

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Якутская государственная сельскохозяйственная академия»  
Агротехнологический факультет  
Кафедра «Общая зоотехния»

Молекулярная биология с основами генной инженерии  
Методические указания по самостоятельному изучению дисциплины и задания для  
контрольной работы студентам очной и заочной формы обучения по направлению  
подготовки 111900.62 – Ветеринарно-санитарная экспертиза (бакалавриат)

Якутск –2014 г.

УДК 577.2 (075.8)  
ББК 28.070Я73  
Ф53

Методические рекомендации разработаны на основании федеральных государственных образовательных стандартов высшего профессионального образования по направлению подготовки 111900.62 – Ветеринарно-санитарная экспертиза (бакалавриат)

Составитель Филиппова Наталья Павловна, доцент кафедры общей зоотехнии, кандидат биологических наук.

Зав.кафедрой разработчика МР  /Черноградская Н.М./  
подпись фамилия, имя, отчество

Протокол заседания кафедры № 28 от «12» 05 2014 г.

Председатель методической комиссии факультета  /Уваровская Е.Е./  
подпись фамилия, имя, отчество

Протокол заседания методической комиссии факультета № 9 от «12» 05 2014 г.

Декан агротехнологического факультета  /Черкашина А.Г./  
подпись фамилия, имя, отчество

«  »    201   г.

## ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с федеральными государственными стандартами высшего профессионального образования значительная часть материала дисциплины должна быть освоена студентами в ходе самоподготовки. В сессионный период по дисциплине читаются лекции, которые для студентов заочного образования носят установочный и обзорный характер и проводятся лабораторно-практические занятия. Для успешного овладения материалом, предусмотренным программой, самостоятельная систематическая работа студентов над учебной литературой имеет решающее значение. Методические рекомендации предназначены для студентов очной и заочной формы обучения, обучающихся по направлению «Ветеринарно-санитарная экспертиза».

### Цели и задачи преподавания дисциплины:

Цель дисциплины: формирование у студентов знаний об особенностях строения и свойств макромолекул, входящих в состав живой клетки, структурно-функциональной организации генетического аппарата клеток и механизма реализации наследственной информации.

Задачи дисциплины состоят в том, чтобы дать студенту фундаментальную теоретическую базу, которая необходима для освоения практических методов работы на новом молекулярном уровне, современные представления о направлениях развития молекулярной генетики, генетическом аппарате клетки, о структурной организации нуклеиновых кислот и белковых молекул, формировании их пространственной структуры, методах определения нуклеотидных последовательностей ДНК, понятие о мутагенезе и т.д.

### Требования к уровню освоения дисциплины

После изучения дисциплины студент должен знать:

- особенности структурно-функциональной организации нуклеиновых кислот;
  - современные методы установления и анализа структуры и функции ДНК и РНК;
  - механизм реализации наследственной информации;
  - современные экспериментальные подходы для анализа генетического аппарата живых систем;
  - современные методы выделения, очистки и анализа нуклеиновых кислот, методы молекулярной диагностики для решения научных и прикладных (медицинских) задач;
- должен иметь представление:
- об основных чертах организации геномов эукариот, прокариот и вирусов;
  - о проблеме стабильности генетического материала, типах структурных повреждений в ДНК и РНК;
  - о генетическом контроле и механизмах спонтанного и индуцированного мутагенеза;
  - о механизме регуляции экспрессии генов;
  - о принципах организации генетического аппарата автономных структур клетки.

В межсессионный период студентам-заочникам необходимо используя рекомендованную литературу и учебно-методическое пособие, проработать все разделы в соответствии с рабочей программой, а также выполнить одну контрольную работу. Контрольная работа должна быть представлена для проверки заблаговременно на кафедру, ведущую дисциплину. Контрольная работа выполняется рукописно, объемом 15-20 страниц или в печатном виде. Защита выполненной контрольной работы проводится путем устного собеседования, после предварительной ее оценки преподавателем, ведущим эту дисциплину. После успешной защиты контрольной работы студент допускается к сдаче зачета.

