ферментов состоят только из белков, других из двух частей. Анофермент (белковая часть) + кофермент (небелковая). Коферментами могут быть разные химические вещества в том числе и витамины. Ферменты: амилазы, липазы, пептидазы. **Активный центр фермента** – участок, обеспечивающий его каталитическую активность. Активность фермента зависит от различных факторов: температура, кислотность. Большинство

ферментов работают в нейтральной среде (НО! пепсин, амилаза активны в слабощелочной среде).

4) нуклеиновые кислоты. Нуклеиновые кислоты (НК) получили своё название исходя из места их наибольшей концентрации – в ядрах клеток их наибольшее количество. Ядро – от латинского «нуклеус», поэтому и кислоты называют **нуклеиновыми**. В природе встречаются два типа нуклеиновых кислот: РНК и ДНК (рис. 3). НК различаются по составу и строению молекул, а также по выполняемым в клетке функциям.



РНК

ДНК

Рис. 3. Строение молекул РНК и ДНК

Помимо ядра, нуклеиновые кислоты также есть в цитоплазме, митохондриях и пластидах.

Нуклеиновые кислоты – это полимеры, которые состоят из мономеров – **нуклеотидов**. Нуклеотиды состоят из пятиуглеродного сахара – пентозы (в нуклеиновых кислотах два вида пентоз – рибоза и дезоксирибоза), азотистого основания и остатка фосфорной кислоты.

В зависимости от углеводного компонента нуклеотидов различают два класса нуклеиновых кислот: рибонуклеиновые кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК).

Название кислот обусловлено тем, что молекула РНК содержит **рибозу**, а ДНК содержит **дезоксирибозу**.

Азотистые основания, входящие в состав нуклеиновых кислот:

1) пуриновые – аденин *A*, гуанин *G*; 2) пиримидиновые – тимин *T*, цитозин *C*, урацил *U*.

Латинские и русские коды для нуклеиновых оснований:

A – А: аденин;

G – Г: гуанин;

C – Ц: цитозин;

T – Т: тимин, не встречается в РНК;

U – У: урацил, не встречается в ДНК.

Для определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК используют секвенирование. В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейных молекул ДНК и РНК в виде последовательности мономеров (нуклеотидов) в текстовом виде.

Остаток фосфорной кислоты (PO₄), связанный с пятым атомом углерода в пентозе, может соединяться ковалентной связью с гидроксильной группой возле третьего атома углерода другого нуклеотида.

ДНК

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; двойная полинуклеотидная цепь, свёрнутая правозакрученной спиралью. Состав и строение молекулы ДНК представлены в табл. 3.

Таблица 3

Состав молекулы ДНК

<i>Азотистые основания</i>	<i>Углевод</i>	<i>Нуклеотиды</i>
аденин, тимин, гуанин, цитозин	дезоксирибоза (C ₅ H ₁₀ O ₄)	адениловый, тимидиловый, гуаниловый, цитидиловый

Длина одного нуклеотида – 0,34 Нм. Молекулярная масса – 345. На одном витке ДНК – 10 нуклеотидов.

Пары нуклеотидов аденин и тимин, а также гуанин и цитозин строго соответствуют друг другу и являются дополнительными (пространственное взаимное соответствие), или **комплементарными**.

Комплементарность – это способность нуклеотидов к избирательному соединению друг с другом. *Правило Чаргаффа*: суммарное количество пуриновых оснований равно сумме пиримидиновых оснований $A = T$, $G \equiv C$. *Принцип комплементарности*: цепи молекулы ДНК соединяются друг с другом по принципу комплементарности. Комплементарные основания $A = T$, $G \equiv C$ соответствуют друг другу по химическому строению и пространственной структуре и подходят друг другу «как ключ к замку». Между азотистыми основаниями связи водородные, причём между А и Т связь двойная, а между Г и Ц – тройная. Ширина цепи ДНК – 2 нм, а длина может достигать тысяч нм.

Направленность молекулы ДНК

На одном конце нуклеотидной цепочки располагается фосфат, он связан с пятым атомом пентозы, этот конец называют 5' (пять штрих) конец. На другом конце, около третьего атома углерода, находится 3' (три штрих) конец (рис. 4).

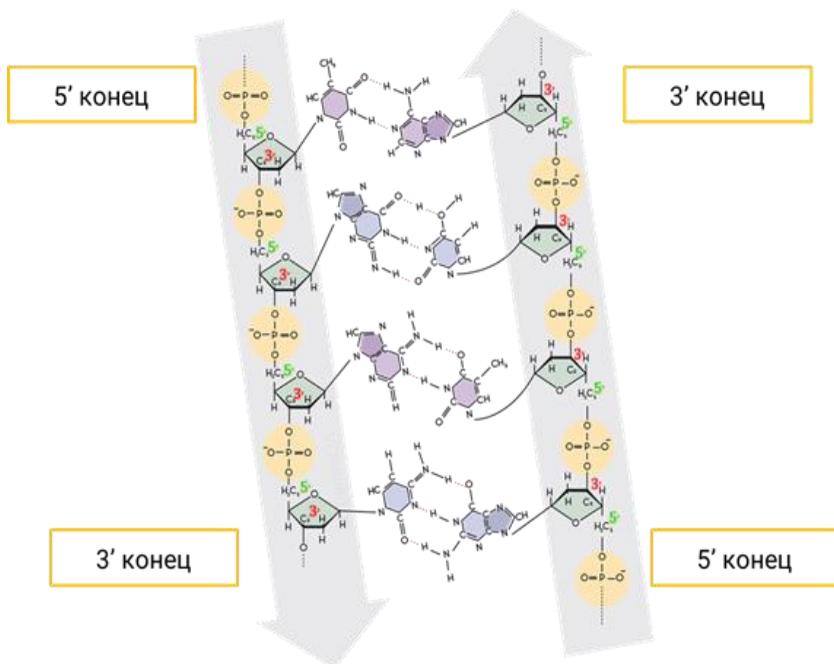


Рис. 4. Направленность молекулы ДНК

При соединении двух нуклеотидов между углеродом остатка сахара одного нуклеотида и остатком фосфорной кислоты другого возникает **сложноэфирная связь**. Таким образом, остатки сахаров двух нуклеотидов оказываются связаны **фосфодиэфирными мостиками**.

РНК

РНК (рибонуклеиновая кислота) – одинарная полинуклеотидная цепочка; не способна к самоудвоению (табл. 4)

Таблица 4

Состав молекулы РНК

Азотистые основания	Углевод	Нуклеотиды
аденин, урацил, гуанин, цитозин	рибоза ($C_5H_{10}O_5$)	адениловый, уридилловый, гуаниловый, цитидиловый

Местоположение РНК: т-РНК (транспортная РНК) и и-РНК (информационная РНК) могут находиться в цитоплазме, митохондриях и пластидах, р-РНК (рибосомальная РНК) – в рибосомах, в том числе в рибосомах митохондрий и пластид. Все виды РНК синтезируются в ядре, и, следовательно, некоторое время в нём присутствуют. Функции РНК: 1) и-РНК передаёт наследственную информацию о структуре белка (от хромосом к рибосомам); 2) т-РНК транспортирует аминокислоты; 3) р-РНК входит в состав рибосом, участвует в биосинтезе белка (табл. 5).

Таблица 5

Характеристика основных типов ДНК

Тип РНК	Особенности строения	Функции
Информационная, или матричная, РНК (иРНК, или мРНК)	Одинарная цепочка	Переносит информацию о последовательности аминокислот в белковых молекулах от ДНК к месту синтеза белков
Рибосомальная РНК (рРНК)	Одинарная цепочка имеет сложную форму, образует комплексы с белками (нуклеопротеиды)	Входит в состав рибосом, которые осуществляют синтез белков
Транспортная РНК (тРНК)	Одинарная цепочка, различные участки которой взаимодействуют между собой и образуют сложную пространственную форму	Доставляет к месту синтеза белков аминокислоты, содержащиеся в цитозоле клетки
Малые ядерные РНК (мяРНК)	Одинарные цепочки. Небольшие по размеру молекулы, находящиеся в ядре клетки. Существует несколько их разновидностей. Обычно образуют комплексы с белками	Участвуют в процессах созревания РНК и регуляции процессов транскрипции

Тема 2: РЕПЛИКАЦИЯ МОЛЕКУЛЫ ДНК

Репликация – это сложный процесс самоудвоения молекулы ДНК, идущий с участием различных ферментов (например, ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы, хеликазы и т. д.) (рис. 5, 6).

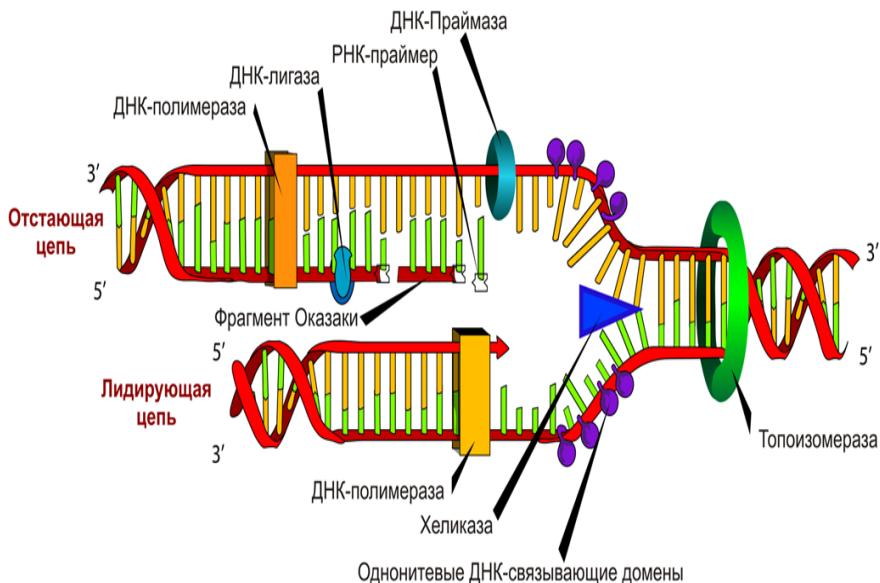


Рис. 5. Репликация молекулы ДНК

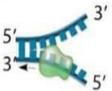
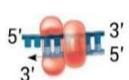
Белок	Функция
<p>Хеликаза</p> 	<p>Раскручивает материнскую двойную спираль в репликационной вилке</p>
<p>SSB-белок</p> 	<p>Связывает и стабилизирует одноцепочечную ДНК во время её функционирования в качестве матрицы</p>
<p>Топоизомераза</p> 	<p>Снимает топологическое напряжение, связанное с избыточным скручиванием спирали ДНК перед репликационной вилкой, разрывая, прокручивая и вновь сшивая цепи ДНК</p>
<p>Праймаза</p> 	<p>Синтезирует РНК-праймер на 5'-конце лидирующей цепи и на 5'-конце каждого фрагмента Оказаки отстающей цепи</p>
<p>ДНК полимераза III</p> 	<p>Используя материнскую ДНК в качестве матрицы, синтезирует новую цепь ДНК, добавляя нуклеотиды к РНК-праймеру или к существующей цепи ДНК</p>
<p>ДНК полимераза I</p> 	<p>Удаляет рибонуклеотиды РНК-праймера с 5'-конца и замещает их на дезоксирибонуклеотиды</p>
<p>ДНК-лигаза</p> 	<p>Сшивает между собой фрагменты Оказаки отстающей цепи; на лидирующей цепи сшивает 3'-конец ДНК, которая замещает праймер, с остальной частью лидирующей цепи</p>

Рис. 6. Ферменты репликации

Способность к самоудвоению (воспроизведение точных копий исходной молекулы) – уникальное свойство молекулы ДНК. Благодаря этой способности молекулы ДНК, осуществляется передача наследственной информации от материнской клетки дочерним во время деления.

Репликация осуществляется полуконсервативным способом – согласно гипотезе Уотсона-Крика, каждая из цепей двойной спирали ДНК служит матрицей для репликации комплементарных дочерних цепей.

Раскручивание молекулы происходит на небольшом отрезке (это несколько десятков нуклеотидов), называемом *репликативной вилкой* (рис. 7).

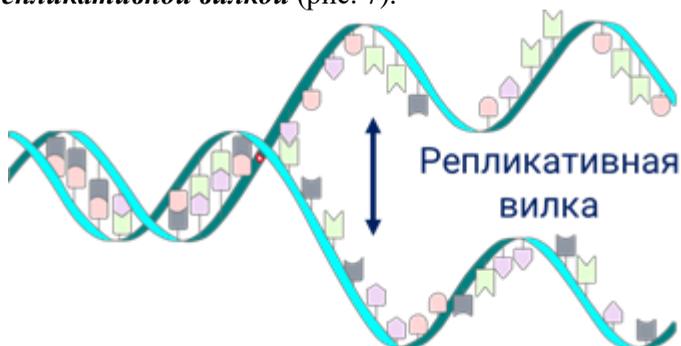


Рис. 7. Схема репликативной вилки

Около каждой цепи, выступающей в роли матрицы, по принципу комплементарности достраивается новая цепь (цепь) (рис. 8).

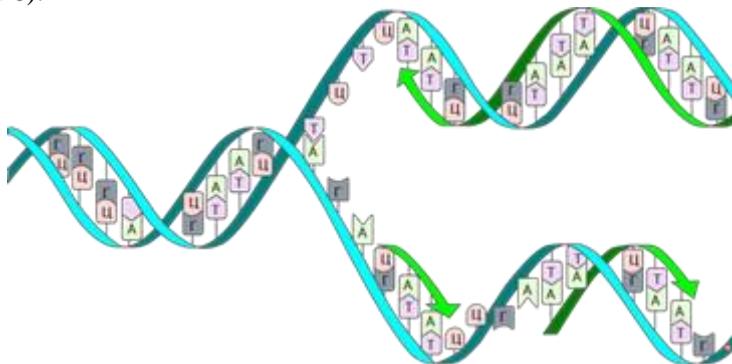


Рис. 8. Схема движения ДНК-полимеразы

В каждой дочерней ДНК одна цепь является *материнской*, а вторая – вновь синтезированной – *дочерней*.

После окончания синтеза дочерних цепей ДНК раскручивается новый отрезок и цикл репликации повторяется. Таким образом, репликативная вилка перемещается вдоль молекулы, пока не дойдёт до точки окончания синтеза.

Механизм репликации

В репликации участвуют 5 различных белков. Все вместе они образуют так называемую *репликативную вилку*. Репликативная вилка постепенно движется вдоль молекулы ДНК, оставляя позади две новые молекулы ДНК. Первой движется хеликаза. Она разъединяет две нуклеотидные цепочки ДНК. На образовавшиеся одноцепочечные участки немедленно «налипают» стабилизирующие белки. Стабилизирующие белки не дают двум комплементарным друг другу цепочкам ДНК вновь соединиться позади хеликазы. Следом за хеликазой по одной из цепей (она называется лидирующая цепь) движется ДНК-полимераза в направлении к 5'-концу. Она синтезирует новую цепочку нуклеотидов ДНК, комплементарную лидирующей цепи, присоединяя нуклеотиды ДНК к 3'-концу. По второй цепи ДНК (отстающая цепь) ДНК-полимераза ползёт в противоположном направлении (тоже в направлении к 5'-концу). Но при этом получается, что отстающая цепь изготавливается по частям: ДНК-полимераза всякий раз движется от хеликазы назад, к началу предыдущего кусочка, и отделяется от ДНК, оставив пробел (всего одну разомкнутую связь между соседними нуклеотидами) между концом только что изготовленного кусочка и началом предыдущего. Эту недостающую связь образует специальный белок ДНК-лигаза.

Репликация идёт в направлении от 5'-конца новой молекулы к 3'-концу или от 3'-конца к 5'-концу матричной ДНК.

Характеристики процесса репликации:

1) матричный – последовательность синтезируемой цепи ДНК однозначно определяется последовательностью материнской цепи в соответствии с принципом комплементарности;

2) полуконсервативный – одна цепь молекулы ДНК, образовавшейся в результате репликации, является вновь синтезированной, а вторая – материнской;

3) идёт в направлении от 5'-конца новой молекулы к 3'-концу;

4) полунепрерывный – одна из цепей ДНК синтезируется непрерывно, а вторая – в виде набора отдельных коротких фрагментов (фрагментов Оказаки);

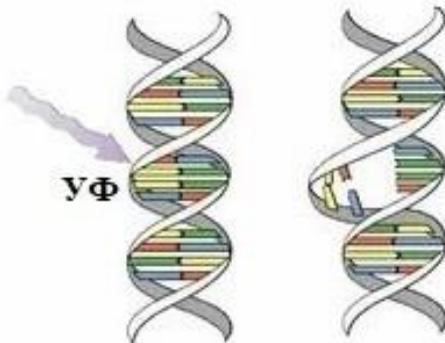
5) начинается с определённых участков ДНК, которые называются сайтами инициации репликации (англ. *origin*).

Репарация ДНК

Репарация – особая функция клеток, позволяющая исправлять химические повреждения и разрывы в молекулах ДНК. Осуществляется специальными ферментными системами клетки.

Источники повреждения ДНК: ультрафиолетовое излучение, радиация, химические вещества, ошибки репликации ДНК, апуринизация – отщепление азотистых оснований от сахарофосфатного остова, дезаминирование – отщепление аминогруппы от азотистого основания.

Основные типы повреждения ДНК: повреждение одиночных нуклеотидов, повреждение пары нуклеотидов, двухцепочечные и одноцепочечные разрывы цепи ДНК, образование поперечных сшивок между основаниями одной цепи или разных цепей ДНК (рис. 9).



Меланома — одна из злокачественных опухолей кожи

Пиримидиновые димеры вызывают локальные конформационные нарушения в структуре ДНК

Рис. 9. Болезни, связанные с дефектами системы репарации ДНК

Тема 3: ФОРМЫ ДНК

ДНК может формировать несколько типов двойных спиралей. Структурные формы ДНК, зависят от насыщения водой молекулы нуклеиновой кислоты, содержания солей и последовательности нуклеотидов в конкретном участке (рис. 10).

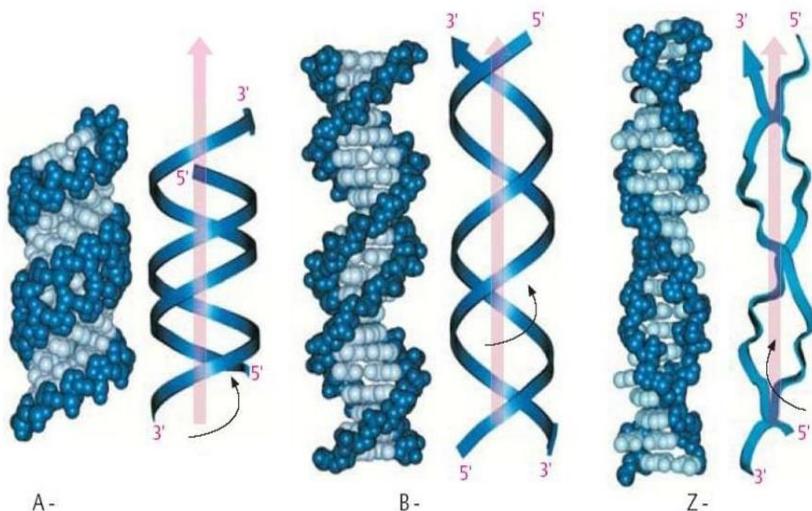


Рис. 10. Формы ДНК

А-ДНК – такая форма ДНК, которая возникает при низкой гидратации и при повышенной ионной концентрации натрия и калия. А-форма – это правозакрученная спираль с 11 комплементарными парами оснований в каждом витке. Диаметр её составляет 2,3 нм. Плоскости, образуемые спаренными основаниями, имеют наклон 20° по отношению к оси молекулы. Соседние нуклеотиды расположены в цепочках компактно – между ними всего 0,26 нм. Нуклеотиды в ней расположены не перпендикулярно оси симметрии спирали, а под углом: если в В-ДНК нуклеотиды обычно изображают горизонтальными черточками, в А-ДНК их следовало бы рисовать косыми.

Форма В-ДНК. При малом содержании солей и высокой степени гидратации, то есть в нормальных физиологических условиях, ДНК принимает свою главную форму – В. Природные молекулы существуют, как правило, в В-форме. Именно она лежит

в основе классической модели Уотсона-Крика и чаще всего изображается на иллюстрациях. В-вариант действительно встречается в клетке гораздо чаще, и сейчас его считают основной формой существования ДНК, а все отклонения часто обозначают общим термином «не-В-ДНК».

В-ДНК, как правило, скручена чуть сильнее, чем предсказывали Уотсон и Крик, и среднее число нуклеотидов на виток спирали в ней – не 10 и не 11, а около 10,5. Кроме того, отдельные пары нуклеотидов постоянно отклоняются от положенной «горизонтали» поэтому спираль никогда не бывает абсолютно гладкой и ровной – то тут, то там по ее бокам торчат шероховатости: концы нуклеотидов под разными углами.

Z-ДНК – одна из многих возможных структур двойной спирали ДНК, представляет собой левозакрученную двойную спираль (в отличие от правозакрученной, как наиболее распространённая форма В-ДНК). *Z-ДНК* является одной из трёх биологически активных двойных спиральных структур ДНК, наряду с А-ДНК и В-ДНК, хотя точные её функции к настоящему моменту не определены.

Основные характеристики *Z-ДНК*: 12 нуклеотидов на виток, еще тоньше, чем В-ДНК и закрученная не вправо, а влево. Торчащие на её поверхности фосфатные группы образовывали не плавную спираль, а зигзаг, поэтому новый вариант назвали *Z-формой*.

Поэтому ДНК часто принимает *Z-форму* при транскрипции генов. Более того, чем больше при этом *Z-ДНК*, тем активнее идет транскрипция. Гистоны с *Z-ДНК* связаться не могут, поэтому полимеразе никто не мешает работать. И этим активно пользуются опухолевые клетки, у которых левозакрученная спираль вовремя возникает перед нужными им генами (табл. 6).

Таблица 6

Характеристика некоторых форм ДНК

<i>Тип спирали</i>	<i>A-</i>	<i>B-</i>	<i>Z-</i>
Шаг спирали	3,2 нм	3,38 нм	4,46 нм
Закрученность спирали	Правая	Правая	Левая
Число пар оснований на виток	11	10	12
Расстояние между плоскостями оснований	0,26 нм	0,34 нм	0,37 нм
Диаметр спирали	2,3 нм	2,0 нм	1,8 нм

Смысловыми участками ДНК принято считать области, которые копируются молекулами и-РНК. Часть ДНК, которая не копируется молекулами РНК, считается информационно бессмысленной (интроны). В целом считается, что последовательность интронов является участком ДНК без определенной функции. Однако сейчас это подвергается сомнению: известно, что интроны содержат несколько коротких последовательностей, которые важны для эффективного сплайсинга. Точный механизм действия этих интронных энхансер еще недостаточно известен, но считается, что они служат обязательными участками эффективного синтеза белков.

Тема 4:**ТЕЛОМЕРЫ ДНК КАК ИНДИКАТОР
БИОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА**

Теломеры – это концевые участки хромосом. Теломерные участки хромосом характеризуются отсутствием способности к соединению с другими хромосомами или их фрагментами и выполняют защитную функцию. Теломерный участок реплицируется по специфическому механизму.

Длина теломер всегда вызывала и продолжает вызывать много вопросов. У слона она составляет 14 тыс. пар нуклеотидов, а у некоторых линий лабораторных мышей – в 10 раз больше.