### Общие методические указания к выполнению контрольной работы.

Каждый студент заочного отделения выполняет вариант контрольной работы. Контрольная работа составлена в 10 вариантах. Каждый вариант состоит из двух разделов:

- *раздел 1* – теоретический вопрос (включает 7 тем, студенту необходимо ответить по своему варианту на один вопрос по каждой теме);
- *раздел 2* - практические задания (включает 3 темы, студенту необходимо решить задачу по своему варианту по каждой теме).

В третьем разделе даны тесты для самоподготовки студентов к итоговому контролю знаний (экзамен).

Студенту в контрольной работе следует в сжатой форме изложить основные положения темы, ответить на поставленные вопросы, решить задачи, сделать (при необходимости) схематические зарисовки с соответствующими пояснениями.

Курс молекулярной биологии с основами генной инженерии насыщен большим количеством генетических терминов. Для их усвоения необходимо выписать незнакомые генетические термины и дать им объяснения.

Для прочного освоения положений молекулярной биологии с основами генной инженерии студенту очень важно научиться самостоятельно решать различные типы задач.

В конце работы должен быть приведен список использованной литературы, с указанием автора, названия, места и года издания.

Также в конце работы должны быть поставлены дата выполнения и подпись.

Вариант студент выбирает по последней цифре номера зачетной книжки.

1 вариант	2 вариант	3 вариант	4 вариант	5 вариант
0	1	2	3	4
6 вариант	7 вариант	8 вариант	9 вариант	10 вариант
5	6	7	8	9

***Работа, выполненная не по своему варианту, возвращается студенту без проверки и зачета.***

Дисциплина «Молекулярная биология с основами генной инженерии» включает следующие темы:

1. Введение. Строение и функции нуклеиновых кислот. Методы молекулярной биологии.
2. Молекулярные механизмы основных процессов хранения и передачи генетического материала.
3. Реализация наследственной информации.
4. Изменчивость генетического материала.
5. Генная инженерия.
6. Ферменты генной инженерии.
7. Методы генной инженерии.

#### **Рекомендуемая литература**

##### **Основная литература**

1. Петухов, В.Л. Генетика. Учебник/В.Л. Петухов, О.С. Короткевич, С.Ж. Стамбеков и др./2-е изд., испр. идоп.. – Новосибирск: СемГПИ, 2007.-628 с.
2. Бакай, А.В. Генетика/ А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко.- М.: КолосС, 2006. – 448 с.
3. Патрушев, Л.И. Экспрессия генов. М. Наука, 2000
4. Патрушев, Л.И. Искусственные генетические системы. Т.1. Генная и белковая инженерия. М. Наука. 2004.
5. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия. Сибирское университетское издательство. Новосибирск. 2004.

##### **Дополнительная литература**

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ.-М.: Мир, 2002. – 589 с.
2. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика /И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Изд-во НГУ, 2002. – 459 с.
3. Жебровский, Л.С. Селекция животных /Л.С. Жебровский. – Санкт-Петербург. Лань, 2002 г. – 255 с.
4. Инге-Вечтомов, С.Г. Введение в молекулярную генетику/С.Г. Инге-Вечтомов. – М.: Высш.шк., 1983. – 343 с.
5. Красота, В.Ф. Биотехнология в животноводстве/В.Ф. Красота. – М.: Агропромиздат, 1992.
6. Сингер М., Берг П. Гены и геномы: В 2-х т. Пер. с англ. – М.: Мир, 1998.

## *Содержание разделов дисциплины*

### *Тема 1. Введение. Строение и функции нуклеиновых кислот. Методы молекулярной биологии.*

Молекулярная биология - это наука о механизмах хранения, воспроизведения, передачи и реализации генетической информации, о структуре и функциях нерегулярных биополимеров - нуклеиновых кислот и белков.

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

Молекулярная биология возникла во второй половине XX в. Название этой науки чаще всего связывают с именем У. Эстбюри, который в 1939 г. назвал себя «молекулярным биологом».