Например, у деревьев-долгожителей (более тысячи лет) сосны *Pinus longaeva* и гинкго *Ginkgo biloba* длина теломер составляет, соответственно, около 13 и 5 тыс. пар нуклеотидов. То есть длина теломер и продолжительность жизни не имеют явной

связи. Другой вопрос, что эти организмы имеют активный механизм поддержания теломерных районов – фермент *теломеразу*, способную удлинять спонтанно укорачивающиеся при делении клетки теломерные участки ДНК.

Тем не менее, вследствие этого явления теломеры должны укорачиваться весьма медленно – по несколько (3–6) нуклеотидов за клеточный цикл, то есть за количество делений, соответствующее пределу Хейфлика (см. ниже), они укоротятся всего на 150–300 нуклеотидов.

ДНК-полимераза не может начинать цепочку ДНК, для этого существует фермент праймаза, который на матрице ДНК синтезирует РНК-фрагмент (праймер, 10–20 нуклеотидов), от 3'-конца которого начинает работать ДНК-полимераза. Праймер затем удаляется, а это место достраивается ДНК-полимеразой следующего по счету фрагмента Оказаки. На конце хромосомы у последнего фрагмента Оказаки нет «следующего», поэтому некому достроить ДНК на пустом месте, получившемся после удаления праймера. Поэтому после каждой репликации у дочерних хромосом укорачиваются оба 5'-конца (концевая недорепликация).

Теломеры не несут наследственной информации. Их укорочение не приносит вреда; у человека они рассчитаны примерно на 60 репликаций. Больше 60 раз (число Хейфлика) клетки человека поделиться не могут, поскольку концевая недорепликация начинает затрагивать гены. Рождается человек с длиной теломер 15–20 тыс. пар нуклеотидов, а умирает с длиной 5–7 тыс.

Стволовые клетки (в коже, красном костном мозге, семенниках) должны делиться гораздо больше, чем 60 раз. Поэтому в них функционирует фермент теломеразы, который после каждой репликации удлиняет теломеры.

В клетках человека теломеры обычно представлены одноцепочечной ДНК и состоят из несколько тысяч повторяющихся единиц **последовательности ТТАГГГ**. Поскольку репликация ДНК не может начаться с самого конца линейной молекулы, при репликации хромосомы количество повторов в теломере снижается.

Со временем короткие повторы стали называть согласно таксономической группе, у которой они впервые были прочитаны. В результате ТТАГГГ стал «позвоночным» или «человеческим»

типом теломер, ТTAGG – «артроподным», ТTAGGC – «нематодным», а ТТTAGGG – «арабидопсисным» – по названию растения *Arabidopsis thaliana*.

Структура теломер у большинства эукариот высококонсервативна и представляет собой короткие прямые повторы, богатые G (на 3'-конце) и C (в комплементарной цепи). Например, теломерная ДНК человека состоит из 5 000–15 000 пар оснований повторяющихся гексамеров ТTAGGG, следующих за одноцепочечным выступом размером 100–400 нуклеотидов на 3'-конце G-богатой цепи (рис. 11).

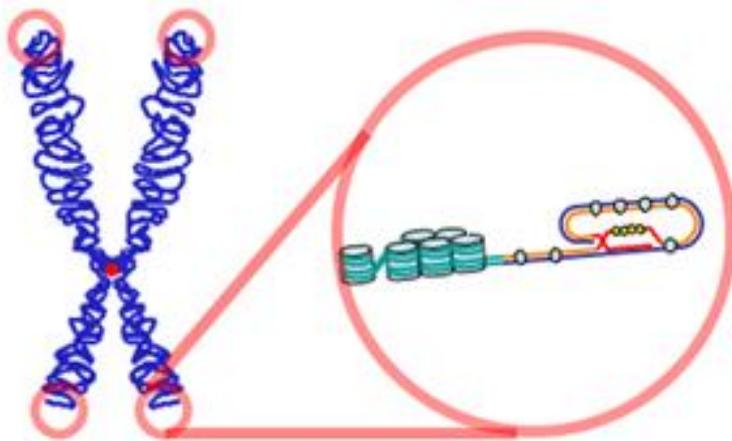


Рис. 11. Структура теломеры

Одноцепочечный 3'-выступ может быть также спрятан в специализированном участке теломерной ДНК – в так называемой Т-петле. Т-петля формируется путем сворачивания 3'-выступа в двухцепочечную ДНК. Структура Т-петли напоминает промежуточный продукт гомологичной рекомбинации. Поэтому неудивительно, что белки гомологичной рекомбинации ДНК – Rad54 и Rad51D играют важную роль в кепировании (покрыве) теломер и регуляции их длины.

Хромосома эукариот образуется из единственной и чрезвычайно длинной молекулы ДНК, которая содержит линейную группу множества генов. Необходимыми функциональными элементами хромосомы эукариот являются центромера, теломеры и точки инициации репликации. Точки начала репликации (сайты

инициации) и теломеры, находящиеся на концах хромосом, позволяют молекуле ДНК эффективно реплицироваться, тогда как в центромерах сестринские молекулы ДНК прикрепляются к митотическому веретену деления, что обеспечивает их точное расхождение по дочерним клеткам в митозе.

Теломерные повторы – весьма консервативные последовательности, например повторы всех позвоночных состоят из шести нуклеотидов TTAGGG, повторы всех насекомых – TTAGG, повторы большинства растений – TTTAGGG.

Таким образом, теломеры представляют собой своеобразные наконечники на концах хромосом, состоящие из строго определённой последовательности сложных органических соединений – нуклеотидов. При рождении длина таких наконечников составляет 15 тысяч пар нуклеотидов, к пятилетнему возрасту она сокращается до 12 тысяч, а хронические заболевания могут уменьшить размеры *концевых участков хромосом* до 5–2 тысяч пар нуклеотидов.

ДНК-полимераза неспособна синтезировать копию ДНК с самого конца. Она в состоянии лишь добавлять нуклеотиды к уже существующей 3'-гидроксильной группе.

Предел или **лимит Хейфлика** – это граница количества делений соматических клеток, названа в честь её открывателя Леонарда Хейфлика. В 1961 г. Хейфлик наблюдал, как клетки человека, делящиеся в клеточной культуре, умирают приблизительно после 50 делений и проявляют признаки старения при приближении к этой границе. Данная граница была найдена в культурах всех полностью дифференцированных клеток как человека, так и других многоклеточных организмов. Максимальное число делений клетки различно в зависимости от её типа и ещё сильнее различается в зависимости от организма, которому эта клетка принадлежит. Для большинства человеческих клеток предел Хейфлика составляет 52 деления.

Граница Хейфлика связана с сокращением размера теломер – участков ДНК на концах хромосом. Как известно, молекула ДНК способна к репликации перед каждым делением клетки. При этом имеющиеся у неё на концах теломеры после каждого деления клетки укорачиваются. Таким образом, чем короче у ДНК «теломерный хвост», тем больше делений у неё прошло, а значит – тем старше клетка (рис. 12).

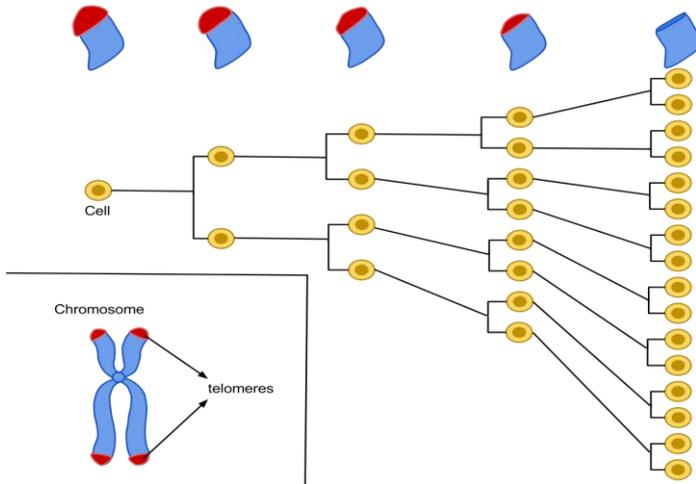


Рис. 12. Предел Хейфлика

В клетке существует фермент теломераза, активность которого может обеспечивать удлинение теломер, при этом удлиняется и жизнь клетки. Клетки, в которых функционирует теломераза (половые, раковые), бессмертны. В обычных (соматических) клетках, из которых в основном и состоит организм, теломераза не работает, поэтому теломеры при каждом делении клетки укорачиваются, что в конечном счёте приводит к её гибели в пределах лимита Хейфлика, потому что другой фермент – ДНК-полимераза – не способен реплицировать концы молекулы ДНК.

Биологический смысл явления

В настоящее время главенствует точка зрения, связывающая лимит Хейфлика с проявлением механизма подавления опухолеобразования, возникшего у многоклеточных организмов. Другими словами, опухолесупрессорные механизмы, такие как репликативное старение и апоптоз, бесспорно полезны в раннем онтогенезе и зрелости, но побочно являются причиной старения – ограничивают продолжительность жизни в результате накопления дисфункциональных стареющих клеток или избыточной гибели функциональных.

Тема 5: СИНТЕЗ БЕЛКА. РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

Синтез – это соединение нескольких молекул в одну более сложную молекулу. **Биосинтез белка** – это сборка его молекулы из молекул аминокислот. Молекулы большинства белков собираются клеткой из 151–300 аминокислот. Для того, чтобы в правильном порядке соединить друг с другом эти аминокислоты, она должна иметь «инструкцию» для сборки каждого белка. В этой роли в клетке выступают молекулы и-РНК. Одной аминокислоте соответствует группа из трёх нуклеотидов – триплет (кодон).

Синтезом белков занимаются рибосомы – очень сложные молекулярные «машины». Каждая рибосома состоит из двух неравных частей. Их называют большая и малая субъединицы. Всего в обеих субъединицах одной рибосомы примерно 80 молекул белков и 4 разных молекулы РНК. Новые субъединицы рибосом образуются в ядрышке. Оттуда они выходят в цитоплазму через ядерные поры.

В цитоплазме обе субъединицы объединяются в целую рибосому на специальном стартовом участке любой молекулы и-РНК. Далее рибосома постепенно движется по всей длине молекулы и-РНК до тех пор, пока не дойдёт до сигнала прекращения синтеза белка – стоп-кодона (УАГ, УГА или УАА). Дойдя до сигнала прекращения синтеза, рибосома сходит с молекулы и-РНК, при этом большая и малая субъединицы отделяются друг от друга и от готового белка.

Аминокислоты к работающей рибосоме приносят специальные молекулы – т-РНК. Различные т-РНК отличаются друг от друга антикодонами – тройками нуклеотидов, расположенными в определенном месте молекулы. В животных клетках обычно обнаруживается 62 типа т-РНК, причём т-РНК каждого типа занимается переноской одной определенной аминокислоты (*обратное неверно*: некоторые аминокислоты переносятся 2–3 типами т-РНК).

Реализация генетического кода в живых клетках, т.е. синтез белков, происходит при помощи двух матричных процессов:

- 1) транскрипция;
- 2) трансляция.

Транскрипция (переписывание) – первый этап реализации генетической информации, заключается в синтезе и-РНК на соответствующем участке ДНК. ДНК в ядре находится в виде комплекса с белками-гистонами. Гистоны обеспечивают структурную организацию хромосомы, а также являются репрессорами, т.к. препятствуют считыванию генетической информации с ДНК.

Начало считывания генетической информации связано с освобождением определённого гена от гистонов. Это происходит при помощи ферментов. Ферменты могут узнавать определённые гены и прикрепляться к ним. В прикрепившихся молекулах белка происходит фосфорилирование и они приобретают отрицательный заряд, благодаря чему вступают во взаимодействие с положительно заряженными гистонами и сползают с ними с ДНК. С освободившегося гена начинается переписывание информации, т.е. **транскрипция**.

Транскрипция – второй этап реализации генетической информации. Существовало мнение, что и-РНК комплементарна ДНК, которая служит матрицей для синтеза белка. Однако в настоящее время доказано, что комплементарной ДНК является только молекула-предшественник и-РНК – про-и-РНК. Синтез молекул про-и-РНК происходит под действием специального фермента – РНК-полимеразы. Этот фермент расплетает двойную спираль ДНК и копирует одну из её цепей в соответствии с принципом комплементарности. По мере движения РНК-полимеразы, растущая цепь РНК отходит от матрицы и двойная спираль ДНК позади фермента восстанавливается. Участок ДНК, на котором начинается транскрипция называется *промотором*, а участок, где заканчивается процесс, называется *терминатором*. Молекула про-и-РНК гораздо длиннее зрелой и-РНК. В процессе созревания и-РНК у бактерий происходит отщепление концов молекул. У молекул эукариот созревание происходит иначе: молекула про-и-РНК содержит в себе ряд инертных участков, не кодирующих аминокислоты, или *интронов*. В процессе созревания специальные ферменты вырезают интроны и сшивают оставшиеся участки. Процесс, связанный с созреванием про-и-РНК, называется **процессингом**. Он происходит в ядре и во время перехода и-РНК в цитоплазму.

В одной клетке в среднем около десяти тысяч разных белков, так что каждая клетка должна иметь целую «библиотеку» «инструкций по сборке» этих белков. Информация об аминокислотном составе белков хранится и передаётся по наследству от материнской клетки дочерним в виде молекул другой нуклеиновой кислоты – ДНК. Гигантские (т. е. очень длинные) молекулы ДНК, хранятся в ядре клетки. По мере надобности специальный белок (РНК-полимераза) строит рядом с нужным участком ДНК молекулу РНК, комплементарную одной из двух цепочек ДНК. При этом РНК-полимераза узнаёт определенный участок ДНК – промотор, присоединяется сначала к нему, а затем начинает синтез РНК с точки, удаленной от промотора на определенное расстояние. Сразу после промотора обычно располагается *оператор* – участок, к которому могут прикрепляться различные регуляторные белки. Некоторые из них (репрессоры) мешают РНК-полимеразе прикрепляться к промотору. Другие (активаторы), наоборот, как бы делают промотор для РНК-полимеразы более липким. Далее располагается участок, РНКовую копию которого синтезирует РНК-полимераза (он называется «ген»), и, наконец, *терминатор* – это сигнал остановки транскрипции. Весь описанный участок ДНК, состоящий из промотора, оператора, гена и терминатора транскрипции, называется *оперон*.

Оперон – это функциональная система хромосомы, на которой синтезируется одна и-РНК и которая контролируется одним репрессором. Оперон состоит из одного гена-оператора, гена-промотора, гена-терминатора и нескольких структурных генов. Опероны характерны для клеток прокариот.

Начиная транскрипцию, РНК-полимераза разъединяет две комплементарные цепочки ДНК на небольшом участке, синтезирует из нуклеотидов кусочек РНК, комплементарный одной из цепочек ДНК, а затем начинает двигаться, одновременно разъединяя перед собой цепи ДНК, присоединяя новые нуклеотиды к 3'-концу кусочка РНК и вновь соединяя цепи ДНК позади себя. При этом за работающей РНК-полимеразой тянется «хвост» из свежесинтезированной РНК.

Любая молекула РНК до выхода из ядра наружу проходит *сплайсинг*, то есть специальные белки вырезают из неё ненужные участки. Это означает, что участок ДНК, с которого считана

молекула РНК, содержит бессмысленные участки – *интроны*. «Осмысленные» участки ДНК, копии которых не вырезаются при сплайсинге РНК, называются *экзонами*.

Новая молекула и-РНК выходит из ядра в цитоплазму, там на неё оседают субъединицы рибосом и начинают синтез молекул, закодированных в ней белков. Обычно в цитоплазме имеется небольшое количество пищеварительных ферментов – рибонуклеаз, разрушающих молекулы РНК. Они свободно перемещаются по цитоплазме, и каждая молекула и-РНК рано или поздно встречается с таким ферментом, «разрезающим» её на отдельные нуклеотиды. На этом деятельность этой молекулы и-РНК заканчивается и синтез на ней белков прекращается.

Трансляция – второй этап реализации генетической информации. Она заключается в синтезе полипептидной цепи на матрице и-РНК. В трансляции кроме и-РНК участвуют рибосомы и т-РНК. Молекулы т-РНК имеют два активных центра. К одному из них прикрепляются молекулы аминокислот. Прикрепление происходит с участием АТФ особыми ферментами. Второй активный центр состоит из трёх нуклеотидов и называется **антикодоном**. Антикодон может взаимодействовать с комплементарным кодоном на молекулах и-РНК и передавать соответствующую аминокислоту для синтеза белка.

Трансляция состоит из нескольких этапов:

- 1) инициация – начало синтеза молекулы белка;
- 2) элонгация – удлинение комплементарной цепи;
- 3) терминация – окончание синтеза молекулы белка.

На этапе инициации меньшая субъединица рибосомы, а также инициаторная РНК «узнают» кодон-инициатор. После этого присоединяется большая субъединица рибосомы и начинается собственно синтез белка. В функциональном центре рибосом одновременно находятся два триплета. Молекулы т-РНК присоединяются антикодонами к соответствующим по принципу комплементарности кодоном и-РНК. Между аминокислотами возникает пептидная связь. Разрушается пептидная связь между первой аминокислотой и её т-РНК, которая удаляется, а дипептид остаётся связанным со второй т-РНК. Рибосома перемещается на один кодон по мере продвижения рибосомы по молекуле и-РНК. Эти процессы повторяются, т.е. происходит элонгация. При узнавании кодонов-терминаторов ферменты катализируют

освобождение полипептидной цепи от рибосом. При синтезе белка и-РНК входит в состав полирибосомы. На ней одновременно могут находиться до ста рибосом. Синтезированные полипептидные цепи поступают в комплекс Гольджи и эндоплазматическую сеть, где завершается построение белковой молекулы. Здесь же белки взаимодействуют с углеводами, липидами, образуя гликопротеидные комплексы. Эти комплексы либо используются в клетке, либо выводятся из неё.

Весь процесс биосинтеза белка можно представить в виде схемы (рис. 13):

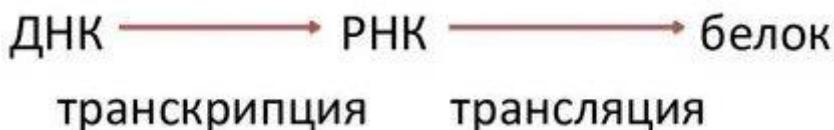


Рис. 13. Центральная догма молекулярной биологии

Центральная догма в молекулярной биологии: информация может передаваться с НК на НК или на белок, но не может передаваться с белка на белок или белка на НК.

Регуляция биосинтеза белка

Все клетки организма, за исключением половых, имеют удвоенное количество ДНК. Таким образом, каждая клетка содержит полную информацию о всём организме, но использует лишь часть этой информации. Это объясняется тем, что большинство генов находится в подавленном (репрессированном) состоянии. Кроме, того в определённый момент клетка синтезирует только те белки, которые ей нужны в это время. Таким образом, биосинтез белка в клетке постоянно регулируется. Эта регуляция возможна на двух уровнях:

1) на уровне транскрипции – при этом разрушаются старые и-РНК и образуются новые, соответствующие потребностям клетки;

2) на уровне трансляции – в этом случае регуляция определяет, какие и-РНК создаются рибосомами и как часто.

РНК-полимераза присоединяется к промотору и начинает синтез про-и-РНК. При этом она должна пройти через ген-оператор. Если ген-оператор не заблокирован белком-репрессором,

происходит транскрипция. Белок-репрессор может соединяться или с геном-оператором (тогда он блокирует транскрипцию), или с индуктором, тогда ген-оператор свободен. **Индукторы** – это вещества, способные усиливать синтез определённого фермента. Индукторами могут быть различные субстраты, например, лактоза. Белок, образовавшийся после транскрипции, взаимодействует и индуктором, освобождая репрессор, который прекращает транскрипцию. Если в клетку поступают новые порции индуктора, то он освобождает ген для транскрипции, взаимодействуя с геном-репрессором.

Тема 6: СТРОЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ

Гены прокариот. Опероны. Регуляция транскрипции

Прокариоты – одноклеточные живые организмы, не обладающие (в отличие от эукариот) оформленным клеточным ядром и другими внутренними мембранными органоидами (такими как митохондрии или эндоплазматический ретикулум, за исключением плоских цистерн у фотосинтезирующих видов, например, у цианобактерий). Прокариотические клетки диаметром от 0,1 до 5 мкм, они значительно меньше эукариотических клеток, диаметр которых колеблется от 10 до 100 мкм.

Прокариоты не развиваются и не дифференцируются в многоклеточную форму. Некоторые бактерии растут в виде волокон или клеточных масс, но каждая клетка в колонии одинакова и способна к самостоятельной жизни.

Основные молекулярно-генетические сведения, касающиеся прокариот, получены при изучении клеток *Escherichia coli*.

Индивидуально работающий **ген прокариот** состоит из трёх обязательных элементов: **промотора**, **белок-кодирующей области (структурный ген)** и **терминатора** транскрипции. У прокариот **структурный ген** представляет собой непрерывный участок молекулы ДНК (рис. 14). Концепцию оперона для прокариот (несколько генов под одним промотором) предложили в 1961 г. французские ученые Ф. Жакоб и Ж. Моно, за что получили Нобелевскую премию в 1965 г.

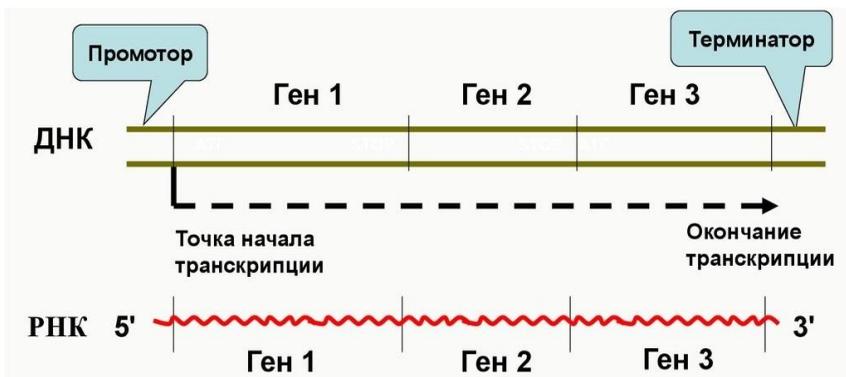


Рис. 14. Схема прокариотического структурного гена

Сигнал инициации транскрипции (промотор) располагается перед кодирующей последовательностью структурного гена (5'-фланкирующая последовательность), а сигнал терминации транскрипции (терминатор) – вслед за ней (3'-фланкирующая последовательность). Промотор и терминатор – нетранслируемые области генома. Промотор – основной регулятор работы гена – место взаимодействия ДНК с РНК-полимеразой. У большинства прокариот транскрипция всех РНК осуществляется с помощью одной и той же РНК-полимеразы. Промотор определяет правильное начало транскрипции с первого нуклеотида.

Бактериям необходимо быстро отвечать на изменения в окружающей среде. Их выживаемость зависит от способности переключать метаболизм с одного субстрата на другой, так как поступление питательных веществ может постоянно меняться. Бактерия не синтезирует ферменты метаболического пути в отсутствие субстрата, но способна начать синтез при его появлении. Для осуществления подобного реагирования гены бактерий объединены в кластеры таким образом, что ферменты, необходимые для определенного пути биосинтеза, кодируются генами, находящимися под общим контролем единых регуляторных элементов. Вся система, включающая структурные гены и регуляторные элементы, контролируемые их экспрессию, формирует общую единицу регуляции, называемую *опероном*. Примером кластерной регуляции у бактерии *E. coli* являются гены лактозного оперона.

Весь кластер генов лактозного оперона занимает около 6 т.п.н. Ген *lacI* имеет свои промотор и терминатор. Транскрипции генов *lacZ*, *lacY*, *lacA* контролируются белком-репрессором, кодируемым геном *lacI*. Белок-репрессор имеет два сайта связывания: один – для индуктора (лактозы), другой для оператора. Гены, входящие в состав лактозного оперона, индуцируются и репрессируются под действием субстрата – лактозы. При добавлении лактозы (галактозида) в бак териальных клетках очень быстро усиливается синтез ферментов, новые молекулы появляются уже через 2–3 мин. Вскоре их число превышает 5 000. При удалении субстрата (лактозы) из среды синтез фермента прекращается так же быстро. Быстрое увеличение активности фермента за счёт его синтеза под действием субстрата называется *индукцией*, а уменьшение – *репрессией*.

Ферменты для усвоения лактозы синтезируются в клетке кишечной палочки при двух условиях – наличии лактозы и отсутствии глюкозы.

Когда индуктор – лактоза – попадает в клетку, две молекулы лактозы связываются с белком-репрессором, что приводит к диссоциации белка-репрессора от операторного участка ДНК, так как образуется неактивный репрессор-индукторный комплекс. Происходит индукция транскрипции генов лактозного оперона.

Данный механизм регуляции активности лактозного оперона называют *позитивной индукцией*.

При снижении концентрации лактозы новые порции белка-репрессора взаимодействуют с операторными последовательностями и препятствуют транскрипции. Таким образом, в отсутствие лактозы в клетке ферменты для метаболизма лактозы не синтезируются.

Регуляция работы лактозного оперона в зависимости от концентрации лактозы происходит по принципу отрицательной обратной связи: чем больше лактозы, тем больше ферментов для её катаболизма (положительная прямая связь); чем больше ферментов, тем меньше лактозы; чем меньше лактозы, тем меньше производится ферментов (двойная отрицательная обратная связь).

Если в клетке концентрация глюкозы достаточна для поддержания метаболизма, то активация лактозного оперона также не происходит. Когда концентрация глюкозы в клетке снижается, в

присутствии лактозы происходит экспрессия генов оперона. Данный механизм регуляции активности лактозного оперона называют **негативной индукцией**. «Негативным индуктором» служит глюкоза, которая снижает активность лактозного оперона даже при наличии лактозы.

Основным преимуществом оперонной организации генов микроорганизмов является координация регуляции активности: все гены экспрессируются или не экспрессируются одновременно.

Гены эукариот

Гены эукариот по строению и характеру транскрипции значительно отличаются от прокариотических генов. Их отличительной особенностью является прерывность, т. е. чередование в них последовательностей нуклеотидов, которые представлены (**экзоны**) или не представлены (**интроны**) в и-РНК (рис. 15). Интроны относятся к некодирующим последовательностям. Их длина может превышать 10 т.п.н. У низших эукариот прерывные гены составляют меньшинство всех генов (5 % у дрожжей), а у высших – большинство (94 % у млекопитающих).

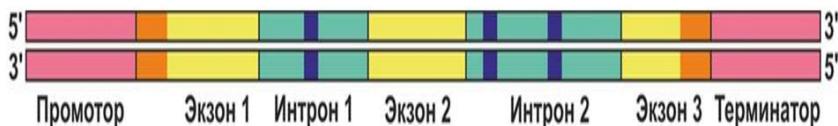


Рис. 15. Схема эукариотического структурного гена

В структуру гена входят также 5'- и 3'-нетранслируемые области. В 5'-нетранслируемой области находятся **промоторы**. Промоторы, обеспечивающие высокую скорость синтеза про-и-РНК, называются **сильными**, а низкую – **слабыми**. Есть промоторы, которые для своей работы требуют присутствия какой-то другой молекулы, они называются **индуцибельными**. Транскрипция заканчивается при достижении определенных терминирующих сигналов. В 3'-нетранслируемой области гена локализованы последовательности, участвующие в регуляции **процессинга** и-РНК и трансляции.

Гены эукариот не группируются в опероны, поэтому каждый из них имеет собственный **промотор** и **терминатор** транскрипции.

Транскрипция и процессинг РНК у эукариот

Транскрипция и трансляция с образованием конечного продукта – два этапа работы гена, или его *экспрессия*.

Существует определенный набор генов, которые экспрессируются в любых типах клеток, есть набор генов, которые экспрессируются только в определённых тканях. Эти гены, получившие название *генов «домашнего хозяйства»*, обеспечивают энергетику, дыхание и другие процессы, без которых клетки жить не могут. Но основная масса генов – это *тканеспецифические* гены, которые работают только в определённых клетках и на определённых стадиях их развития.

Считается, что в среднем в специализированных клетках одновременно работает не более 20% всех генов. Процесс дифференцировки непосредственно зависит от набора экспрессирующихся генов. Важную роль в этом играют *транскрипционные факторы* – регуляторные белки, способные активировать или репрессировать целую группу других генов.

Особенностью транскрипционного аппарата эукариотических клеток является наличие в ДНК специфических локусов – *энхансеров* (*enhancer* – усилитель). Они увеличивают эффективность транскрипции ближайшего гена в десятки и сотни раз. При этом энхансер может находиться в любой ориентации по отношению к гену, располагаться с любой его стороны, внутри него (в интроне) и даже на расстоянии в несколько тысяч пар нуклеотидов. По-видимому, так же работают и локусы с противоположным эффектом действия – *сайленсеры* (*silencer* – успокоитель), в присутствии которых транскрипционная активность РНК-полимеразы уменьшается.

Промоторы высших эукариот представляют собой мозаику из различных *консервативных последовательностей*. Структура промоторов прокариот более приспособлена для регуляции по принципу «всё или ничего», в то время как мозаичность строения эукариотических промоторов позволяет осуществить нюансированную регуляцию – от полной экспрессии до полной репрессии. Сигналами завершения синтеза и-РНК являются *терминаторы транскрипции*, содержащие стоп-кодона.

Транскрипция генов у эукариот происходит в ядрах, что приводит к образованию и-РНК-предшественников (про-и-РНК). Уже на начальном этапе синтеза к их 5'-концам через связь 5'-5'

присоединяется необычное основание (*кэп*) – 7-метилгуанозин. Модифицированный 5'-конец обеспечивает инициацию трансляции, удлиняет время жизни и-РНК, защищая её от действия 5'-экзонуклеаз в цитоплазме. Кэпирование необходимо для инициации синтеза белка, так как иницирующие триплеты АУГ распознаются рибосомой только при наличии кэпа. Наличие кэпа также необходимо для работы сложной ферментной системы, обеспечивающей удаление интронов. После завершения транскрипции к 3'-концу присоединяется полиадениловая цепочка (поли(А)-последовательность), состоящая из 100–200 последовательно соединенных адениловых нуклеотидов. Полиадениловая цепочка способствует инициации *трансляции* (трансляционный энхансер).

Матричную роль и-РНК выполняют только в цитоплазме. При перемещении из ядра в цитоплазму происходит превращение про-и-РНК в и-РНК. Вырезание интронов из пре-и-РНК (первичного продукта транскрипции) с помощью ферментов и сшивание экзонов друг с другом с образованием функциональной и-РНК называется *сплайсингом*. В результате сплайсинга зрелая молекула и-РНК становится значительно короче пре-и-РНК.

Обычно длина экзонов составляет от 150 до 200 нуклеотидов, а длина интронов – от 40 до 10 000 нуклеотидов. Размер типичного гена и ядерной пре-и-РНК млекопитающих составляет от 15 000 до 17 000 нуклеотидов, а размер и-РНК – около 2 000 нуклеотидов. *Сплайсинг для и-РНК прокариот нехарактерен.*

Итак, благодаря альтернативному сплайсингу в разных тканях могут образовываться разные продукты одного и того же структурного гена.

Таким образом, регуляция транскрипции у эукариот – это очень сложный процесс. Структурный ген может иметь множество регуляторных элементов, которые активируются специфическими сигналами в клетках разного типа в разное время клеточного цикла. Однако некоторые структурные гены находятся под контролем уникального фактора транскрипции. Специфические белки могут взаимодействовать с определенными регуляторными элементами, блокируя, таким образом, транскрипцию.

Следующий этап биосинтеза белка – *трансляция*. В процессе трансляции происходит перевод молекулярной

информации с языка нуклеиновых кислот (4 нуклеотида и-РНК) на язык белков (20 аминокислот).

Отсутствие соответствия между числом мономеров в матрице и-РНК и синтезируемом белке, а также отсутствие структурного сходства между мономерами РНК и белка вызвали необходимость в создании «словаря». Этот «словарь», позволяющий определить, какая последовательность нуклеотидов и-РНК обеспечивает включение в белок аминокислот в заданной последовательности, получил название *генетический код*.

Генетический код – это свойственная всем живым организмам система записи наследственной информации в молекулах нуклеиновых кислот в виде последовательности нуклеотидов (Приложение 2). **Ген** – это единица наследственности. Он представляет собой часть молекулы ДНК и содержит закодированную информацию об аминокислотной последовательности одного белка или рибонуклеиновой кислоты (РНК).

Кодон (триплет) – единица генетической информации, кодирующая одну аминокислоту. К 1965 г. генетический код был полностью расшифрован американскими учеными.

Локус – это местоположение определённого гена на генетической или цитогенетической карте хромосомы. Вариант последовательности ДНК в данном **локусе** называется аллелем.

Свойства генетического кода:

1) **триплетный** – одна аминокислота кодируется тремя нуклеотидами;

2) **вырожденный**, т.е. несколько кодонов могут кодировать одну и ту же аминокислоту;

3) код не является двусмысленным, т.е. один кодон не может кодировать две разные аминокислоты;

4) **универсальный**, т.е. свойственный всем живым организмам на Земле;

5) код *не перекрывающийся*, т.е. между кодонами информационной РНК нет нуклеотидов, не кодирующих аминокислоту.

Местоположение определённого гена на генетической карте хромосомы называется **локус**. **Генетическая карта** – это схема взаимного расположения структурных генов, регуляторных элементов и генетических маркеров, а также относительных

расстояний между ними на хромосоме (группе сцепления) (рис. 16). Метод построения генетических карт называется *генетическим картированием*.

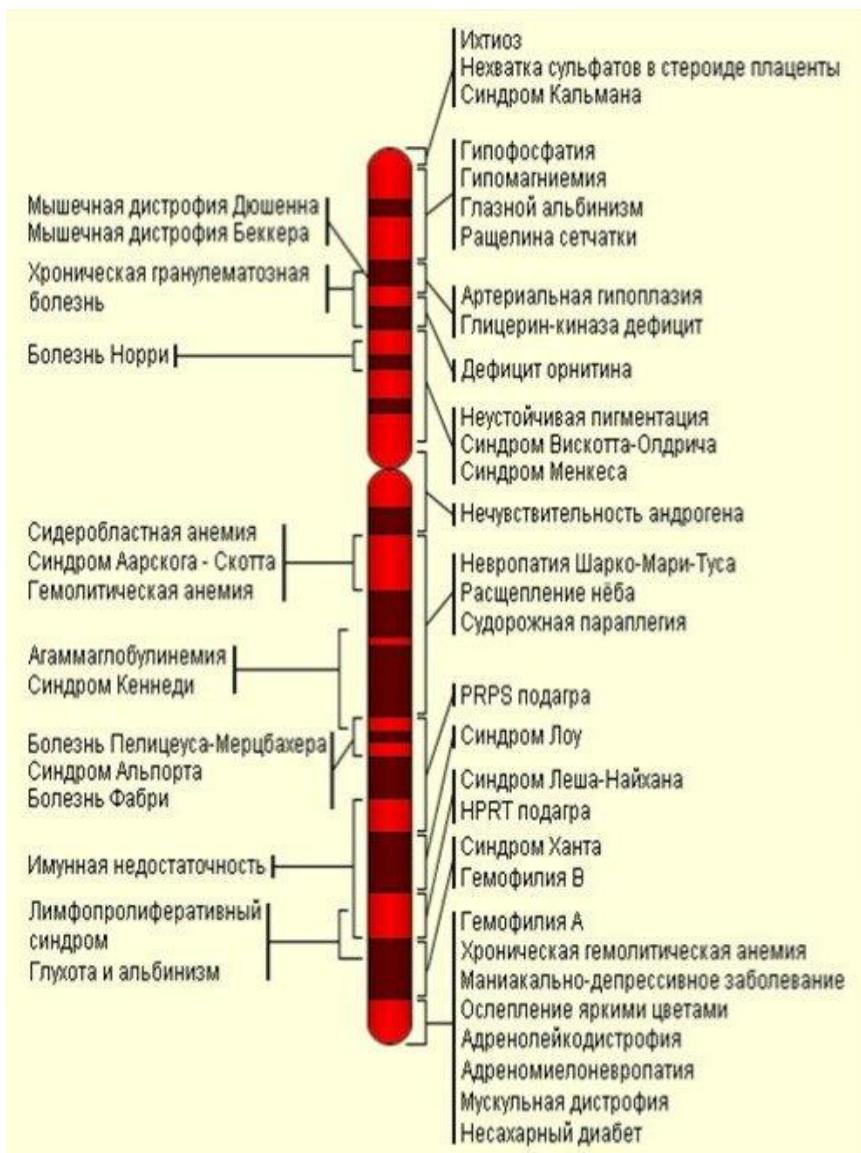


Рис. 16. Генетическая карта X-хромосомы человека

Тема 7: НУКЛЕОСОМА, ХРОМАТИН, ХРОМОСОМА

Геном в клетке находится в сильно уплотненном состоянии – это, пожалуй, озвучивается во всех книгах по биологии. Суммарная длина ДНК в клетках человека составляет около 2 м. Диаметр ядра клетки – порядка 7 мкм. Если учесть, что каждая хромосома представлена отдельной молекулой ДНК, уровень компактизации ДНК составляет более 6 000 раз. Компактизация ДНК необходима всем организмам для структурирования и передачи своего генома посредством клеточного деления.

ДНК эукариот почти вся находится в хромосомах ядер, лишь небольшое количество её содержится в митохондриях, а у растений и в пластидах. Основное вещество хромосом эукариотических клеток (в том числе и хромосом человека) – это хроматин, состоящий из двухцепочечной ДНК, гистоновых и негистоновых белков.

ДНК человека состоит из сорока шести хромосом и имеет длину около двух метров. Тем не менее, при таком размере она умещается в ядро клетки. Уровень достигаемого уплотнения превосходит 10 000 раз. Процесс укомплектования ДНК получил название компактизация (рис. 17).

Компактизация ДНК для эукариотической клетки важна по двум причинам: она позволяет не запутать и упорядоченно расположить очень длинные молекулы ДНК в небольшом объеме клеточного ядра и, кроме того, это один из способов функционального контроля генов – характер упаковки ДНК влияет на активность некоторых участков генома.

Именно в составе хроматина происходит реализация генетической информации, а также репликация и репарация ДНК.

Нуклеосомы располагаются довольно регулярно, так что образующаяся структура напоминает бусы. Нуклеосома состоит из белков-гистонов четырёх типов: H2A, H2B, H3 и H4.

Нить ДНК с нуклеосомами образует нерегулярную соленоид-подобную структуру толщиной около 30 нанометров, так называемую 30 нм фибриллу.

Структурная организация ДНК в хромосомах (уровни компактизации)

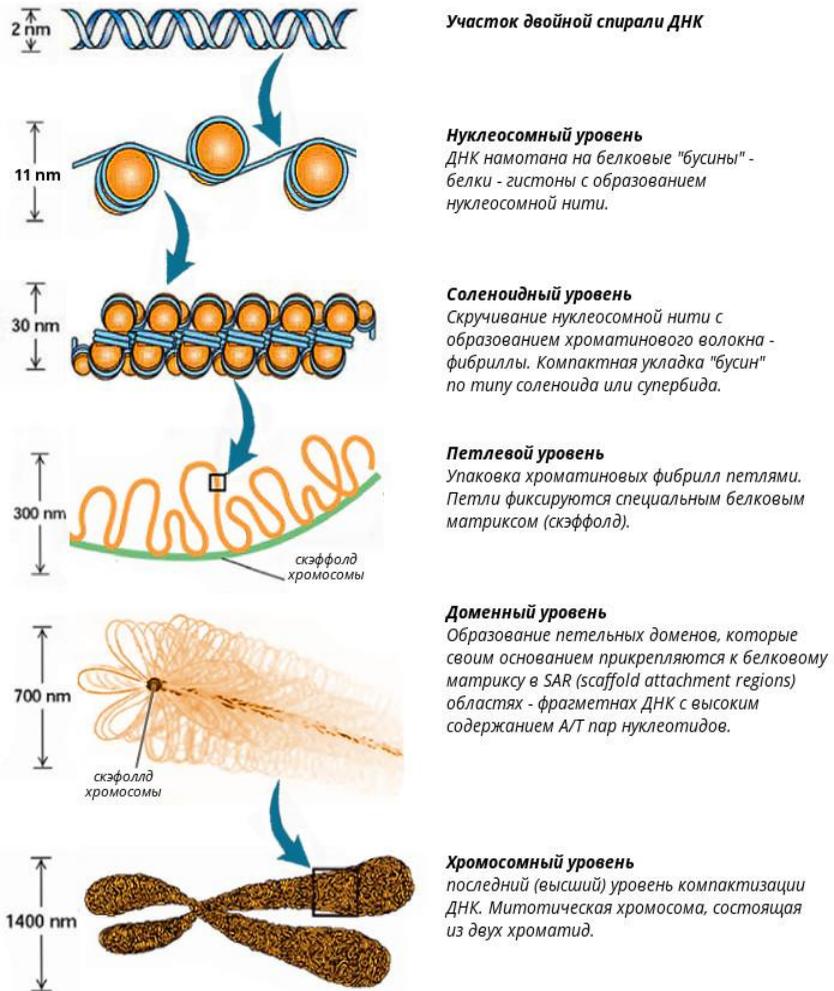


Рис. 17. Уровни компактизации ДНК

Дальнейшая упаковка этой фибриллы может иметь различную плотность. Если хроматин упакован плотно, его называют **гетерохроматином**, он хорошо видим под микроскопом. ДНК, находящаяся в гетерохроматине не

транскрибируется. В интерфазе гетерохроматин обычно располагается по периферии ядра (пристеночный гетерохроматин). Полная конденсация хромосом происходит перед делением клетки.

Нуклеосома – это структурная часть хромосомы, образованная совместной упаковкой нити ДНК с гистоновыми белками H2A, H2B, H3 и H4.

Упаковка ДНК в хроматин обеспечивает многократное сокращение линейных размеров ДНК, необходимое для размещения её в ядре. Она происходит в несколько этапов. Наиболее изученными являются три первых уровня упаковки: 1) накручивание ДНК на *нуклеосомы* с образованием нуклеосомной нити диаметром 10 нм, 2) компактизация нуклеосомной нити с образованием так называемой 30-нм *фибриллы* и 3) сворачивание последней в гигантские (50–200 т.п.н.) петли, закреплённые на белковой скелетной структуре ядра – *ядерном матриксе*.

Хромонема – это спиральная структура, которую удаётся увидеть в декомпактизованных митотических хромосомах в световой микроскоп.

Разница между хроматином и нуклеосомой

ДНК является генетическим материалом большинства организмов. Как правило, эукариотические геномы намного больше, чем прокариотические геномы. Многие организмы имеют около 10^9 – 10^{10} пар оснований в их геноме. Тем не менее, эти длинные нити ДНК должны быть упакованы внутри ядра. ДНК обёрнута белком, называемым гистоном, для производства хроматина, а затем хромосом. Хроматин и нуклеосома – два термина, используемые для описания плотной упаковки генетического материала внутри ядра.

Главное отличие между хроматином и нуклеосомой является то, что хроматин – это общий термин для ДНК, обёрнутой гистонами, тогда как нуклеосома является основной, повторяющейся структурной единицей хроматина.

Хроматин – это комплекс ДНК и белков, который образует хромосомы в ядре эукариотических клеток. Основное назначение хроматина – плотно упаковать ДНК внутри ядра клетки. Хроматин можно наблюдать под микроскопом в виде нитевидных петлевых структур во время интерфазы.

Типы хроматина

Интерфазный хроматин состоит из двух типов: эухроматина и гетерохроматина.

Эухроматин

Свободно упакованная форма хроматина известна как эухроматин. Содержит активно экспрессируемые гены в геноме. Свободная упаковка хроматина позволяет транскрипцию генов в этом регионе. Диаметр эухроматинового волокна составляет 30 нм. Эухроматин состоит из петель с областями 40–100 т.п.н. в геноме. Эухроматин также генетически активен, так как в этих регионах происходит кроссовер хромосом.

Гетерохроматин

Плотно упакованная форма хроматина известна как гетерохроматин. Гетерохроматин содержит как транскрипционную, так и генетически неактивную ДНК, которая обеспечивает структурную поддержку геному на его хромосомных стадиях. Можно выделить два типа гетерохроматина: конститутивный гетерохроматин и факультативный гетерохроматин. Конститутивный гетерохроматин не состоит из генов. Факультативный гетерохроматин состоит из неактивных генов.

Нуклеосома относится к основной структурной единице эукариотического хроматина, которая состоит из длины ДНК, обмотанной вокруг ядра гистонов. Нуклеосома состоит из 146 пар оснований длиной ДНК, обернутых вокруг ядра гистона. Гистоновое ядро состоит из восьми гистоновых белков. Октамер гистонов образуется путем объединения двух из каждых четырех гистонов, H2A, H2B, H3 и H4.

Каждая хромосома состоит из тысяч нуклеосом, которые связаны между собой отрезками ДНК, известными как линкерная ДНК. Длина линкерной ДНК составляет около 20 пар оснований. Нуклеосомы плюс линкер DAN дают вид бусин на нити.

Сходства между хроматином и нуклеосомой:

- 1) хроматин и нуклеосома – два термина, используемые для описания плотной упаковки ДНК внутри ядра;
- 2) и хроматин, и нуклеосома представляют собой структуры, состоящие из ДНК, обернутой вокруг белков гистонов;
- 3) как хроматин, так и нуклеосома участвуют в образовании хромосом.

Разница между хроматином и нуклеосомой:

1. Определение:

хроматина: хроматин – это комплекс ДНК и белков, который образует хромосомы в ядре эукариотических клеток;

нуклеосом: нуклеосома является основной структурной единицей эукариотического хроматина, которая состоит из длины ДНК, свернутой вокруг ядра гистонов.

2. Корреляция:

хроматина: хроматин образует хромосомы;

нуклеосом: нуклеосомы образуют хроматин.

3. Внешний вид:

хроматина: хроматин имеет вид нитевидной петлевой структуры;

нуклеосом: нуклеосома появляется в виде «бус на веревочке».

РАЗДЕЛ II. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Тема 8: ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

Помимо амплификации ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов и т. д.

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

Типичная реакционная смесь для ПЦР:

1. **Анализируемая ДНК.** Это может быть, как отдельный кусочек молекулы, так и плазида, хромосома или геном клетки полностью.

2. **Праймеры.** *Праймер* – это искусственно синтезированная короткая цепочка нуклеотидов (15–30 штук), комплементарная выбранному участку одной из цепей анализируемой ДНК. Один из праймеров обычно соответствует началу амплифицируемого отрезка, другой – его концу, но на противоположной цепи. У праймеров, как и у любого олиго- или полинуклеотида, есть 3'- и 5'-концы.

3. **Нуклеотиды.** А точнее, дезоксинуклеотидтрифосфаты – четыре вида «кирпичиков» для строительства цепей ДНК: дАТФ, дТТФ, дЦТФ и дГТФ.

4. **ДНК-полимераза.** Фермент, строящий комплементарную матричную цепь ДНК. Он может начинать синтез только от 3'-конца праймера. Обычно используют термостабильные полимеразы, изначально выделенные из термофильных бактерий и архей: *Thermus aquaticus* (*Taq*-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-полимераза) и *Pyrococcus woesei* (*Pwo*-полимераза). Первая – самая производительная, а две другие – более точные.

5. **Буфер.** Раствор, содержащий различные ионы для поддержания нужного pH, соли магния, необходимые для работы полимеразы, и неионный детергент Tween-20 в сочетании с BSA (бычьим сывороточным альбумином) для предотвращения налипания компонентов реакции на стенки пробирки. В случае ГЦ-богатых матриц в смесь часто добавляют энхансер – ДМСО (диметилсульфоксид), предотвращающий нежелательные взаимодействия между комплементарными участками матрицы (рис. 18)

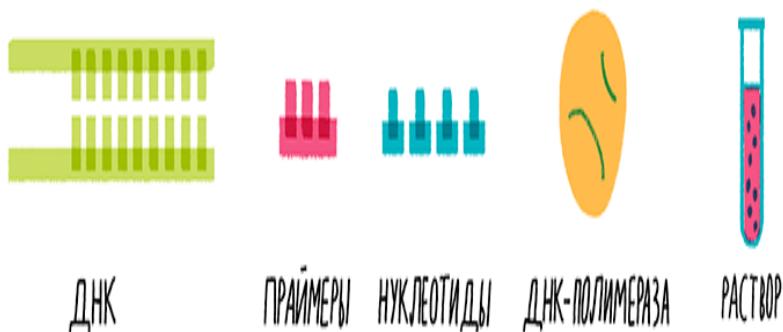


Рис. 18. Состав реакционной смеси для ПЦР

Все компоненты смешивают в нужном объёме **деионизированной воды** в специальных пробирках для ПЦР и помещают в амплификатор (или ПЦР-циклер) (рис. 19).



б



Рис. 19. а – пробирки для ПЦР, б – амплификатор

Этапы реакции:

Цель ПЦР – получить множество одинаковых двухцепочечных кусочков ДНК строго определённой длины (обычно не более 2–3 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.)). Для этого проводят 20–30 циклов реакции. Каждый цикл состоит из трёх этапов:

1. Денатурация.

Чтобы полимераза могла работать, две цепи ДНК-матрицы нужно разъединить. Для этого реакционную смесь нагревают до 94–98°C. В таких условиях разрушаются водородные связи между азотистыми основаниями параллельных цепей.

2. Отжиг праймеров.

На этом этапе праймеры специфично присоединяются к освободившимся цепям ДНК-матрицы с разных сторон копируемого участка 3'-концами друг к другу. Чтобы праймеры могли комплементарно связаться (отжечься) только с нужными

участками, при их конструировании необходимо учитывать такую важную характеристику, как температура плавления (T_m). Это расчётная температура, при которой половина праймеров присоединяется к целевому участку ДНК. Отжиг проводят при температуре на 1–5 °С ниже T_m , но не выше оптимальной температуры работы полимеразы, то есть в пределах 40–72 °С.

3. Элонгация, или синтез ДНК.

В её ходе фермент ДНК-полимераза последовательно выстраивает цепь ДНК (полимер) из нуклеотидов (мономеров), то есть полимеризует их. И делает она это на третьем этапе ПЦР.

Этот этап чаще проводят при температуре 72 °С – оптимальной для работы *Taq*-полимеразы. ***Taq*-полимераза**, или **термостабильная ДНК-полимераза I** – термостабильная ДНК-зависимая-ДНК-полимераза бактерии *Thermus aquaticus*. *Taq*-полимераза является гомологом ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*. В отличие от *E. coli*, *Th. aquaticus* является термофильным микроорганизмом (для его жизнедеятельности оптимальна температура окружающей среды 55 °С и выше), поэтому и его ферменты термостабильны (температурный оптимум составляет 70–80 °С). Ключевым свойством *Taq*-полимеразы, которое делает её удобной для ПЦР, является термостабильность. Период полураспада фермента при температуре 92,5 °С составляет 130 минут, что позволяет проводить многочисленные циклы ПЦР без необходимости добавлять новую порцию фермента в каждом цикле (как делали до открытия термостабильных ДНК-полимераз). Кроме того, более высокий температурный оптимум протекания реакции амплификации уменьшает вероятность образования вторичной и третичной структуры в матрице и неспецифического отжига праймеров. Скорость работы фермента зависит от температуры и составляет примерно 60 нуклеотидов в секунду при 72 °С.

Итак, фермент присоединяется к комплексам «праймер-матрица» и, выхватывая из раствора нуклеотиды, начинает по принципу комплементарности прилаживать их к 3'-концу праймера. Удлинение, или элонгация, новой цепи ДНК идёт с максимальной скоростью 50–60 нуклеотидов в секунду (то есть около 3 000 в минуту). Однако при программировании ПЦР-циклера задают время с запасом: по минуте на каждую тысячу пар нуклеотидов (рис. 20).

Подготовка реакции

Готовая реакционная смесь помещается в термоциклер

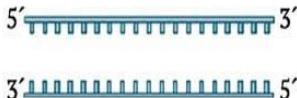


Фрагмент ДНК, представляющий интерес

98 °C

Денатурация ДНК

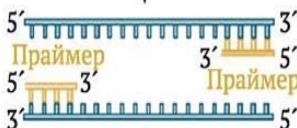
Повышение температуры до точки денатурации двухцепочечной ДНК



48–72 °C

Отжиг праймеров

Снижение температуры до точки, обеспечивающей комплементарную связь праймера с ДНК-матрицей

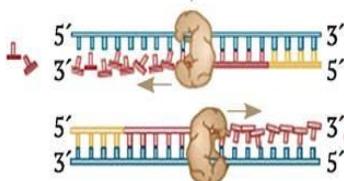


Одноцепочечные фрагменты препарата ДНК

68–72 °C

Элонгация

Полимераза наращивает новые цепи ДНК между праймерами на одноцепочечных матрицах



Синтезируемые заново на одноцепочечной матрице фрагменты двухцепочечной ДНК

Экспоненциальная амплификация фрагментов

Повторение процесса и далее экспоненциальный рост количества копий фрагмента ДНК



Рис. 20. Схема ПЦР

Каждая вновь синтезированная цепочка ДНК становится, наравне со старой, матрицей для синтеза в следующем цикле. Таким образом, количество нужного продукта в процессе реакции возрастает экспоненциально. После прохождения всех циклов в реакционной смеси образуется столько специфических двухцепочечных продуктов, что их «массив» можно увидеть невооруженным глазом – проведя гель-электрофорез.

Гель-электрофорез ДНК – это аналитический метод в молекулярной биологии, применяемый для разделения фрагментов ДНК по размеру. Для этого в карманы агарозного геля наносят исследуемые образцы. Под действием внешнего электрического поля молекулы ДНК начинают движение и через некоторое время полностью разделяются. Полоски под номерами 1, 2 на рис. 21 – это фрагменты ДНК, определённых размеров.

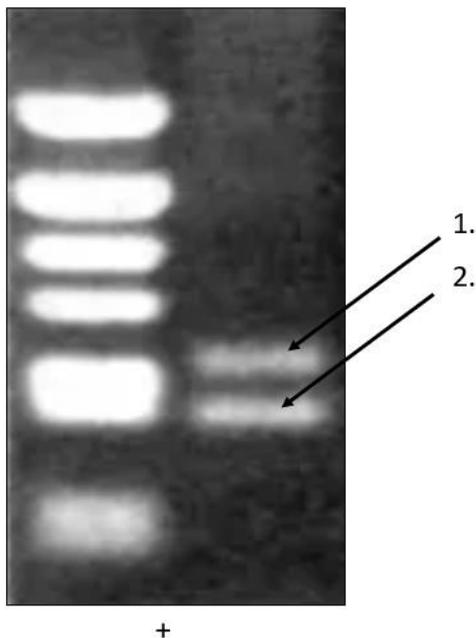


Рис. 21. Гель-электрофорез ДНК

Тема 9: СЕКВЕНИРОВАНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ

Секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот – ДНК и РНК) – это определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности. Секвенирование (*sequencing*) – это общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК. В настоящее время нет ни одного метода секвенирования, который бы работал для молекулы ДНК целиком; все они устроены так: сначала готовится большое число небольших участков ДНК (клонировается молекула ДНК многократно и разрезается в случайных местах), а потом читается каждый участок по отдельности.

Клонирование (амплификация) ДНК происходит при помощи полимеразной цепной реакции.

В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры белков или ДНК в виде последовательности мономеров или нуклеотидов в текстовом (буквенном) виде.

Исторически, для секвенирования использовали два подхода – химический и ферментативный.

Химический метод разработали А. Максам и В. Гилберт в 1976 г. Они секвенировали ДНК вируса SV40.

Ферментативный метод (дидезоксисеквенирование). Определение нуклеотидной последовательности ДНК методом ферментативного копирования с помощью ДНК-полимеразы с остановкой удлинения цепи. Изобрёл Ф. Сэнгер в 1977 г. Он впервые предложил применить модифицированные нуклеотиды – дидезоксирибонуклеотиды (ddNTP), у которых отсутствуют 3'– и 2'–ОН группы.

Автоматическое секвенирование включает автоматизацию проведения секвенирующих реакций и электрофоретического разделения меченых продуктов. При этом используется флуоресцентная метка. Каждый из четырех нуклеотидов метят различными флуоресцентными красителями. Содержание всех пробирок соединяют и проводят электрофорез на одной дорожке. Дорожку сканируют в луче лазера и регистрируют положение каждой флуоресцирующей полосы. Данные вводят в компьютер,

который их сопоставляет с помощью специальных программ и выводит на дисплей нуклеотидную последовательность (рис. 22).

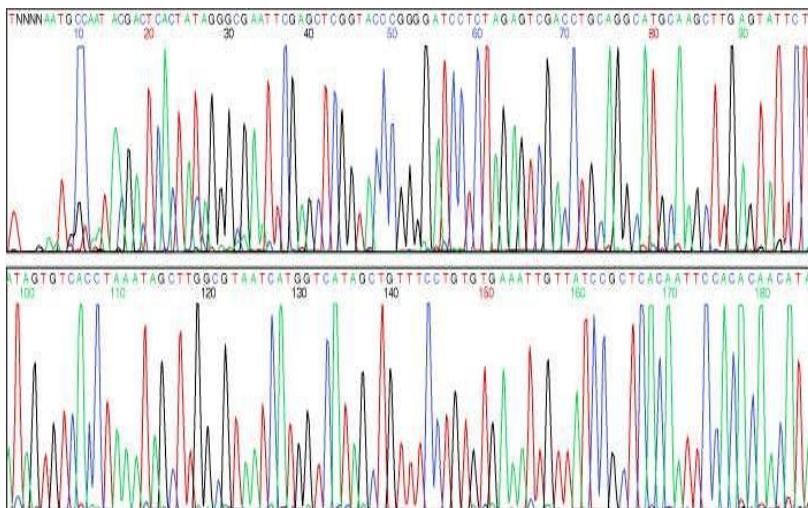


Рис. 22. Автоматическое секвенирование с помощью флуоресцентных красителей. Каждому из четырех нуклеотидов соответствует свой индивидуальный краситель

Первый автоматический ДНК-секвенатор разработан в 1987 г. фирмой *Applied Biosystems* (США). Позже для автоматического секвенирования наряду с пластинами использовали капиллярный гель-электрофорез. Для него характерны высокая чувствительность и высокая скорость разделения. Современные ДНК-секвенаторы существенно превосходят секвенирование вручную, растёт скорость секвенирования, постоянно улучшается техника и программное обеспечение. Это ведёт к тому, что секвенирование ДНК становится простой и доступной процедурой.

При помощи сэнгеровского секвенирования расшифрован геном человека. Рассмотрим секвенирование по Сэнгеру подробно.

Секвенирование по Сэнгеру

Экзом – это часть генома, отвечающая за синтез белка в организме. Экзом человека соответствует примерно 1% всего генома или 30 миллионам пар нуклеотидов. Тем не менее, мутации в экзоте составляют до 85% от всех мутаций, связанных с

болезнями. Для клинических целей в большинстве случаев достаточно данных, полученных в результате прочтения экзема.

Геном – совокупность всего наследственного материала, заключенного в клетке организма. Геном человека построен из ДНК, упакованной в 23 пары хромосом (22 пары так называемых аутосом и одна пара половых хромосом), находящихся в ядре клетки. Геном человека содержит примерно 3,1 млрд пар нуклеотидов. Секвенирование генома в клинических целях используется редко из-за большей дороговизны по отношению к секвенированию экзема. В большинстве случаев клинические задачи решаются анализом экзема.

Интерпретация данных – это процесс анализа данных секвенирования с целью поиска в них изменений ДНК, ассоциированных с состоянием здоровья обследуемого или потенциальными рисками для потомства. Результаты интерпретации данных отражаются в заключении по результатам секвенирования экзема или генома. Для пояснения полученных результатов секвенирования рекомендуется консультация врача-генетика.

Итак, ДНК – это полимерная цепь, состоящая из мономеров четырёх типов, называемых нуклеотидами, последовательность которых и кодирует информацию об организме. Иначе говоря, ДНК можно представить, как текст, написанный четырёхбуквенным алфавитом. ДНК – молекула, состоящая из двух цепочек, и, хотя, последовательность нуклеотидов у них разная, последовательность одной цепочки можно однозначно восстановить, если известна последовательность другой. Поэтому цепочки называют комплементарными. Это свойство используется при копировании клетки, когда цепочки ДНК расплетаются, и, на каждой, как на матрице, синтезируется вторая, и каждая из двух дочерних клеток получает свою двухцепочечную ДНК.

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. Если геномы близких организмов раньше не секвенировались, то из **ридов**, затем, с помощью программ, пытаются собрать единую последовательность нуклеотидов.

Первым методом секвенирования, который учёные сумели применить для обработки целых геномов (в том числе генома человека), стало секвенирование по Сэнгеру (*Sanger sequencing*). Смысл таков: участок ДНК клонируется, после чего полученная смесь делится на четыре части. Каждая часть помещается в активную среду. Собственно, процесс практически идентичен ПЦР ДНК. Разница только в том, что теперь в один из нуклеотидов подмешаны «ложные» нуклеотиды; они могут образовать точно такую же водородную связь, но не могут продолжить свою нить дальше. В классическом варианте метода Сэнгера одна из цепочек анализируемой ДНК выступает в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепочки ферментом ДНК-полимеразой.

Реакцию с одной и той же матрицей проводят в четырёх разных пробирках, каждая из которых содержит:

1) **праймер** – небольшую одноцепочечную молекулу ДНК, комплементарную началу участка, который нужно отсеквенировать. Праймер необходим потому, что ДНК-полимеразы не могут начинать синтез цепи «с пустого места», они только присоединяют следующий нуклеотид к уже имеющейся 3'-гидроксильной (ОН) группе предыдущего. Праймер, таким образом, представляет собой «затравку» при синтезе ДНК;

2) **четыре стандартных дезоксирибонуклеотида (dATP, dGTP, dCTP и dTTP)** (дезоксирибонуклеотидный трифосфат) (у РНК две ОН-группы);

3) **дидезоксирибонуклеотиды (ddATP, ddGTP, ddCTP или ddTTP)**. У них отсутствует 3'-ОН (гидроксильная группа), поэтому после их включения в цепь дальнейший синтез обрывается (рис. 23, 24).

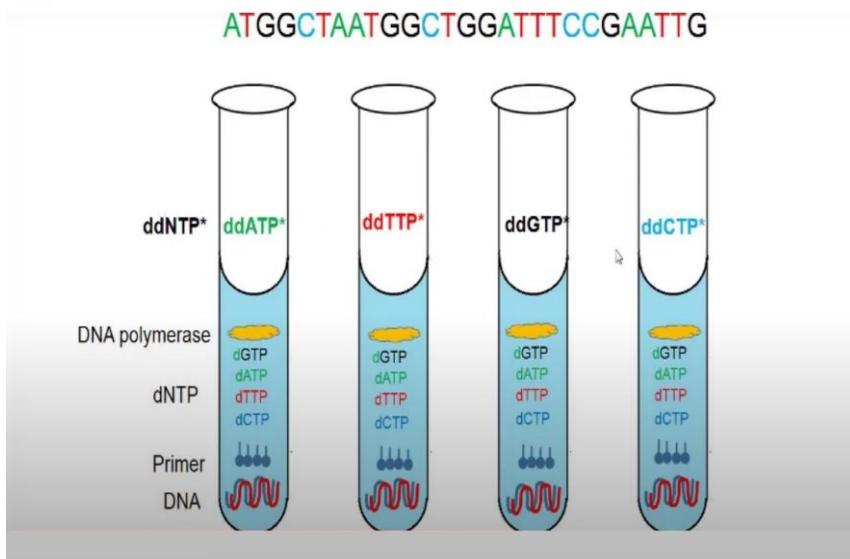


Рис. 23. Состав пробирок при секвенировании по Сэнгеру

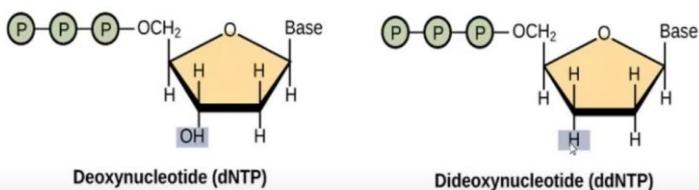


Рис. 24. Схема стандартного дезоксирибонуклеотида и схема дидезоксирибонуклеотида (без -ОН-группы)

Таким образом, в каждой пробирке образуется набор фрагментов ДНК разной длины, которые заканчиваются одним и тем же нуклеотидом (в соответствии с добавленным дидезоксирибонуклеотидом).

После завершения реакции содержимое пробирок разделяют электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и проводят автордиографию гелей. Продукты четырёх реакций формируют «секвенирующую лестницу» (от легкой «+» к тяжёлой «-»), которая позволяет «прочитать» нуклеотидную последовательность фрагмента ДНК (рис. 25).

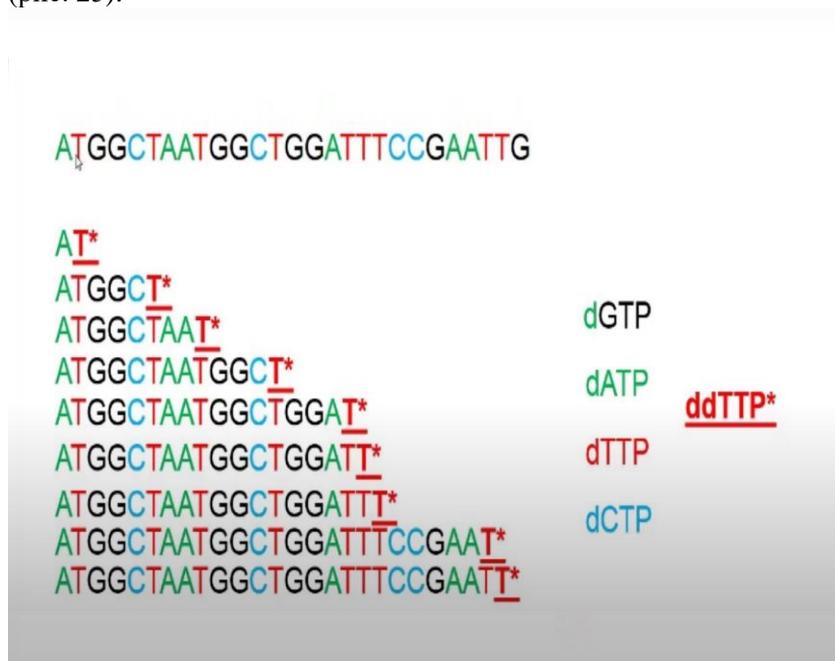


Рис. 25. Набор фрагментов ДНК при секвенировании

В сумме в четырёх пробирках получили все возможные **фрагменты** интересующего нас участка. Это значит, что можно просто измерить длину каждого фрагмента (точнее говоря, даже не измерить, а просто упорядочить, узнав, кто из них длиннее), то можно узнать и последовательность тоже (рис. 26).

Такие результаты могут быть использованы при выявлении генетической природы заболеваний, для проведения персональной терапии и подбора методик лечения на основе анализа индивидуальных генетических характеристик.

Однако 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.

Секвенирование сегодня

Осознав основные принципы функционирования нуклеиновых кислот, научное сообщество предприняло и предпринимает грандиозные усилия для того чтобы разработать быстрые и наиболее эффективные методы определения их первичной последовательности.

Секвенирование нового поколения (англ. *next generation sequencing, NGS*) – группа методов определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания её первичной структуры. Технология методов секвенирования нового поколения позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. NGS осуществляется с помощью повторяющихся циклов удлинения цепи, индуцированного полимеразой, или многократного лигирования олигонуклеотидов. В ходе NGS могут генерироваться до сотен мегабайт и гигабайт нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл.

Секвенирование ДНК превратилось из узкой области, которой занималось небольшое число ученых, в одну из самых стремительно развивающихся технологий. Сегодня секвенирование по методу NGS компании *Illumina Inc.*, которые позволяют получить быстрый и очень надежный результат (рис. 27).

○ 1-е поколение



Sanger sequencing

○ 2-е поколение



○ 3-е поколение



Рис. 27. Поколения секвенаторов

Тема 10: ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

Генная терапия – это технология излечения болезней человека путём использования в качестве объекта лечебного действия гена(ов), дополняющих, заменяющих либо подавляющих нарушенные функции генов клеток.

Наследственные и ненаследственные (соматические и инфекционные) обусловлены в конечном итоге нарушением функции структурных либо регуляторных генов. При наследственных болезнях изначально присутствуют нарушения в геноме клетки (гемофилия, болезнь Паркинсона и др.). Другие болезни возникают из-за сочетания воздействия генетической

предрасположенности и фенотипических факторов (диабет, гипертоническая болезнь, онкопатология и др.).

Генная терапия основывается на методах генной инженерии и технологии рекомбинантной ДНК, т.е. создание генетических конструкций, содержащих целевой ген (гены) и их введение в больной организм. Разработанные генетические конструкции способны восстановить или заменить дефектный ген, экспрессировать полноценный генный продукт или блокировать функциональную активность мутировавших генов.

Известно, что почти все заболевания так или иначе связаны с нарушением функции генов, т.е. с негативными мутациями. Генная терапия как одна из технологий молекулярной медицины направлена на то, чтобы так или иначе восстановить контроль за функцией гена.

Предпосылкой становления технологии генной терапии, как и технологии рекомбинантной ДНК, явились исследования по вирусной трансфекции, т.е. установление факта существования в природе способности вирусов проникать внутрь клеток и интегрироваться с их геномом. Успехи технологии генной терапии основываются на результатах секвенирования и картирования генома человека, полученных при реализации программы «Геном человека», а также современных сведений в области протеомики, бионанотехнологий, биоинформационных технологий и др.

Об актуальности генной терапии свидетельствует то, что в настоящее время шесть престижных международных журналов целиком посвящены этой проблеме. Над созданием этих технологий работают сотни биотехнологических компаний, выполняется более 600 международных проектов по генной терапии. Объёмы финансирования в этой области исчисляются миллиардами долларов.

Стандартная технология генной терапии включает следующие стадии:

1) подготовка экзогенного генетического материала, необходимого для трансфекции в клетки-мишени больного организма;

2) встраивание этого фрагмента ДНК в векторную систему, сконструированную на основе плазмиды, адено- или ретровирус;

3) трансфекция *ex vivo* либо *in vivo* вектора, несущего целевой ген в клетки-мишени больного организма в следующей

последовательности: экспериментальные или предклинические испытания генной конструкции на лабораторных животных; затем апробирование на добровольцах и, наконец, применение у больных после утверждения протоколов клинических испытаний.

Таким образом стандартная схема генотерапии начинается с создания полноценно работающей (экспрессирующейся) генетической конструкции, содержащей смысловую (кодирующую белок) и регуляторную части гена. Затем создаётся вектор, обеспечивающий доставку сконструированного гена к клеткам-мишеням; и наконец, осуществляется трансфекция (перенос полученной конструкции) в клетки-мишени. Анализируется результат трансфекции в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В случае положительного результата разрабатывается программа и утверждается протокол клинических испытаний.

Тема 11: ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ

Горизонтальный перенос генов – это процесс, при котором организм передаёт генетический материал организму-непотомку. В *вертикальном переносе генов*, напротив, организм получает генетический материал от предка. Генетика занимается в основном простым вертикальным переносом генов.

Искусственный горизонтальный перенос генов используется в генной инженерии.

Случаи горизонтального переноса генов – попадания в организм фрагментов ДНК не от родителей, а извне, из окружающей среды, ученым известны, и многие из них описаны довольно хорошо.

Получить ДНК не от родителей, а откуда-то извне возможно. С началом эры массового секвенирования геномов и биоинформатики стало понятно, что горизонтальный перенос сыграл значительную роль в эволюции как прокариот (бактерий и архей), так и высших эукариот, например, растений.

Тем не менее, заполучить чужую ДНК не так-то просто, а наличие и количество, к примеру, бактериальной ДНК в геноме человека до сих пор остаётся дискуссионным вопросом.

Для того чтобы в геноме появился новый элемент, необходимо, чтобы новая ДНК попала в клетку и встроилась в

хромосому. Логично, что проще всего выполнить эти условия, если организм одноклеточный и у него нет дополнительной ядерной оболочки, защищающей геном. По всей видимости, прокариоты (бактерии и археи) действительно пользуются горизонтальным переносом очень активно – для них это еще и аналог полового процесса, позволяющий внести разнообразие в генетическую информацию, наряду со случайным мутагенезом.

Свидетельство того, что бактерии могут получать новые признаки прямо из среды, было найдено еще до прочтения первого генома и даже до открытия того факта, что ДНК является носителем информации. В 1928 г. Фредерик Гриффит обнаружил, что неопасный штамм пневмонийного стрептококка после инкубации с останками убитого вирулентного штамма также приобретает способность заражать мышей. Позже стало понятно, что исследуемый штамм захватывал из среды ДНК вирулентного «родственника» в процессе трансформации.

В норме крупные молекулы ДНК не могут пройти через бактериальную клеточную стенку и мембрану, однако многие виды бактерий способны входить в так называемое состояние компетентности, когда под действием специальных белков молекулы «затаскиваются» внутрь клетки, предварительно связавшись с рецепторами ДНК. Клетки становятся компетентными только в особых условиях, связанных, например, с лимитированием ресурсов, которое происходит, когда культура достигает критической плотности, или при повреждении ДНК.

В лаборатории свойство компетентности используют для того, чтобы искусственно доставлять ДНК в бактериальные клетки, а в природе к развитию компетентности и натуральной трансформации способны как минимум несколько десятков видов бактерий, среди которых множество патогенных. Как в случае с опытами Гриффита, внешним источником ДНК могут быть погибшие клетки, кроме того, некоторые бактерии выделяют её наружу намеренно, с использованием систем секреции.

Помимо трансформации, бактерии способны обмениваться ДНК путем конъюгации. Этот специализированный процесс передачи ДНК между клетками при непосредственном контакте был открыт на кишечной палочке в середине XX века. Для того чтобы передать ДНК, клетки кишечной палочки должны содержать небольшую кольцевую экстрахромосомную молекулу ДНК –

плазмиду, которая содержит гены, необходимые для конъюгации, и которая, собственно, и передается.

Конъюгация осуществляется с образованием половых пилей – белковых трубочек, при помощи которых устанавливается физический контакт. Кроме кишечной палочки, процесс был найден и у множества других бактерий. Помимо генов, необходимых для собственного распространения, конъюгативная плазида может содержать гены других полезных признаков, поддерживаемых отбором, например, устойчивости к антибиотикам (рис. 28).

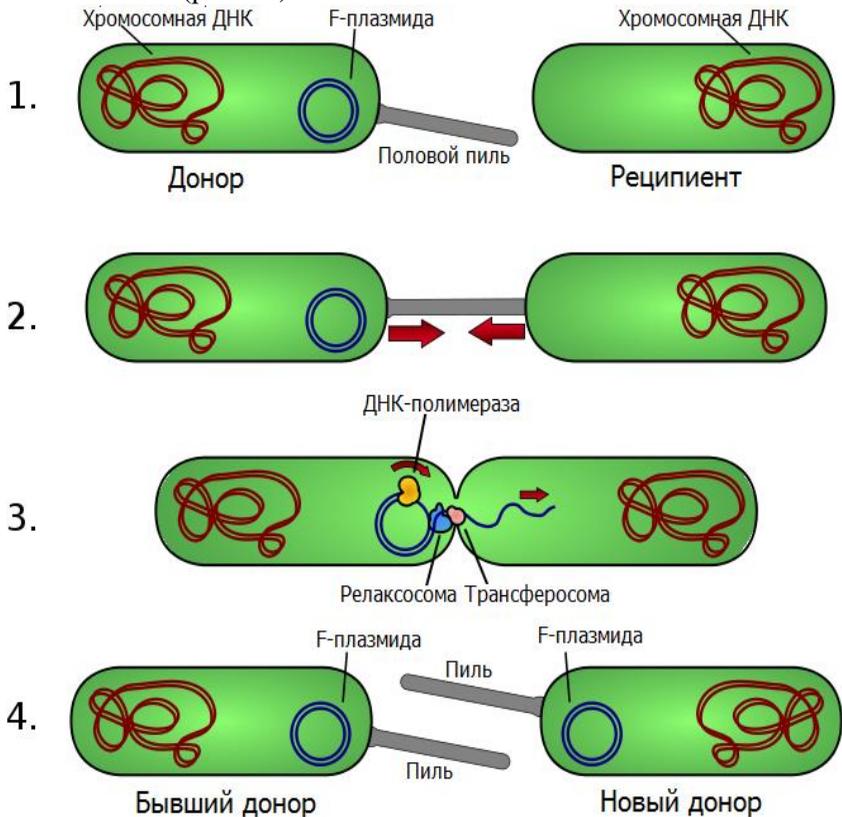


Рис. 28. Молекулярный механизм передачи F-плазмиды путем конъюгации у бактерий

Еще один распространенный механизм передачи генов путем горизонтального переноса – **трансдукция**, процесс передачи

ДНК при помощи вирусов – бактериофагов. При формировании вирусных частиц фаг захватывает часть хозяйской ДНК и при заражении других клеток может передать им чужие гены.

Встроить в геном можно не любую ДНК – в общем случае полученный фрагмент просто разрушится внутриклеточными ферментами – нуклеазами и рестриктазами, которые защищают клетку от вторжения. Обмен генами происходит чаще между близкородственными штаммами, у которых большой процент похожих последовательностей. В таком случае новый фрагмент ДНК может встроиться в геном по механизму гомологичной рекомбинации, для которой необходимо наличие одинаковых или близких по составу нуклеотидных последовательностей.

В других случаях ДНК может передаваться в составе мобильных элементов и плазмид. Эти элементы представляют собой кусочки «эгоистичной ДНК», которая содержит последовательности, необходимые для собственного копирования и встраивания. Такие кусочки могут встраиваться в геном при помощи сайт-специфической рекомбинации, для которой необходима определенная, иногда очень короткая последовательность в геноме. Показано, что чем больше в бактериальном геноме мобильных элементов, тем больше событий горизонтального переноса было в её истории.

Если существование горизонтального переноса было установлено еще до расшифровки последовательностей генома, то масштабы явления стали понятны только с наступлением эры секвенирования. Попытки построить для всех живых организмов универсальное филогенетическое дерево на основании последовательностей геномов привели к ряду филогенетических конфликтов. Нередко какие-то гены обнаруживаются там, где по логике эволюционного наследования, их быть не должно. Отсутствие гена у предков организма часто наводит исследователей на мысль, что он получен путем горизонтального переноса.

Расшифровка множества эукариотических геномов позволила предположить, что горизонтальный перенос сыграл важную роль в эволюции не только бактерий, но и одноклеточных эукариот, в частности, простейших, а также водорослей и высших растений, многих беспозвоночных животных.

У прокариот механизмы доставки новых генов более или менее изучены и понятны, но у эукариот ДНК дополнительно защищена ядерной мембраной и белками-гистонами. Кроме того, если речь идет о многоклеточных организмах с половым размножением, то для того, чтобы закрепиться в поколениях, хромосома с новым элементом должна попасть в половые клетки. Таким образом, на пути горизонтального переноса у более сложных организмов, нежели бактерии, стоит множество барьеров. Поэтому в его наличие стоит верить только при существовании вероятного механизма передачи.

К примеру, установленный источник прокариотических генов в геномах растений – это эндосимбиоз. На заре эволюции растения «приютили» в своих клетках способных к фотосинтезу цианобактерий, которые со временем превратились в хлоропласты, передав заодно множество генов в ядерный геном хозяина. Похожая история случилась и с предками митохондрий, которые «делегировали» часть полномочий хозяйским эукариотическим клеткам.

Обмен генетической информацией между ядерным геномом и митохондриальным детектируют и в настоящее время, например, у человека он иногда наблюдается при злокачественном преобразовании клеток. Происходить это событие может, например, во время митоза, когда ядерная оболочка разрушается. Как при этом преодолевается барьер митохондриальной мембраны, не совсем понятно, скорее всего митохондрии просто деградируют, и митохондриальная ДНК выходит в цитоплазму.

Биологам известны и современные примеры эндосимбиоза и эндопаразитизма, сопровождающиеся горизонтальным переносом генов. К примеру, внутриклеточный симбионт членистоногих и некоторых червей-нематод бактерия вольбахия нередко встраивает небольшие части своего генома в геном хозяина. Вероятно, это происходит случайно в процессе репарации ДНК, и большой пользы хозяевам вольбахии от этого нет, так как большинство бактериальных генов при этом неактивны или превращаются в псевдогены, то есть необратимо ломаются.

Однако на примере других насекомых, сожительствующих с бактериями, известно, что симбионты могут помочь сменить хозяину экологическую нишу и избежать конкуренции за ресурсы путем «дарения» своих генов. Кофейный жук *Hypothenemus*

hamprei – опасный вредитель плодов кофе – приобрёл способность расщеплять кофе-специфичные полисахариды и питаться ими за счет заимствования гена *HhMAN1* у симбиотических бактерий. У родственников кофейного жука и других насекомых такого гена нет.

Помимо эндосимбиоза установленным механизмом передачи генов в эукариотические клетки является агротрансформация клеток растений бактериями *Agrobacterium tumefaciens*. Именно этот способ, позаимствованный в природе, используют генные инженеры для модификации растительных геномов. Агробактерии используют систему секреции типа IV для введения T1-плазмиды и комплекса специальных белков в растительную клетку. Внутри клетки белки помогают поместить плазмиду в ядро, где она интегрируется в геном путем незаконной рекомбинации и начинает экспрессировать продукты, необходимые бактериям. В результате на растении образуются опухоли, известные как корончатые галлы, где агробактерии живут и размножаются (рис. 29).

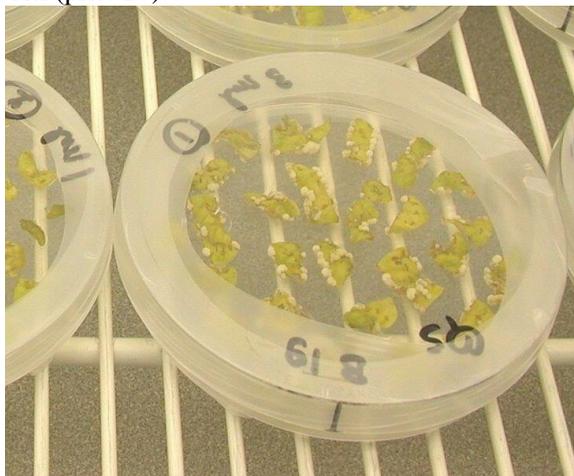


Рис. 29. Результат агробактериальной трансформации кусочков листа дикого картофеля *Solanum chacoense*

В менее достоверных случаях горизонтального переноса у эукариот насчет механизмов можно только строить гипотезы.

Тема 12: ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛОНИРОВАНИЯ

Огромное количество биологических исследований начинается с того, что в клетку вносится чужеродный генетический материал. Это действие называется **молекулярным клонированием**. С его помощью можно получить генетически модифицированные организмы, включить и выключить отдельные гены или определить роль конкретного белка в каком-нибудь процессе. Однако внедрить в клетку чужеродную ДНК не так-то просто: это длинный, трудоёмкий и многоэтапный процесс.

Вставка

Самый первый, очевидный шаг, который нужно сделать, – этот ген как-нибудь получить, причём желательно в больших количествах (поскольку все методики несовершенны, большая часть копий этого гена бесследно пропадет по дороге нецелевым способом). Чужеродный ген, вносимый в клетку, называется «геном-вставкой» или просто «вставкой». Получить его можно несколькими способами.

Во-первых, можно просто выделить его из того генома, к которому он принадлежит.

Во-вторых, вполне возможно, что нужный ген уже был выделен из генома и присутствует в библиотеке генов. **Генный банк** – тип биорепозитория, в котором сохраняется генетический материал. Тогда вставку можно будет получить оттуда (с этим, на самом деле, тоже придется повозиться, но меньше, чем в первом случае).

И наконец, в-третьих, не обязательно использовать в качестве вставки уже существующий ген; ген можно синтезировать искусственно.

Вектор

Запускание в клетку «одинокой» вставки (то есть, гена самого по себе, безо всякого сопровождения) – дело совершенно бесперспективное. В клетке плавают множество расщепляющих ДНК ферментов (нуклеаз), которые разрежут вставку на кусочки, в результате чего она исчезнет, не успев совершить ничего полезного, а клонирование провалится.

Поэтому, чтобы защитить вставку, её встраивают в специальное «транспортное средство», которое называется **вектором**. В самом элементарном случае **вектор** – это просто последовательность ДНК, в которую вшивается вставка, и которая помогает ей не пропасть в клетке и выполнить свое предназначение. Существует несколько видов векторов, но наиболее популярны *плазмиды*.

Плазмида

Плазмида – это короткая и обычно кольцевая молекула ДНК, которая плавает в цитоплазме бактериальной клетки. Плазмиды не связаны с бактериальной хромосомой, они могут реплицироваться независимо от неё, могут «выделяться» бактерией в окружающую среду или, наоборот, из этой окружающей среды «проглатываться» (рис. 30, 31).

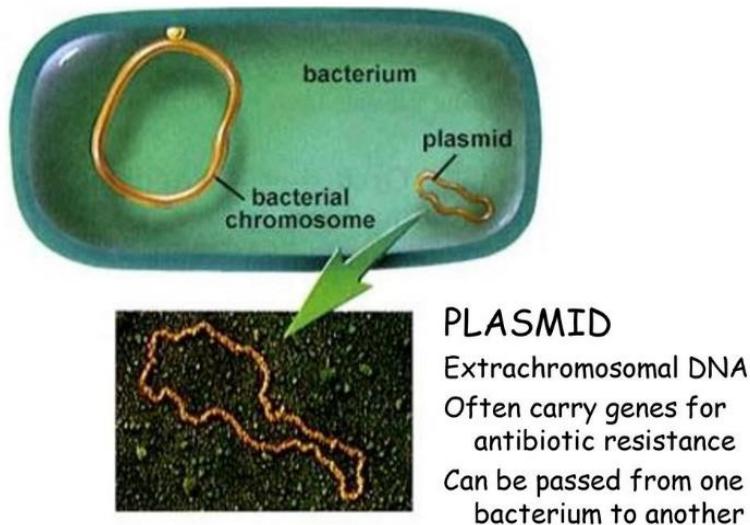


Рис. 30. Плазмида в бактериальной клетке

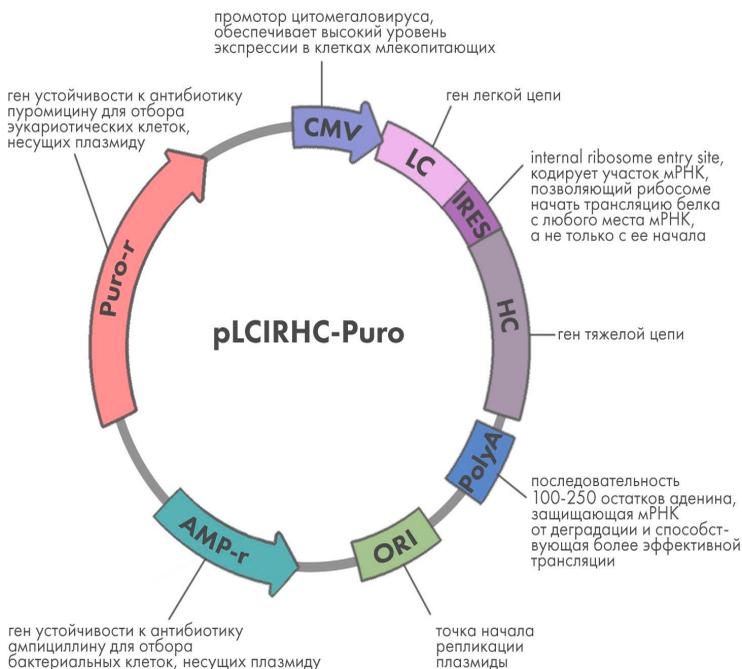


Рис. 31. Бактериальная плазмида

С помощью плазмид бактерии обмениваются друг с другом генетической информацией, – например, передают устойчивость к какому-нибудь антибиотику.

Плазмиды существуют внутри бактерий в естественных условиях, поэтому никто не может помешать исследователю искусственно синтезировать плазмиду, которая будет обладать нужными для него свойствами, вшить в неё вставку (или несколько) и запустить в клетку.

Для того, чтобы из плазмиды получился рабочий вектор, она должна обладать некоторыми важными характеристиками:

1. Размножение. Прежде всего, плазмида обязательно должна в клетке размножаться, реплицироваться, потому что иначе она быстро подвергнется деградации, а вместе с ней исчезнет и ген-вставка. Для этого в ней должна быть специальная последовательность под названием «точка начала репликации», с которой и начинается удвоение ДНК. У разных видов живых

существ эти точки имеют разную нуклеотидную последовательность. Поэтому, если нужно создать плазмиду, которая бы реплицировалась сразу в двух видах клеток (например, и в дрожжевых, и в бактериальных), то надо вставить в неё две точки начала репликации.

2. Разрезание. Кроме того, в ДНК плазмиды должны быть участки, в которых её можно будет разрезать, чтобы вшить туда вставку. В качестве «ножниц» используются особые ферменты – рестриктазы. Они прекрасны тем, что режут ДНК не где попало, а в строго определенных местах, которые называются сайтами рестрикции (каждая рестриктаза распознает только свой сайт и только в нём (или возле него) разрезает ДНК). Обычно в плазмиду ставят множество разных сайтов рестрикции, расположенных в разных точках, – благодаря этому её можно будет разрезать в нужном месте нужной рестриктазой. Участок ДНК, на котором собрано несколько сайтов рестрикции, называется *полилинкёром*.

3. Селекция. Процесс, при котором бактерия «глотаёт» плазмиду, называется *трансформацией*. В естественных условиях трансформироваться может в каждый момент времени не вся популяция бактерий, а только её часть – компетентные клетки. Существуют лабораторные методы, с помощью которых можно искусственно увеличить количество компетентных клеток, однако, все равно, стопроцентная компетентность для бактериальной культуры – вещь недостижимая.

Добавляя плазмиду к бактериям, нужно смириться с тем, что большая часть бактериальных клеток так и останется бесплазмидной, нетрансформированной. Поэтому придется отделять трансформированные клетки от всех остальных. Для этого используется простой приём: допустим, встроили в плазмиду ген устойчивости к какому-нибудь антибиотику (такой ген называется *селективным маркером*). Теперь клетки, которые «съели» плазмиду, будут неуязвимы для этого антибиотика и смогут спокойно жить в его присутствии. В результате, чтобы выделить из всех бактерий, к которым добавили плазмиду, те, которые смогли эту плазмиду использовать по назначению, достаточно будет добавить к бактериальной культуре соответствующий антибиотик. Те клетки, которые нужны исследователю, смогут существовать и делиться в присутствии этого антибиотика, а остальные этого делать не смогут.

Существуют и другие способы провести селекцию. Можно, например, поместить сайт рестрикции не внутрь гена антибиотика, а внутрь какого-нибудь «заметного» гена (скажем, такого, в присутствии которого бактериальные культуры меняют цвет). В результате можно будет отличить нужные колонии от ненужных просто на глаз, безо всяких манипуляций.

Если исследователь собирается работать только на бактериях, то всем вышесказанным дело и ограничится. Однако если конечная цель – внедрить вектор в эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), то предстоит еще один этап селекции.

В большинстве эукариотических клеток плазмиды живут недолго и быстро подвергаются деградации. Если вектор смог встроиться в геном (это событие очень редкое, но не невероятное), то вставка заработает в этой клетке – причём не только в клетке, но и во всех её потомках. И для того, чтобы выделить из всех клеток те, которые имеют вектор в своём геноме, понадобится еще один селективный маркер – ген устойчивости к какому-нибудь эукариотическому антибиотику (потому что бактериальные антибиотики, как правило, на клетки эукариот не действуют). Добавив соответствующий антибиотик (например, генетицин) к среде, в которой культивируются клетки, через некоторое время можно получить популяцию только тех клеток, в геноме которых есть встроенный вектор.

Промоторы

Перед каждым рабочим геном находится короткий участок ДНК под названием *промотор*. Именно сюда прикрепляется фермент РНК-полимераза, который синтезирует РНК на матрице ДНК, что является первым и абсолютно необходимым этапом в экспрессии гена. Если у гена нет промотора, его экспрессию запустить невозможно, и он так и останется «молчащим». В плазмиде обязательно должен быть хотя бы один промоторный участок, под контроль которого можно будет поставить ген-вставку.

Подобрав в плазмиду подходящий промотор, исследователь сможет делать с экспрессией гена-вставки почти всё, что ему нужно. Например, сделать так, чтобы он экспрессировался сильно только в мышечных клетках и только в ответ на повышение температуры.

Трансляция белка

Внедряя вектор в клетку, ученый может хотеть двух разных вещей:

1) чтобы происходила только транскрипция гена-вставки (то есть, синтез РНК на матрице ДНК – например, этого достаточно, если в клетку вносится какая-нибудь некодирующая РНК);

2) чтобы происходила и транскрипция, и трансляция гена-вставки (то есть, экспрессия кодируемого вставкой белка).

В первом случае вектор называется транскрипционным, во втором – экспрессионным. Экспрессионные векторы обычно немного сложнее транскрипционных.

Когда подобраны все необходимые для плазмиды кусочки, мало просто соединить их вместе – огромную роль играет их взаимное расположение. Например, сайты рестрикции должны быть не только многочисленны и разнообразны, но и находиться в «правильных» местах. При этом надо стараться, чтобы итоговая плазида была как можно компактней, поскольку, во-первых, так она будет стабильнее, а во-вторых, охотнее поглотиться клеткой.

Плазмидные базы данных

За те несколько десятилетий, что существует методика молекулярного клонирования, были синтезированы тысячи разнообразных плазмид, из которых созданы базы данных, например, **AddGene** – *некоммерческая репозитория плазмид. Addgene облегчает обмен генетическим материалом между лабораториями, предлагая плазмиды и связанные с ними данные клонирования некоммерческим лабораториям по всему миру. Addgene предоставляет бесплатную онлайн-базу данных информации и ссылок на клонирование плазмид.* В этих базах есть плазмиды на все случаи жизни – с разными типами точек начала репликации, разными полилинкерами, разными селективными маркерами и промоторами и так далее. Есть те, в которые можно вшить не одну вставку, а несколько, а есть даже такие, которые уже несут в себе некоторые особенно популярные вставки. Поэтому, как правило, исследователи не синтезируют плазмиду для клонирования самостоятельно, а покупают уже готовую. При необходимости купленную плазмиду можно «довести до ума», вставив или убрав определённые участки (а потом эту модифицированную плазмиду тоже добавить в базу данных).

Иными словами, часто задача учёного сводится просто к тому, чтобы подобрать подходящую плазмиду.

Вставка гена в плазмиду

Допустим, исследователь подобрал подходящую плазмиду и получил нужную вставку. Теперь нужно соединить одно с другим, чтобы затем внедрить в клетки. Для этого достаточно совершить несколько простых действий.

В плазмиде существует несколько сайтов рестрикции – то есть, участков, в которых её может разрезать нужная рестриктаза. Нужно выбрать подходящий сайт, который будет находиться в том месте, куда нужно вшивать вставку, а затем обработать плазмиду соответствующей рестриктазой.

Соединив в одной пробирке плазмиду и вставку (предварительно очищенные от рестриктаз), нужно добавить к ним ДНК-лигазу, которая умеет лигировать (то есть, сшивает) две молекулы ДНК.

Внедрение вектора в клетку

Клетки, в которые исследователь собирается внедрить свой вектор, отказываются его поглощать.

Дело в том, что липидная мембрана, которой окружены клетки, обладает избирательной проницаемостью – то есть, она пропускает через себя одни частицы и не пропускает другие. Крупные заряженные молекулы (а именно такой и является ДНК) через эту мембрану самопроизвольно пройти не могут. И если бактерии, например, умеют проглатывать плазмиды из внешней среды, то клетки животных к этому совершенно не склонны. Поэтому для того, чтобы внедрить в клетку вектор, исследователю приходится прибегать ко множеству хитростей.

Для внесения в клетку вектора есть несколько обозначений в зависимости от того, какой используется вектор и в какие клетки он вносится.

1) **трансформация** – это внесение плазмид (и других невирусных векторов) в бактерии, а также клетки растений и грибов;

2) **трансфекция** – то же самое, что и трансформация, но только в применении к клеткам животных;

3) **трансдукция** – это внесение в любые клетки вирусного вектора.

Эти термины, в общем, не очень строгие. Например, даже в некоторых солидных статьях трансдукцию иногда называют вирусной трансфекцией (а то и просто трансфекцией).

Вещества-проводники

Самый простой и очевидный путь внесения в клетку генетического материала – соединить вектор с каким-нибудь переносчиком, у которого нет проблем с проникновением через мембрану, и позволить получившемуся комплексу проникнуть внутрь клетки. Это не отнимает много времени и не требует дорогостоящего оборудования. Такой способ обычно называют химической трансфекцией.

Самый распространенный способ продырявливания мембраны называется электропорацией. *Электропорация* – это создание пор в бислойной липидной мембране под действием электрического поля. Это явление используется в биотехнологии для внедрения макромолекул (обычно ДНК или РНК) в клетки млекопитающих, бактерий или растений. Дело в том, что у клеток, попавших в электрическое поле, в мембране возникают отверстия (которые получаются тем больше, чем сильнее приложенное к клеткам поле). Если эти отверстия малы, то клетка сможет «залечить» их; если же они слишком велики, то клетка погибнет из-за необратимого нарушения целостности мембраны. Поэтому эмпирическим путем можно подобрать оптимальную величину поля для того, чтобы клетки, с одной стороны, продырявились, а с другой – остались в живых. А когда клетки продырявлены, то добавленный к ним вектор проникает сквозь отверстия и оказывается в цитоплазме.

В общем виде весь процесс можно представить следующим образом (рис. 32).

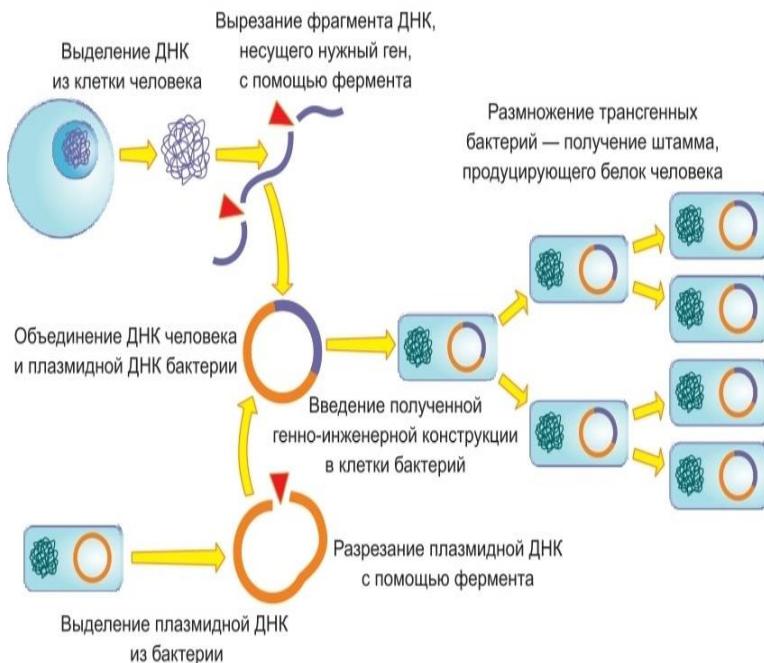


Рис. 32. Схема получения бактериального продуцента белка человека

Последний шаг

Остаётся последний шаг – нужно выбрать из всех клеток те, которые встроили векторную ДНК в свой геном, собственно, для этого и добавляли в вектор последний селективный маркер – ген устойчивости к антибиотику, работающему на эукариотических клетках. Нужно постоянно добавлять этот антибиотик в среду, в которой находятся клетки, – в результате останутся в живых и смогут делиться только те, которые имеют в геноме этот ген и всю созданную векторную ДНК. Таким образом, клонирование завершено. Получили линию генетически модифицированных клеток, в геноме которых присутствует вставка. Теперь с этими клетками можно проводить эксперименты.

ПРАКТИКУМ



Для успешного выполнения заданий и решения задач, предложенных в разделе «Практикум», студент должен:

а) знать:

- 1) строение ДНК и РНК;
- 2) базовую терминологию молекулярной биологии, необходимую для понимания и решения типовых задач;
- 3) правила комплементарности пар оснований;
- 4) правило Чаргаффа;
- 5) виды РНК и их классификацию;
- 6) среднюю массу нуклеиновых кислот и аминокислот;
- 7) расстояние между нуклеотидами в цепи ДНК.

б) уметь:

- 1) решать типовые задачи по молекулярной биологии;
- 2) объяснить ход решения типовой задачи;
- 3) пользоваться таблицей «Генетический код».

Типы задач в молекулярной биологии:

- 1) установление последовательности нуклеотидов в ДНК, и-РНК, антикодонов т-РНК, используя принцип комплементарности;
- 2) вычисление количества нуклеотидов, их процентное соотношение в цепи ДНК, и-РНК;
- 3) вычисление количества водородных связей в цепи ДНК, и-РНК;
- 4) определение длины, массы ДНК, и-РНК, гена;
- 5) определение последовательности аминокислот по таблице генетического кода;
- 6) определение количества аминокислот, нуклеотидов;
- 7) комбинированные задачи.

Требования к решению и оформлению задач:

1) ход решения должен соответствовать последовательности процессов, протекающих в клетке; в решении должны присутствовать пункты: *дано, решение, ответ*;

2) запись решения нужно оформлять аккуратно: цепи ДНК, и-РНК, т-РНК должны быть без переноса, символы нуклеотидов чёткие, печатными буквами;

3) ответы на поставленные вопросы должны быть *краткими*, ясными и исчерпывающими;

4) для решения задач Вам понадобится таблица «Генетический код» (Приложение 2).

Необходимая информация для решения задач:

1) один шаг спирали ДНК – это полный её виток, поворот на 360° ;

2) один шаг составляют 10 пар нуклеотидов;

3) длина одного шага – 3,4 нм;

4) расстояние между двумя нуклеотидами – 0,34 нм;

5) молекулярная масса одного нуклеотида – 345;

6) молекулярная масса одной аминокислоты – 100.

Рекомендуемые задания к практическим занятиям

Практическое занятие № 1: Молекулярные основы наследственности

Выполните задания:

1. Приведите структурные формулы аденина, гуанина, тимина, цитозина и урацила. Укажите их химические и физические свойства;
2. Схематично изобразите нуклеозид и нуклеотид;
3. Схематично изобразите структуру АМФ, АДФ и АТФ;
4. Схематично изобразите фрагмент одной полинуклеотидной цепи молекулы ДНК;
5. Схематично изобразите комплементарные взаимодействия азотистых оснований;
6. Схематично изобразите формы ДНК: А-, В- и Z-форма;
7. Укажите физико-химические свойства ДНК.

Практическое занятие № 2: Аминокислоты, белки. Оптическая изомерия аминокислот

Выполните задания:

1. Схематично изобразите пространственную структуру белка: первичную, вторичную, третичную и четвертичную;
2. Заполните таблицу.

Таблица

<i>n/n</i>	<i>Аминокислоты</i>	<i>Международная аббревиатура</i>

Примечание: незаменимые аминокислоты должны быть выделены.

3. Какие белки называются фибриллярными, а какие глобулярными?
4. Укажите основные функции белков;
5. Дайте определение термину «стереохимия органических молекул»;
6. Белок – полимер, мономер белка – аминокислота (стереоизмер); в природе существуют две формы стереоизомеров:

L (левовращающие) и D (правовращающие). Опишите эти две формы, схематично изобразите, приведите примеры аминокислот, которые относятся к этим формам.

Практические занятия № 3, 4: Синтез функционального продукта гена

Выполните задания:

1. Современное состояние центральной догмы молекулярной биологии;
2. Свойства генетического кода. Нарисуйте схему организации генетического кода и процесса реализации наследственной информации;
3. Активация аминокислот в клетке;
4. Нарисуйте схему синтеза и-РНК. Где он происходит?
5. Молекулярная организация рибосом;
6. Инициация, элонгация и терминация синтеза полипептидной цепочки;
7. Посттрансляционная модификация белков;
8. Белки – факторы транскрипции. Понятие об эпигенетической регуляции экспрессии генов;
9. Гормональная регуляция экспрессии генов. Контроль на уровне трансляции и посттрансляционных процессов.

Практическое занятие № 5: Установление последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК

Решите задачи:

1. Одна из цепочек молекулы ДНК имеет такую последовательность: АГТАЦЦГАТАЦТЦГАТТТАЦГ. Какую последовательность нуклеотидов имеет вторая цепочка, той же молекулы?
2. Укажите порядок нуклеотидов в цепочке ДНК, образующейся путем самокопирования цепочки: ЦАЦЦТАЦАГААТЦГЦТГАТ.
3. В лаборатории исследован участок одной из цепочек молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты. Оказалось, что он состоит из 20 мономеров, которые расположены в такой

последовательности: ГТГТААЦГАЦЦГАТАЦТГТА. Что можно сказать о строении соответствующего участка второй цепочки той же молекулы ДНК?

4. Напишите последовательность нуклеотидов ДНК дополнительно к следующей: АГГЦЦТАГГЦТААТАГЦЦГТ.

5. Укажите последовательность мономеров участка молекул: ДНК, кодирующего участок молекулы белка глюкоагона, в котором аминокислоты следуют друг за другом в таком порядке: треонин – серин – аспарагин – тирозин – серин – лизин – тирозин.

6. Цепочка аминокислот белка рибонуклеазы имеет следующее начало: лизин – глутамин – треонин – аланин – аланин – аланин – лизин. С какой последовательности нуклеотидов начинается ген, соответствующий этому белку?

7. Какой последовательностью нуклеотидов ДНК кодируется участок белка, если он имеет следующее строение: пролин – валин – аргинин – пролин – лейцин – валин – аргинин?

8. Большая из двух цепей белка инсулина (так называемая цепь В) начинается со следующих аминокислот: фенилаланин – валин – аспарагин – глутаминовая кислота – гистидин – лейцин. Напишите последовательность нуклеотидов в начале участка молекулы ДНК, хранящего информацию об этом белке.

9. Меньшая цепочка мономеров в молекуле инсулина (так называемая цепь А) заканчивается такими аминокислотами: лейцин – тирозин – аспарагин – тирозин – цистеин аспарагин. Какой последовательностью нуклеотидов ДНК заканчивается соответствующий ген?

10. С какой последовательности аминокислот начинается белок, если он закодирован такой последовательностью нуклеотидов: АЦГЦЦАТГГЦЦГТ. А каким станет начало цепочки аминокислот синтезируемого белка, если под влиянием облучения седьмой нуклеотид окажется выбитым из молекулы ДНК?

Практическое занятие № 6:
Установление последовательности
нуклеотидов в молекулах ДНК и РНК

Решите задачи:

1. Участок гена имеет следующее строение: ЦГГЦГЦТЦААААТЦГ. Укажите строение соответствующего участка того белка, информация о котором содержится в данном гене. Как отразится на строении белка удаление из гена четвёртого нуклеотида?

2. Определите порядок следования друг за другом аминокислот в участке молекулы белка, если известно, что он кодируется такой последовательностью нуклеотидов ДНК: ТГАТГЦГТТТТАТГЦГЦ. Как изменится ответ, если химическим путём из молекулы ДНК будут удалены девятый и двенадцатый нуклеотиды?

3. Назовите последовательные мономеры участка молекулы белка, который синтезируется на основе информации, записанной в молекуле ДНК таким порядком нуклеотидов: ТЦТЦЦАААААГАТА. Как отразится на строении белка удаление из молекулы ДНК пятого нуклеотида?

4. На фрагменте одной цепи ДНК нуклеотиды расположены в последовательности: АГТАЦГГЦАТГГАГЦ. Нарисуйте схему структуры двухцепочечной молекулы ДНК. Какова длина в нанометрах этого фрагмента? Какова масса двухцепочечного фрагмента?

5. Фрагмент первой цепи ДНК имеет такую нуклеотидную последовательность: ТАЦАГАТГГАГТЦГЦ. Определите последовательность мономеров белка, закодированного фрагментом второй цепи ДНК.

6. Биохимический анализ показал, что и-РНК имеет 30 % аденина, 18 % гуанина и 20 % урацила. Определите долю (в %) каждого нуклеотида в соответствующем фрагменте двухцепочечной ДНК?

7. Белок состоит из 124 аминокислот. Сравните относительные молекулярные массы белка и гена, который его кодирует.

8. Гормон роста человека (соматотропин) – это белок, содержащий 191 аминокислоту. Сколько нуклеотидов и триплетов входит в состав гена соматотропина?

9. Фрагмент цепи молекулы ДНК содержит 1 100 нуклеотидов, из них 100, 120 и 130 нуклеотидов образуют интронные участки. Определите, сколько аминокислот кодирует этот фрагмент ДНК?

10. Структурный ген (фрагмент молекулы ДНК) содержит 384 цитозиновых нуклеотидов, составляет 20 % от их общего количества. В экзонных участках этого гена закодировано белок, состоящий из 120 аминокислотных остатков. Какой нуклеотидный состав гена? Какая относительная молекулярная масса интронных участков гена? Насколько зрелая и-РНК короче про-и-РНК?

Практическое занятие № 7: Комбинированные задачи

Решите задачи:

1. В гене на интроны приходится 40 %. Определите количество аминокислот в белке и длину про-и-РНК, если на интроны приходится 180 триплетов?

2. Определить, что опаснее с точки зрения последствий: выпадение первого, среднего или последнего нуклеотида в цепи ДНК? Показать на примере структурного гена.

3. Представлена часть белка: глицин – глутамин – метионин – треонин – тирозин. Подсчитайте соотношение аденин+тимин и гуанин+цитозин в участке ДНК, кодирующем данную последовательность аминокислот.

4. Исследования показали, что нуклеотидный состав и-РНК следующий: 30 % приходится на гуанин, 10 % – на цитозин, 16 % – на аденин и 44 % – на урацил. Определите процентный состав по нуклеотидам той части ДНК, слепком которой является изученная и-РНК.

5. Известно, что расстояние между нуклеотидами в цепочках ДНК составляет 34×10^{-11} м. Какую длину имеет ген, определяющий гемоглобин, включающий 287 аминокислот?

6. Как изменится белок, если в гене, его кодирующем – ТААААТАЦААЦЦАААТА, произошли мутации по типу выпадения 1, 12 и 17 нуклеотидов?

7. Исследования показали, что в и-РНК процентное соотношение азотистых соединений следующее: аденинов 8 %; гуанинов 22 %; цитозинов 26 %; урацилов 44 %. Определите процентное соотношение нуклеотидов в соответствующей этой и-РНК, ДНК.

8. Подсчитайте соотношение аденин+тимин и гуанин+цитозин в ДНК, которая определяет следующую последовательность аминокислот: лизин – валин – триптофан – фенилаланин – валин – метионин.

9. Известно, что в состав определенного гена входит 3 интрона (27, 24 и 36 нуклеотидов) и 4 экзона (по 66 нуклеотидов каждый). Определите количество аминокислот в белке, закодированном в этом гене, и число кодонов в про-и-РНК.

10. Определить антикодоны т-РНК, участвующие в синтезе белка, начальный участок которой имеет следующее строение: аланин – серин – треонин – цистеин – тирозин – валин – аргинин.

11. При биосинтезе белка к рибосоме последовательно доставлены аминокислоты т-РНК: УУУ; ГЦА; УУУ; УЦУ; УГА; ЦАА. Какой полипептид получился?

Практические занятия № 8, 9: Комбинированные задачи

Решите задачи:

1. Какая последовательность аминокислот зашифрована в следующем участке ДНК: АЦАТТТАГЦТГГААТЦАА?

2. Смысловая нить ДНК, соответствующая гену вазопрессина (гормона гипофиза, повышающего кровяное давление), содержит следующую последовательность нуклеотидов: АЦААТААААЦТТЦТААЦАГГАГЦАЦЦА. Определите последовательность нуклеотидов во второй нити ДНК; последовательность нуклеотидов в и-РНК, число аминокислот, входящих в состав вазопрессина.

3. В настоящее время известно много редких форм гемоглобина, у которых в результате мутаций произошло замещение той или иной аминокислоты в α -цепи:

а) в α -цепи нормального гемоглобина А пятая и шестая аминокислоты представлены аланином. У гемоглобина Торонто пятая аминокислота аланин замещена аспарагином, у гемоглобина

Париж шестая аминокислота аланин заменена аспарагином. Определите участок ДНК, кодирующий пятую и шестую аминокислоты α -цепи, для нормального гемоглобина А и для гемоглобинов Торонто и Париж.

б) в α -цепи нормального гемоглобина А 15-я аминокислота представлена глицином, 16-я – лейцином. У гемоглобина Интерлакси–Оксфорд 15-я аминокислота глицин заменена аспарагином, у гемоглобина J 16-я аминокислота лейцин заменена глутамином. Определите участок ДНК, кодирующий 15-ю и 16-ю аминокислоты α -цепи, у нормального гемоглобина и у обоих измененных.

4. Четвертый пептид в нормальном гемоглобине (гемоглобин А) состоит из следующих аминокислот: валин – гистидин – лейцин – треонин – пролин – глутаминовая кислота – лизин.

а) у больного с симптомом спленомегалии при умеренной анемии обнаружили следующий состав четвертого пептида: валин – гистидин – лейцин – треонин – пролин – лизин – глутаминовая кислота – лизин. Определите изменения, произошедшие в ДНК, кодирующей четвертый пептид гемоглобина, после мутации.

б) у больного серповидноклеточной анемией состав аминокислот четвертого пептида гемоглобина следующий: валин – гистидин – лейцин – треонин – пролин – валин – глутаминовая кислота – лизин. Определите изменения в участке ДНК, кодирующем четвертый пептид гемоглобина, приведшие к заболеванию.

5. Как изменится структура белка, если из кодирующего его ДНК: ААТАЦАТТТАААГТЦ удалить 5-й и 13-й слева нуклеотиды?

6. Начальный участок цепи В инсулина представлен следующими аминокислотами: фенилаланин – валин – аспарагиновая кислота – глутамин – гистидин – лейцин – цистеин – глицин – серин – гистидин. Определите количественные соотношения А+Т и Г+Ц в цепи ДНК, кодирующей этот участок инсулина.

7. Какие изменения произойдут в строении белка, если в кодирующем его участке ДНК – ТААЦАААГААЦАААА между 10-м и 11-м нуклеотидами включить цитозин, между 13-м и 14-м – тимин, а на конце прибавить еще один аденин?

8. Участок ДНК, кодирующий полипептид, имеет в норме следующий порядок азотистых оснований: ААААЦЦААААТАЦТТАТАЦАА. Во время репликации третий слева аденин выпал из цепи. Определите структуру полипептидной цепи, кодируемой данным участком ДНК, в норме и после выпадения аденина.

9. Исследования показали, что 34 % общего числа нуклеотидов данной и-РНК приходится на гуанин, 18 % на урацил, 28 % – на цитозин и 20 % – на аденин. Определите процентный состав азотокислых оснований двухцепочечной ДНК, слепком с которой является указанная и-РНК.

Практическое занятие № 10: Комбинированные задачи

Решите задачи:

1. Большая из двух цепей белка инсулина (цепь В) начинается со следующих аминокислот: фен–вал–асп–глу–гис–лей. Напишите последовательность нуклеотидов молекулы ДНК, хранящих информацию об этом участке белка.

2. Определите характер возможных нарушений в функционировании лактозного оперона в случае мутации в нуклеотидной последовательности промотора, узнаваемой РНК-полимеразой (исключает возможность специфического прикрепления этого фермента).

3. Опишите типы репарации ДНК.

4. Участок гена имеет следующее строение: 5'-ЦГГ-ЦГЦ-ТЦА-ААА-ТЦГ-3'. Укажите строение соответствующего участка того белка, информация о котором содержится в данном гене. Как отразится на строении белка удаление из гена 4-го нуклеотида?

5. Определите характер возможных нарушений в функционировании лактозного оперона в случае мутации в гене-регуляторе, которая привела к стабильной инактивации белка-репрессора.

6. Перечислите последовательность событий процесса трансляции в клетках эукариот.

7. Объясните причину ситуации, при которой ген

эукариотической клетки, занимающий участок ДНК размером в 2 400 пар нуклеотидов, кодирует полипептид, состоящий из 180 аминокислотных остатков.

8. Антикодоны молекул т-РНК содержат следующие нуклеотиды: АГУ ГЦА ЦГУ УАГ ААА УУА. Определите последовательность аминокислот, доставляемых в рибосому данными молекулами т-РНК.

Практическое занятие № 11: Комбинированные задачи

Решите задачи:

1. Опишите механизм негативной индукции лактозного оперона.

2. Сложный белок состоит из четырёх полипептидных цепей, количество аминокислот в каждой из них: 116, 134, 162, 148. Какова длина оперона, кодирующего данный белок, если его регуляторная часть содержит 372 нуклеотида?

3. Составьте схему прерывистой структуры гипотетического гена, состоящего из 5 экзонов и 4 интронов и кодирующего полипептид, включающий 300 аминокислотных остатков (относительные размеры отдельных экзонов и интронов можно выбрать произвольно).

4. Содержание нуклеотидов в цепи и-РНК составляет: цитозин – 20 %, аденин – 25 %, урацил – 23 %, гуанин – 32 %. Определите процентный состав нуклеотидов участка молекулы ДНК, являющейся матрицей для этой и-РНК.

5. Определите нуклеотидную последовательность и ориентацию концов фрагмента одной из нитей молекулы ДНК, если известна последовательность и ориентация комплементарного участка другой нити этой молекулы: 3'-А-Т-С-Г-Т-Т-С-Г-А-5'.

6. Составьте и опишите схему транскрипции гена эукариот.

7. Определите аминокислотный состав полипептида, который кодируется последовательностью и-РНК: ЦЦА, ЦЦУ, ГГУ, УУУ, ГГЦ.

8. Определите направление синтеза и нуклеотидную последовательность каждой из двух дочерних нитей, которые возникнут при репликации приведённого ниже двухцепочечного фрагмента ДНК:

3'-A-G-T-C-T-T-G-C-A-5'
5'-T-C-A-G-A-A-C-G-T-3'

Практические занятия № 12, 13: Комбинированные задачи

Решите задачи:

1. Вирусом табачной мозаики (РНК-содержащий вирус) синтезируется участок белка с аминокислотной последовательностью: ала – тре – сер – глу – мет–. Под действием азотистой кислоты (мутагенный фактор) цитозин в результате дезаминирования превращается в урацил. Какое строение будет иметь участок белка вируса табачной мозаики, если все цитидиловые нуклеотиды подвергнутся указанному химическому превращению?

2. Белок состоит из 100 аминокислот. Установите, во сколько раз молекулярная масса участка гена, кодирующего данный белок, превышает молекулярную массу белка, если средняя молекулярная масса аминокислоты – 110, а нуклеотида – 300.

3. Фрагмент молекулы ДНК содержит 1 230 нуклеотидных остатков. Сколько аминокислот будет входить в состав белка?

4. Сколько нуклеотидов содержит ген, кодирующий белок из 210 аминокислот? Определите число аминокислот, входящих в состав белка, число триплетов и число нуклеотидов в гене, который кодирует этот белок, если в процессе трансляции участвовало 30 молекул т-РНК.

5. Молекулярная масса полипептида составляет 40 000. Определите длину кодирующего его гена, если молекулярная масса одной аминокислоты в среднем равна 100, а расстояние между соседними нуклеотидами в цепи ДНК составляет 0,34 нм.

6. ДНК фага имеет молекулярную массу 10^6 . Сколько белков может быть в ней закодировано, если принять, что типичный белок состоит из 50 аминокислот? Определите, что имеет большую молекулярную массу – ген или белок.

7. Какую длину имеет участок молекулы ДНК, в котором закодирована первичная структура инсулина, если молекула инсулина содержит 51 аминокислоту, а один нуклеотид занимает 0,34 нм в цепи ДНК? Какое число молекул т-РНК необходимо для

переноса этого количества аминокислот к месту синтеза? (Следует учитывать, что одна т-РНК доставляет к рибосоме одну аминокислоту.) Ответ поясните.

8. Общая масса всех молекул ДНК в 46 хромосомах одной соматической клетки человека составляет около 6×10^{-9} мг. Определите, чему равна масса всех молекул ДНК в ядре при овогенезе перед началом деления, в конце телофазы мейоза I и мейоза II. Объясните полученные результаты.

9. Какое количество нуклеотидов содержится в и-РНК, кодирующей полипептид, молекулярная масса которого равна 27 кДа, если молекулярная масса одной аминокислоты в белке составляет примерно 100 Да? Килодальтон (кДа) – единица массы, равная 1000 дальтон. Масса большинства белков лежит в пределах от 10 до 100 кДа.

Практическое занятие № 14: Комбинированные задачи

Решите задачи:

1. На фрагменте одной цепи ДНК: А–А–Г–Т–Ц–Т–А–Ц–Г–Т–А–Т нарисуйте схему структуры двухцепочечной молекулы ДНК. Каким свойством вы руководствовались? Какова длина в нм этого фрагмента? Сколько (в %) содержится нуклеотидов в отдельности в этой цепи ДНК?

2. Какую длину имеет участок молекулы ДНК, в котором закодирована первичная структура инсулина, если молекула инсулина содержит 51 аминокислоту, а один нуклеотид занимает 0,34 нм в цепи ДНК? Какое число молекул т-РНК необходимо для переноса этого количества аминокислот к месту синтеза? (Следует учитывать, что одна т-РНК доставляет к рибосоме одну аминокислоту.) Ответ поясните.

3. Смысловая нить ДНК, соответствующая гену вазопрессина (гормона гипофиза, повышающего кровяное давление), содержит следующую последовательность нуклеотидов: АЦААТААААЦТТЦТААЦАГГАГЦАЦЦА. Определите последовательность нуклеотидов во второй нити ДНК; последовательность нуклеотидов в и-РНК, число аминокислот, входящих в состав вазопрессина.

4. Две цепи ДНК удерживаются водородными связями. Определите число двойных и тройных водородных связей в этой цепи ДНК, если известно, что нуклеотидов с аденином – 12, с гуанином – 20 в обеих цепях.

5. Известно, что расстояние между нуклеотидами в цепочках ДНК составляет 34×10^{-11} м. Какую длину имеет ген, определяющий белок, состоящий из 134 аминокислот?

6. Известно, что расстояние между нуклеотидами в цепочках ДНК составляет 34×10^{-11} м. Какую длину имеет ген, определяющий гемоглобин, включающий 287 аминокислот?

7. Известно, что расстояние между двумя соседними нуклеотидами в спирализованном состоянии молекулы ДНК, измеренной вдоль оси спирали, составляет 34×10^{-11} м. Какую длину имеют структурные гены, определяющие молекулу белка, включающего 112 аминокислот?

8. Какую длину имеет часть молекулы ДНК, кодирующая инсулин быка, если известно, что молекула инсулина белка имеет 51 аминокислоту, а расстояние между двумя соседними нуклеотидами в ДНК равно 34×10^{-11} м?

Практическое занятие № 15: Комбинированные задачи

Решите задачи:

1. Определенный белок содержит 400 аминокислот. Какую длину имеет ген, под контролем которого этот белок синтезируется, если расстояние между нуклеотидами составляет 0,34 нм?

2. В эукариотической клетке ген, хранящий информацию о белке, состоит из 648 пар нуклеотидов. Из них три участка по 70 пар нуклеотидов – не смысловые (интроны). Сколько т-РНК участвовало в сборке полипептида? Сколько нуклеотидов в матричной РНК? Какова масса всего белка?

3. Ген состоит из 540 нуклеотидов. Белок, кодируемый данным геном, состоит из 120 аминокислот. Определить длину и-РНК и количество интронов в про-и-РНК.

4. Ген имеет длину 2 040 Å. Белок состоит из 150 аминокислот. Какова длина интронов? Сколько нуклеотидов на них приходится?

5. В гене на интроны приходится 40 %. Определите количество аминокислот в белке и длину про-и-РНК, если на интроны приходится 180 триплетов?

6. Известно, что расстояние между нуклеотидами в цепочках ДНК составляет 34×10^{-11} м. Какую длину имеет ген, определяющий гемоглобин, включающий 287 аминокислот?

7. Подсчитайте длину гена, кодирующего следующий олигопептид: валин – лейцин – лейцин – глутамин – фенилаланин – триптофан – цистеин – триптофан – валин – глицин – лизин – аргинин – гистидин – метионин – аргинин – тирозин, если расстояние между нуклеотидами в ДНК равняется 34×10^{-11} м. Известно также, что при процессинге данного белка был вырезан интрон, состоящий из 12 нуклеотидов.

8. На фрагменте одной цепи ДНК нуклеотиды расположены в последовательности: АГТАЦГГЦАТГТАГЦ. Нарисуйте схему структуры двухцепочечной молекулы ДНК. Какова длина в нанометрах этого фрагмента? Какова масса двухцепочечного фрагмента?

Практические занятия № 16, 17: Комбинированные задачи

Решите задачи:

1. Молекулярная масса фрагмента ДНК составляет 90 000. Из общего числа нуклеотидов этого фрагмента на долю тиминовых приходится 85. Определите количество гуаниновых, цитозиновых и адениновых нуклеотидов в данном фрагменте ДНК. Какова длина этого фрагмента ДНК?

2. Известно, что все виды РНК синтезируются на ДНК-матрице. Фрагмент молекулы ДНК, на котором синтезируется участок центральной петли т-РНК, имеет следующую последовательность нуклеотидов: АТАГЦТГААЦГГАЦТ. Установите нуклеотидную последовательность участка т-РНК, который синтезируется на данном фрагменте, и аминокислоту, которую будет переносить эта т-РНК в процессе биосинтеза белка, если третий триплет соответствует антикодону т-РНК.

3. При синдроме Фанкони у больного с мочой выделяются аминокислоты, которым соответствуют кодоны в и-РНК: АУА–ГУЦ–АУГ–УЦА–УУГ–ГУУ–АУУ. Определите, выделение

каких аминокислот с мочой характерно для синдрома Фанкони, если у здорового человека в моче содержатся аминокислоты аланин, серин, глутаминовая кислота, глицин.

4. ДНК фага имеет молекулярную массу 106. Сколько белков может быть в ней закодировано, если принять, что типичный белок состоит из 50 аминокислот? Определите, что имеет большую молекулярную массу – ген или белок.

5. Общая масса всех молекул ДНК в 46 хромосомах одной соматической клетки человека составляет около $6-10^{-9}$ мг. Определите, чему равна масса всех молекул ДНК в ядре при овогенезе перед началом деления, в конце телофазы мейоза I и мейоза II. Объясните полученные результаты.

6. Две цепи ДНК удерживаются водородными связями. Определите число: двойных и тройных водородных связей в этой цепи ДНК, если известно, что нуклеотидов с аденином 12, с гуанином 20 в обеих цепях.

7. Установите правильную последовательность стадий транскрипции информационной РНК у эукариот:

- 1) присоединение нуклеотидов к растущей цепи РНК;
- 2) расплетение спиралей ДНК;
- 3) присоединение РНК-полимеразы к гену;
- 4) отсоединение предшественника РНК;
- 5) созревание молекулы РНК;
- 6) выход РНК из ядра.

8. Установите последовательность стадий трансляции:

1) движение малой субъединицы рибосомы вдоль и-РНК до старт-кодона;

2) присоединение первой т-РНК и большой субъединицы рибосомы;

- 3) сдвиг рибосомы на один триплет;
- 4) присоединение следующей т-РНК;
- 5) образование пептидной связи;
- 6) присоединение малой субъединицы рибосомы к и-РНК.

9. Установите последовательность процессов, происходящих при биосинтезе белка:

- 1) сплайсинг и-РНК в ядрышке;
- 2) нанизывание рибосомы на и-РНК;
- 3) синтез и-РНК в ядре;
- 4) поступление и-РНК в цитоплазму;

5) сравнение кодона и-РНК и антикодона т-РНК в функциональном центре рибосомы;

6) образование пептидной связи между аминокислотами.

10. Исходный фрагмент молекулы ДНК имеет следующую последовательность нуклеотидов (верхняя цепь – смысловая, нижняя – транскрибируемая):

5' – Г Ц Г Г Г Ц Т А Т Г А Т Ц Т Г – 3'

3' – Ц Г Ц Ц Ц Г А Т А Ц Т А Г А Ц – 5'

В результате замены одного нуклеотида в ДНК четвёртая аминокислота во фрагменте полипептида заменилась на аминокислоту Вал. Определите аминокислоту, которая кодировалась до мутации. Какие изменения произошли в ДНК, и-РНК в результате замены одного нуклеотида? Благодаря какому свойству генетического кода одна и та же аминокислота у разных организмов кодируется одним и тем же триплетом? Ответ поясните. Для выполнения задания используйте таблицу генетического кода.

11. Некоторые вирусы в качестве генетического материала несут РНК. Такие вирусы, заразив клетку, встраивают ДНК-копию своего генома в геном хозяйской клетки. В клетку проникла вирусная РНК следующей последовательности:

5' – Г У Г А Г Г А Ц Ц У Ц Г – 3'. Определите, какова будет последовательность вирусного белка, если матрицей для синтеза и-РНК служит цепь, комплементарная вирусной РНК. Напишите последовательность двуцепочечного фрагмента ДНК, укажите 5' и 3' концы цепей. Ответ поясните. Для решения задания используйте таблицу генетического кода.

Практические занятия № 18, 19: Комбинированные задачи

1. Сколько витков имеет участок двойной спирали ДНК, контролирующей синтез белка с молекулярной массой 30 000, если молекулярная масса одной аминокислоты составляет в среднем 100, а на один виток спирали ДНК приходится 10 нуклеотидов.

2. Хромосомный набор соматических клеток зелёной лягушки равен 26. Определите хромосомный набор и число молекул ДНК в одной из половых клеток в профазе мейоза I, в метафазе мейоза I и анафазе мейоза II. Объясните, какие процессы

происходят в эти периоды и как они влияют на изменение числа ДНК и хромосом.

3. В процессе гликолиза образовалось 38 молекул пировиноградной кислоты. Какое количество молекул глюкозы подверглось расщеплению и сколько молекул АТФ образуется при их полном окислении?

4. В биосинтезе полипептида участвовали т-РНК с антикодонами ААУ, ЦЦГ, ГЦГ, УАА, ГЦА. Определите нуклеотидную последовательность участка каждой цепи молекулы ДНК, который несёт информацию о синтезируемом белке, и число нуклеотидов, содержащих аденин (А), гуанин (Г), тимин (Т) и цитозин (Ц) в двуцепочечной молекуле ДНК. Ответ поясните.

5. При трисомии X-хромосомы проявляется кариотип женщины – 47, XXX. Каковы причины появления такого хромосомного набора у человека?

6. В соматической клетке животного 38 хромосом, масса всех молекул ДНК в ней составляет 4×10^{-9} мг. Определите, чему равна масса всех молекул ДНК в яйцеклетке и в соматической клетке в период интерфазы (постсинтетический период) и после деления. Ответ поясните.

7. Фрагмент и-РНК имеет следующее строение: ГАУГАГУАЦУУЦААА. Определите антикодоны т-РНК и последовательность аминокислот, закодированную в этом фрагменте. Также напишите фрагмент молекулы ДНК, на котором была синтезирована эта и-РНК.

8. В молекуле ДНК содержится 31 % аденина. Определите, сколько (в %) в этой молекуле содержится других нуклеотидов.

9. В трансляции участвовало 50 молекул т-РНК. Определите количество аминокислот, входящих в состав образующегося белка, а также число триплетов и нуклеотидов в гене, который кодирует этот белок.

10. Фрагмент ДНК состоит из 72 нуклеотидов. Определите число триплетов и нуклеотидов в и-РНК, а также количество аминокислот, входящих в состав образующегося белка.

Практические занятия № 20, 21: Комбинированные задачи

Решите задачи:

1. Фрагмент одной из цепей ДНК имеет следующее строение: ГГЦТЦТАГЦТТЦ. Постройте на ней и-РНК и определите последовательность аминокислот во фрагменте молекулы белка (для этого используйте таблицу генетического кода).

2. Фрагмент и-РНК имеет следующее строение: ГЦУААУГУУЦУУУАЦ. Определите антикодоны т-РНК и последовательность аминокислот, закодированную в этом фрагменте. Также напишите фрагмент молекулы ДНК, на котором была синтезирована эта и-РНК (для этого используйте таблицу «Генетический код»).

3. Фрагмент ДНК имеет следующую последовательность нуклеотидов АГЦЦГАЦТТГЦЦ. Установите нуклеотидную последовательность т-РНК, которая синтезируется на данном фрагменте, и аминокислоту, которую будет переносить задания используйте таблицу генетического кода.

4. В клетке животного диплоидный набор хромосом равен 20. Определите количество молекул ДНК перед митозом, после митоза, после первого и второго деления мейоза.

5. В диссимиляцию вступило 15 молекул глюкозы. Определите количество АТФ после гликолиза, после энергетического этапа и суммарный эффект диссимиляции.

6. В цикл Кребса вступило 6 молекул пировиноградной кислоты. Определите количество АТФ после энергетического этапа, суммарный эффект диссимиляции и количество молекул глюкозы, вступившей в диссимиляцию.

7. В трансляции участвовало 75 молекул т-РНК. Определите число аминокислот, входящих в состав синтезируемого белка, а также число триплетов и нуклеотидов в гене, который кодирует данный белок.

8. Гаплоидный набор хромосом мягкой пшеницы составляет 21. Сколько хромосом содержится в клетках корня пшеницы, зародыша семени и эндосперма семени. Ответ поясните.

9. Диплоидный набор хромосом шимпанзе равен 48. Определите число молекул ДНК в клетках шимпанзе: 1) в начале

деления клетки; 2) после окончания митоза; 3) после окончания мейоза.

10. В клетке животного диплоидный набор хромосом равен 34. Определите количество молекул ДНК перед митозом, после митоза, после первого и второго деления мейоза.

Практические занятия № 22, 23: Комбинированные задачи

Решите задачи, выполните задания:

1. В молекуле ДНК на долю цитозиновых нуклеотидов приходится 18%. Определите процентное содержание других нуклеотидов, входящих в молекулу ДНК.

2. Внесите необходимую информацию о механизме репликации ДНК в соответствующие колонки таблицы, содержащей перечень некоторых белков и ферментов, участвующих в процессе репликации:

Таблица

Ферменты репликации

Белки	Функции в вилке репликации	Этап репликации
Геликаза Дестабилизирующие белки (ssb) ДНК-полимераза Лигаза РНК-праймаза		

3. Опишите механизм позитивной индукции лактозного оперона.

4. В препаратах ДНК, выделенной из клеток туберкулезных бактерий, содержание аденина составило 15,1 % от общего количества оснований. Определите примерное количество гуанина, тимина и цитозина в этой ДНК.

5. Определите возможное число информационных триплетов в участке молекулы ДНК, состоящем из 360 пар нуклеотидов, если молекула и-РНК содержит 300 нуклеотидов.

6. Опишите строение бактериофага λ . Какие особенности имеет первичная структура его молекулы ДНК?

7. Исследования показали, что 34 % от общего числа нуклеотидов и-РНК приходится на гуанин, 18 % – на урацил, 28 % – на цитозин, 20 % – на аденин. Определите процентный состав азотистых оснований двухцепочечной ДНК, копией которой является указанная и-РНК.

8. Опишите схему общей трансдукции между линиями *E. coli* с участием бактериофага λ .

9. Участок молекулы белка имеет строение: про–лиз–гис–вал–тир. Сколько возможных вариантов строения фрагмента молекулы ДНК кодирует эту часть молекулы белка?

10. Используя таблицу генетического кода, составьте схему, демонстрирующую принцип коллинеарности полинуклеотида (участка и-РНК) и кодируемого им полипептида. На основе этой схемы проиллюстрируйте некоторые из принципов генетического кода (триплетность, неперекрываемость, непрерывность).

Практические занятия № 24, 25: Энергетический обмен клетки

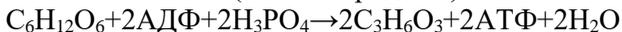
Чтобы решить задачу на энергетический обмен, нужно знать этапы обмена, уравнения реакции и соотношения количеств веществ в этих реакциях.

Уравнения реакций этапов энергетического обмена:

1 этап – подготовительный:

полимеры → мономеры

2 этап – гликолиз (бескислородный):



3 этап – кислородный:



Суммарное уравнение:



Решите задачи:

1. В процессе энергетического обмена в клетке образовалось 78 молекул АТФ и 12 молекул углекислого газа. Определите количество молекул глюкозы подвергшихся гликолизу и сколько из них окислению до конечных продуктов.

2. В процессе энергетического обмена в клетке образовалось 116 молекул АТФ и затрачено 18 молекул кислорода. Определите количество молекул глюкозы подвергшихся гликолизу и сколько из них окислению до конечных продуктов.

3. Расщеплению и окислению подверглось 6 молекул глюкозы, на это расходовалось 24 молекулы кислорода. Определите, сколько молекул воды и углекислого газа выделилось при этом.

4. Расщеплению и окислению подверглось 8 молекул глюкозы, на это расходовалось 18 молекулы кислорода. Определите, сколько молекул воды и углекислого газа выделилось при этом.

5. Гликолизу подверглось две молекулы глюкозы, окислению только одна. Определите количество образованных молекул АТФ и выделившихся молекул углекислого газа при этом.

6. В процессе гликолиза образовались 102 молекулы пировиноградной кислоты. Какое количество молекул глюкозы подверглось расщеплению и сколько молекул АТФ образуется при полном окислении глюкозы в клетках эукариот? Ответ поясните.

7. В процессе гликолиза образовалось 74 молекулы пировиноградной кислоты. Какое количество молекул глюкозы подверглось расщеплению и сколько молекул АТФ образуется при её полном окислении? Объясните полученные результаты.

8. В процессе кислородного этапа катаболизма образовалось 1440 молекулы АТФ. Определите, какое количество молекул глюкозы подверглось расщеплению и сколько молекул АТФ образовалось в результате гликолиза и полного окисления? Ответ поясните.

9. В процессе гликолиза образовались 98 молекул АТФ. Какое количество молекул глюкозы подверглось расщеплению и сколько молекул АТФ образуется в ходе кислородного этапа катаболизма и при полном окислении глюкозы в клетках эукариот? Ответ поясните.

10. В процессе гликолиза образовались 56 молекул АТФ. Какое количество молекул глюкозы подверглось расщеплению и сколько молекул АТФ образуется в ходе кислородного этапа катаболизма и при полном окислении глюкозы в клетках эукариот? Ответ поясните.

11. В процессе гликолиза образовалось 42 молекулы пировиноградной кислоты. Какое количество молекул глюкозы подверглось расщеплению и сколько молекул АТФ образуется при полном окислении?

12. В процессе кислородного этапа катаболизма образовалось 1116 молекулы АТФ. Определите, какое количество молекул глюкозы подверглось расщеплению и сколько молекул АТФ образовалось в результате гликолиза и полного окисления? Ответ поясните.

Практические занятия № 26, 27: Комбинированные задачи

Выполните задания:

1. Укажите схему расщепления нуклеиновых кислот;
2. Перечислите пуриновые и пиримидиновые основания;
3. Укажите основные заболевания, обусловленные нарушением обмена пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов в организме человека, заполнив таблицу.

Таблица

Заболевания, связанные с нарушением
обмена нуклеотидов

<i>Заболевания</i>	<i>Симптомы</i>	<i>Биохимические нарушения</i>
<i>Нарушение обмена пуриновых нуклеотидов</i>		
<i>Нарушение обмена пиримидиновых нуклеотидов</i>		

4. Обмен нуклеиновых кислот. Катаболизм и анаболизм нуклеотидов;

5. Как осуществляется регуляция синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов?

6. Укажите и схематично изобразите нуклеотиды в составе коферментов.

Практические занятия № 28, 29:
Регуляция клеточного цикла клетки.
Апоптоз

Выполните задания:

Кратко дайте ответы на вопросы:

1. Клеточный цикл клетки. Зарисуйте схему клеточного цикла;
2. Контрольные точки клеточного цикла;
3. Митотический цикл и его регуляция. Зарисуйте схему митотического цикла;
4. Мейотический цикл и его регуляция. Зарисуйте схему мейотического цикла;
5. Апоптоз: определение и механизм;
6. Фазы апоптоза;
7. Регуляция апоптоза;
8. Значение апоптоза в развитии организма и патологических процессах;
9. Старение и апоптоз;
10. Фармакологическая коррекция апоптоза.

Практическое занятие № 30:
Онкогенез

Выполните задания:

Кратко дайте ответы на вопросы:

1. Онкогенез клетки: определение, этапы процесса;
2. Теории возникновения новообразований. Мутационная теория;
3. Генетические механизмы онкогенеза;
4. Биологические аспекты онкогенеза;
5. Общая характеристика генов, берущих участие в канцерогенезе: вирусные онкогены, протоонкогены, гены-супрессоры опухолей, гены-мутаторы;
6. Канцерогенные факторы: химические, физические, комбинированные канцерогены;
7. Биологические канцерогены.

ТЕМЫ РЕФЕРАТОВ

1. Молекулярная биология, её характеристика как науки. Задачи молекулярной биологии в познании основных закономерностей жизнедеятельности. Современные направления молекулярной биологии: геномика и протеомика.

2. Методы молекулярной биологии: рентгеноструктурный анализ, электронная микроскопия, генно-инженерные методы, молекулярное клонирование.

3. Методы выделения белков. Методы выделения нуклеиновых кислот (фенольный, тризоловый, центрифугирование в градиенте CsCl и т.д.). Основные принципы определения первичной структуры ДНК: химический метод Гилберта и метод дидезокситерминаторов Сэнгера; модификации этих методов, используемые при анализе структуры РНК.

4. Молекулярная биология и медицина.

5. Секвенирование нуклеиновых кислот: исторический обзор, современные методики и возможности их применения.

6. Гель-электрофорез как метод качественного и количественного анализа нуклеиновых кислот и белков.

7. Структурно-функциональные изменения генома в клеточном цикле.

8. Точность воспроизведения ДНК. Полимеразы, участвующие в репликации, их ферментативная активность.

9. Репликация ДНК. Роль матрицы в репликации. Экспериментальные доказательства полуконсервативного механизма репликации. Образование межнуклеотидных фосфодиэфирных связей.

10. Лигазы, топоизомеразы, SSB-белки – участники репликации.

11. Особенности организации генома и реализации генетической информации у вирусов.

12. Транспорт полипептидных цепей в клетке.

13. Морфологическая и функциональная структура рибосом.

14. Псевдогены: структура, эволюция, биологическое значение.

15. Репарация ДНК.

16. Болезни человека, обусловленное наследственными дефектами репарационных систем.
17. Соматическая рекомбинация.
18. Транспозоны у эукариот.
19. Неканонические формы ДНК.
20. Онкогены.
21. Цитогены и прионы.
22. Иммуноглобулины: особенности генетического контроля и молекулярной структуры.
23. Молекулярные механизмы апоптоза.
24. Методы выделения нуклеиновых кислот и белков.
25. Методы анализа физико-химических свойств нуклеиновых кислот и белков.
26. Структура и функции фибриллярных и глобулярных белков.
27. Плазмиды и мобильные генетические элементы бактерий.
28. Генетические системы клеточных органелл.
29. Регуляция активности генов при созревании РНК.
30. Взаимодействие нуклеиновых кислот с биологически активными веществами.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ НАПИСАНИЯ РЕФЕРАТА



Реферат – печатная работа объёмом 9–12 страниц, выполняемая студентом в течение определенного срока. Реферат должен содержать основные фактические сведения и выводы по рассматриваемому вопросу. Предполагает самостоятельное изложение проблемы, собственное рассуждение автора на базе содержащихся в научной литературе сведений. Тему реферата можно выбрать самостоятельно из предложенного списка.

В реферате нужны развернутые аргументы, рассуждения, сравнения. Материал подаётся не столько в развитии, сколько в форме констатации или описания. Содержание реферируемого произведения излагается объективно от имени автора.

Источниками информации являются: научная литература, энциклопедии, словари, научные журналы и т.д.

Структура реферата:

1) **титульный лист** – является первой страницей работы; включается в общую нумерацию, но номер страницы на нём не ставится (Приложение 3);

2) **оглавление (содержание)**, в котором указаны названия всех разделов реферата и номера страниц, указывающие начало этих разделов в тексте реферата;

3) **введение**. Во введении даётся краткая характеристика изучаемой темы, обосновывается её актуальность;

4) **основная часть реферата.** В данном разделе должна быть раскрыта тема. В основной части, как правило, разделенной на главы (от 2 до 5), необходимо раскрыть все пункты составленного плана, связно изложить проанализированный материал;

5) **заключение.** В заключении подводятся итоги по всей работе, суммируются выводы;

6) **приложение** к реферату позволяет повысить уровень работы, более полно раскрыть тему. В состав приложений могут входить: графики, таблицы, фотографии и т.д. Приложения располагаются в конце всей работы. Каждое приложение начинается с нового листа, нумеруется, чтобы на него можно было сослаться в тексте;

7) **список литературы** завершает работу. Список составляется в алфавитном порядке по фамилиям авторов. Список литературы для реферата должен включать 5–15 позиций.

Правила оформления реферата:

При печатании текста реферата абзац должен равняться четырём знакам (1,25 см.).

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 интервала. Шрифт – Times New Roman, размер шрифта – 14 пт.

Текст выровнен по ширине.

Каждая структурная часть реферата (введение, главная часть, заключение и т.д.) начинается с новой страницы. Расстояние между главой и следующим за ней текстом составляет 1 интервал.

Сокращение слов в тексте – общепринятые (рисунок – рис., год – г. и т. д.).

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Составьте список исследователей, внёсших важный вклад в развитие одного из направлений молекулярной биологии.

2. Рассмотрите и опишите кратко суть работ, проведенных любым из отмеченных Вами ученых – специалистов в области молекулярной биологии.

3. Рассмотрите и опишите применение одного из методов для решения проблем молекулярной биологии на конкретном примере.

4. Назовите 2–3 монографии, посвященные проблемам молекулярной биологии, изданные за последние 5 лет.

5. Перечислите несколько названий научных журналов, в которых представлены работы по молекулярной биологии.

6. Приведите пример научной публикации, в которой использован один из конкретных методов молекулярной биологии. Для решения какого вопроса авторы работы использовали этот метод?

7. Подготовьте презентацию по одному из перечисленных заданий.

ГЛОССАРИЙ

Аннотация генома – маркировка генов и других объектов внутри них.

Ген – участок ДНК, кодирующий структуру одного белка.

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

Геном – хромосомный набор; совокупность качественно различных хромосом, образующих единое целое.

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

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 определенных клетках организма и на определенных стадиях его развития (большинство генов).

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

Денатурация – обратимый распад двухцепочечной структуры ДНК под действием высокой температуры или щелочной реакции среды.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, макромолекула, обеспечивающая хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы у многих организмов.

ДНК-библиотека (геномная библиотека) – набор ДНК-фрагментов всего генома организма. Эти ДНК-фрагменты фланкированы идентичными ДНК-адаптерами и содержат различные вставки генома.

ДНК-адаптеры – небольшие фрагменты ДНК известной последовательности, фланкирующие ДНК-библиотеку. Используются как участки, с которых начинается амплификация или секвенирование ДНК-библиотеки.

Инертная хромосома – хромосома, не проявляющая никакого видимого генетического эффекта.

Инициация – процесс, обеспечивающий начало репликации ДНК, транскрипции или синтеза полипептидной цепи белка на рибосоме.

Интрон – участок гена, который транскрибируется, а затем удаляется из предшественника РНК при сплайсинге, находится между двумя экзонами.

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.

Код генетический – порядок расположения нуклеотидов в молекуле ДНК, определяющий последовательность аминокислот в молекуле белка.

Кодон (триплет) – три расположенных друг за другом нуклеотидных остатка в цепи информационной РНК, кодирующие одну аминокислоту или являющиеся сигналом окончания трансляции.

Коллинеарность гена и продукта – линейное соответствие последовательности кодонов гена и последовательности аминокислот в белковом продукте (обнаружено в клетках прокариот).

Кэп (cap) – необычное основание (7-метилгуанозин), которое присоединяется к 5'-концу транскрипта (пре-и-РНК) в клетках эукариот. Модифицированный 5'-конец мРНК обеспечивает инициацию трансляции, удлиняет время жизни мРНК, защищая её от действия 5'-экзонуклеаз в цитоплазме.

Локус – место в хромосоме, в котором расположен ген.

Метилирование ДНК – своеобразная модификация молекулы ДНК путем присоединения метильной группы ($-CH_3$) к цитозину в составе cpg-динуклеотида. Один из способов регуляции работы генома без изменения нуклеотидной последовательности ДНК.

Нестабильный ген – ген, с высокой частотой мутаций.

Нуклеотиды (нуклеозидфосфаты) – низкомолекулярные вещества (мономеры), составляющие сложные биологические полимеры: соответственно РНК или ДНК. Нуклеотиды,

составляющие ДНК: аденин (А), тимин (Т), гуанин (G) и цитозин (С). В РНК вместо тимина присутствует урацил (U).

Оказаки фрагменты – относительно короткие фрагменты ДНК (с РНК-праймером на 5-конце), которые образуются в процессе репликации отстающей цепи ДНК.

Оператор – участок ДНК, с которым специфически связывается репрессор и предотвращает начало транскрипции с соседнего промотора.

Оперон – единица транскрипции генетического кода ДНК у прокариот, представляющая собой совокупность гена-оператора и структурных генов и обеспечивающая синтез какого-нибудь вещества организма.

Ориджин (англ. *origin* – начало, сайт **ori**) – сайт начала репликации в молекуле ДНК.

Плазмиды – кольцевые молекулы ДНК, способные размножиться (реплицироваться) в клетке независимо от ядра. Различают п. трансмиссивные, способные передаваться от клетки к клетке, и нетрансмиссивные.

Полимеразы – ферменты, способные использовать полинуклеотиды как матрицы и строить комплементарные им новые полинуклеотидные цепи.

Полипептид – полимер, состоящий из аминокислотных остатков, связанных пептидными связями.

Промотор – сигнальная последовательность ДНК, которую «узнает» молекула фермента РНК-полимеразы и соединяется с ней, чтобы начать транскрипцию.

Про-и-РНК (РНК-предшественник) – РНК, несущая информацию генетически активных и неактивных участков ДНК и являющаяся предшественником матричной РНК.

Протопласт – бактериальная, грибковая или растительная клетка, с которой специальными ферментами удалена оболочка.

Процессинг белка – сворачивание полипептидной цепи белка (фолдинг) и ковалентная химическая модификация белка (посттрансляционная модификация) после его синтеза на рибосоме.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) – молекулярно-биологический метод, позволяющий добиться колоссального (до 10^{12} раз) увеличения или амплификации числа копий определенного фрагмента ДНК *in vitro*.

Расщепление – появление в потомстве гетерозигот четко различимых категорий особей со специфическими особенностями.

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

Рекомбинация сайт-специфическая – широко распространена у прокариот и низших эукариот. Обмен фрагментами осуществляется между разными молекулами ДНК только в участках со строго определенными короткими нуклеотидными последовательностями, имеющими гомологичные участки (15–30 п.н.).

Рекомбинация – перегруппировка генов при образовании гамет у гибрида, ведущая к новым сочетаниям признаков у потомства.

Ренатурация – у ДНК; процесс, обратный денатурации, т. е. объединение комплементарных цепей в двойную спираль. У белков – восстановление исходной (нативной) структуры за счёт правильного образования всех внутренних связей (в том числе ковалентных S-S связей).

Репарация (от лат. *reparatio* – восстановление) – 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 (УФ-облучение, радиация) или химических агентов.

Репликационная вилка – участок ДНК, в котором дуплекс расплетается и одноцепочечные последовательности связываются дестабилизирующими ДНК-связывающими белками.

Репликация – синтез дочерних цепей ДНК на цепях исходной молекулы ДНК; главный участник этого процесса – ДНК-полимераза.

Репликон – функциональная единица репликации – сегмент (участок) ДНК, ограниченный точкой инициации репликации (сайт *ori*) и точкой окончания, в которой репликация останавливается.

Репрессор – белок, который присоединяясь к ДНК, делает её генетически неактивной (тормозит процесс транскрипции).

Ресеквенирование – повторное определение последовательности ДНК организма с уже расшифрованным

геномом (применяется, например, при поиске вариантов, связанных с наследственными заболеваниями у человека).

Рестриктазы – ферменты, расщепляющие ДНК по местам с определенной последовательностью нуклеотидов.

Рестрикты – фрагменты, кусочки ДНК, нарезанные рестриктазами.

Рецессивность – тот случай, когда аллель, обладающая этим свойством, подавляется при развитии доминантным признакам.

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

РНК – рибонуклеиновая кислота, макромолекула, образующаяся у многих организмов в результате считывания с ДНК (транскрипции), необходима в процессе синтеза белков, а также многочисленных регуляторных процессов в клетке. Также ответственна за хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы у некоторых вирусов.

Секвенирование ДНК или РНК – определение первичной последовательности нуклеотидов в составе макромолекул, несущих наследственную информацию.

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

Сплайсинг – процесс удаления интронов из предшественника РНК и объединение экзонов в зрелую ДНК.

Сплайсинг альтернативный – процесс формирования и-РНК путем удаления интронов и некоторых экзонов, находящихся между ними.

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

Трандукция – перенос ДНК от клетки к клетке плазмидами и фагами.

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.

Факторы транскрипции – специфические белки, с

помощью которых осуществляется регуляция транскрипции у эукариот.

Экзоны – части гена, в которых закодированы участки его продукта – РНК или белка; после выбрасывания интронов и сплайсинга экзоны оказываются связанными друг с другом в зрелой РНК.

Энхансер – регуляторный участок ДНК эукариотических клеток, усиливающий транскрипцию ближайшего гена в десятки и сотни раз; используется для повышения эффективности транскрипции и регуляции активности гена.

Энхансеры временные – регуляторные участки ДНК, активные только в определённое время развития организма.

Энхансеры тканеспецифичные – регуляторные участки ДНК, активные только в определённых клетках.

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. – 2000 с.
2. Биология. Под ред. В.Н. Ярыгина, в 2кн. – 3-ое изд. –М.: Высшая школа, 2000. – 742 с.
3. Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с.
4. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции / С.Г. Инге-Вечтомов. – М.: Высшая школа, 1989. – 591 с.
5. Льюин Б. Гены / Б. Льюин. – Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 896 с.
6. Павличенко В.И. Основы молекулярной биологии и генетики / В.И. Павличенко, В.А. Абрамов. – Запорожье: Издательство ЗГМУ, 2007. – 293 с.
7. Ригер Р. Генетический и цитогенетический словарь / Р. Ригер, А. Михаэлис. – М.: Колос, 1967. – 607 с.
8. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб: Изд-во СПбГТУ, 2002. – 521 с.
9. 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. Кларк Д. Молекулярная биология: простой и занимательный подход / Д. Кларк, Л. Рассел. – М.: КОНД, 2004. – 466 с.
3. Кнорре Д.Г. Биологическая химия / Д.Г. Кнорре, С.В. Мызина. М., 2000. – 479 с.

4. Коничев А.С. Молекулярная биология / А.С Коничев. – М.: Академия, 2003. – 400 с.
5. Криничная Н.В. Генетика : учебное пособие / И.Д. Соколов, П.К. Бойченко, М.В. Воронов. – Луганск : Книта, 2020. – 136 с.
6. Рис Э. Введение в молекулярную биологию / Э. Рис, М. Стернберг. – М.: Мир, 2002. – 142 с.
7. Спирин А.С. Молекулярная биология / А.С. Спирин. – Москва: Академия, 2011. – 496 с.
8. Фаллер Д.М. Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. Пер. с англ. – М.: Бином-Пресс, 2003. – 272 с.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярная биология оформилась как новое научное направление в 70-х годах 20 века, когда были в достаточной мере разработаны многие экспериментальные подходы и ряд методов для манипуляций с генетическим материалом, которые удалось автоматизировать. Другими компонентами, обеспечившими бурное развитие направления, явились подготовка достаточного числа высококвалифицированных кадров, расширение доступности необходимого оборудования и реагентов, а также развитие компьютерной техники и её программного обеспечения.

Учебная дисциплина «Молекулярная биология» является необходимой естественнонаучной базой для успешного усвоения медико-биологических дисциплин. В учебном пособии кратко изложен теоретический курс истории и методов молекулярной биологии, подробно рассмотрены основные направления изучения нуклеиновых кислот и белков; структура геномов про- и эукариот; повреждения и репарация структуры ДНК; молекулярные основы генетической рекомбинации; структура, процессинг и функции различных видов РНК; механизмы и принципы регуляции основных молекулярно-генетических процессов (репликации, транскрипции, трансляции). Значительное место отведено методам генетической инженерии, её достижениям и перспективам.

Практические занятия по «Молекулярной биологии» являются обязательным видом учебной деятельности и неотъемлемой частью освоения студентами дисциплины. В ходе выполнения заданий из раздела «Практикум» студент углубляет и закрепляет теоретические знания, полученные в ходе лекционного курса.

Данное пособие написано в соответствии с учебной программой по «Молекулярной биологии» и предназначено для студентов факультета естественных наук, изучающих дисциплину в рамках направлений подготовки 06.03.01 «Биология», профили: «Биомедицина и лабораторная диагностика», «Общая биология» и 44.03.05 «Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки)». «Химия. Биология».

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

**ДВАДЦАТЬ АМИНОКИСЛОТ,
ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ БЕЛКОВ**

<i>Сокращ. назв.</i>	<i>Аминокислота</i>	<i>Сокращ. назв.</i>	<i>Аминокислота</i>
Ала	Аланин	Лей	Лейцин
Арг	Аргинин	Лиз	Лизин
Асп	Аспарагин	Мет	Метионин
Асп	Аспарагиновая к-та	Про	Пролин
Вал	Валин*	Сер	Серин
Гис	Гистидин	Тир	Тирозин
Гли	Глицин	Тре	Треонин
Глн	Глутамин	Три	Триптофан
Глу	Глутаминовая к.	Фен	Фенилаланин
Иле	Изолейцин	Цис	Цистеин

Примечание: *– красным цветом в таблице выделены незаменимые аминокислоты.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

Терминаторы трансляции: UAA (Ochre), UAG (Amber), UGA(Opal).

Ала – аланин, арг – аргинин, асн – аспарагин, асп – аспарагиновая кислота, вал – валин, гис – гистидин, гли – глицин, глн – глутамин, глу – глутаминовая кислота, иле – изолейцин, лей – лейцин, лиз – лизин, мет – метионин, про – пролин, сер – серин, тир – тирозин, тре – треонин, три – триптофан, фен – фенилаланин, цис – цистеин.

		<i>Второй нуклеотид</i>					
		<i>U</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>G</i>		
<i>Первый нуклеотид (5' - конец)</i>	<i>U</i>	UUU <i>Фен</i>	UCU <i>Сер</i>	UAU <i>Тир</i>	UGU <i>Цис</i>	<i>U</i>	<i>Третий нуклеотид (3' - конец)</i>
		UUC <i>Фен</i>	UCC <i>Сер</i>	UAC <i>Тир</i>	UGC <i>Цис</i>	<i>C</i>	
		UUA <i>Лей</i>	UCA <i>Сер</i>	UAA <i>Стон</i>	UGA <i>Стор</i>	<i>A</i>	
		UUG <i>Лей</i>	UCG <i>Сер</i>	UAG <i>Стон</i>	UGG <i>Трип</i>	<i>G</i>	
	<i>C</i>	CUU <i>Лей</i>	CCU <i>Про</i>	CAU <i>Гис</i>	CGU <i>Арг</i>	<i>U</i>	
		CUC <i>Лей</i>	CCC <i>Про</i>	CAC <i>Гис</i>	CGC <i>Арг</i>	<i>C</i>	
		CUA <i>Лей</i>	CCA <i>Про</i>	CAA <i>Глн</i>	CGA <i>Арг</i>	<i>A</i>	
		CUG <i>Лей</i>	CCG <i>Про</i>	CAG <i>Глн</i>	CGG <i>Арг</i>	<i>G</i>	
	<i>A</i>	AUU <i>Иле</i>	ACU <i>Тре</i>	AAU <i>Асн</i>	AGU <i>Сер</i>	<i>U</i>	
		AUC <i>Иле</i>	ACC <i>Тре</i>	AAC <i>Асн</i>	AGC <i>Сер</i>	<i>C</i>	
		AUA <i>Иле</i>	ACA <i>Тре</i>	AAA <i>Лиз</i>	AGA <i>Арг</i>	<i>A</i>	
		AUG <i>Мет</i>	ACG <i>Тре</i>	AAG <i>Лиз</i>	AGG <i>Арг</i>	<i>G</i>	
<i>G</i>	GUU <i>Вал</i>	GCU <i>Ала</i>	GAU <i>Асп</i>	GGU <i>Гли</i>	<i>U</i>		
	GUC <i>Вал</i>	GCC <i>Ала</i>	GAC <i>Асп</i>	GGC <i>Гли</i>	<i>C</i>		
	GUA <i>Вал</i>	GCA <i>Ала</i>	GAA <i>Глу</i>	GGA <i>Гли</i>	<i>A</i>		
	GUG <i>Вал</i>	GCG <i>Ала</i>	GAG <i>Глу</i>	GGG <i>Гли</i>	<i>G</i>		

Оформление титульного листа

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
ЛУГАНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ЛУГАНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
«ЛУГАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ГОУ ВО ЛНР «ЛГПУ»)

Факультет естественных наук
Кафедра лабораторной диагностики, анатомии и физиологии

РЕФЕРАТ НА ТЕМУ:

Выполнил (-а): студент
___ курса,
направления подготовки:

Ф.И.О.

Проверила:
доцент кафедры лабораторной
диагностики, анатомии и
физиологии, к.б.н., доцент
Криничная Н.В.

Оценка защиты реферата:

« ___ » _____ 202__ г.

Луганск, 202__

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Учебное издание

КРИНИЧНАЯ Наталия Викторовна
ВОРОНОВ Михаил Владимирович

Молекулярная биология

Учебное пособие

В авторской редакции

Подписано в печать 26.04.2022. Бумага офсетная.

Гарнитура Times New Roman.

Печать ризографическая. Формат 60×84/16.

Усл. печ. л. 6,98.

Тираж 100 экз. Заказ № 53.

Издатель

ГОУ ВО ЛНР «ЛГПУ»

«Книта»

ул. Оборонная, 2, г. Луганск, ЛНР, 91011.

Т/ф: (0642)58-03-20

e-mail: knitaizd@mail.ru