Разработка тонких физических и химических методов анализа структуры и функций молекул, свойственных всем живым системам и прежде всего клетке как элементарной и универсальной составляющей всех организмов, имела определяющее значение для рождения молекулярной биологии. Мощным стимулом для ее развития стали успехи и еще в большей мере нерешенные проблемы биохимии, цитологии и генетики. Эти сформировавшиеся к середине XX в. биологические науки создали почву для молекулярной биологии, которая была призвана заняться изучением жизни на молекулярном уровне.

Центром молекулярно-биологических исследований стали работы в области изучения материальных основ наследственности, природы генов и механизмов передачи наследственных признаков из поколения в поколение.

Именно под влиянием генетиков новой формации (Т. Моргана, Н.К. Кольцова, Н.В.Тимофеева-Ресовского и др.) физики-теоретики и экспериментаторы, эмигрировавшие в конце 30-х годов из Европы в США, организовали там так называемую «фаговую группу» во главе с М. Дельбрюком, которая начала исследования в области молекулярного строения и мутагенеза вирусов и бактериофагов. Позднее эти работы были существенно развиты в нашей стране Б.Ф. Поглазовым, Н.А. Киселевым и другими учеными. Еще раньше В.А. Энгельгардт совместно с М.Н. Любимовой обосновали молекулярные механизмы мышечного сокращения, а А.Н. Белозерский впервые выделил ДНК из растений, что также относится к фундаментальным вехам становления молекулярной биологии. Впоследствии именами этих замечательных ученых были названы крупнейшие научно-исследовательские центры: Институт молекулярной биологии АН СССР им. В.А. Энгельгардта и Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского.

К началу 50-х годов XX в. в недрах биохимии были получены фундаментальные данные об элементарном строении белков и нуклеиновых кислот, включая сведения о способах организации полипептидных цепей белков, и, что особенно важно, о структуре нуклеотидов и закономерностях их количественного содержания в молекулах ДНК и РНК (Э.Чаргафф). Именно указанные работы, а также биофизические исследования структуры ДНК, выполненные в Англии методом рентгеноструктурного анализа Розалиндой Франклин и Морисом Уилкинсом, вплотную подвели воспитанника «фаговой группы» Джеймса Уотсона и английского физика Френсиса Крика к раскрытию молекулярной природы генов и механизма их воспроизведения (репликации) в составе ДНК.

Создание модели двойной спирали ДНК и открытие принципа, комплементарности стали важнейшим событием современной биологии, вскрывшим фундаментальные принципы функционирования живых систем и определившим дальнейшие направления исследований современной биологии. Современное естествознание обязано именно молекулярной биологии тем, что в период с середины 50-х до середины 70-х годов XX в. с невероятной быстротой были раскрыты природа и основные пути передачи и реализации генетической информации.

В результате выдающихся открытий Дж. Уотсона, Ф. Крика, Х. -Г. Кораны, А. Корнберга и других крупнейших молекулярных биологов, удостоенных нобелевских премий, уже в середине 60-х годов XX в. окончательно утвердился основной постулат молекулярной генетики, формулирующий магистральный путь реализации генетической информации в клетке:

ДНК → РНК → Белок

Затем были детально изучены механизмы воспроизведения (репликации) ДНК, транскрипции (биосинтеза РНК) и трансляции (биосинтеза белка). Параллельно развивались работы по изучению внутриклеточной локализации этих процессов, что привело к осознанию функционального значения внутриклеточных компонентов (ядра, митохондрий, рибосом и др.) и дало основание Дж. Уотсону в 1968 г. для определения молекулярной биологии: «Молекулярная биология изучает связь структуры биологических макромолекул и основных клеточных компонентов с их функцией, а также основные принципы и механизмы саморегуляции клеток, которые опосредуют согласованность и единство всех протекающих в клетке процессов, составляющих сущность жизни».

Впоследствии центральный постулат молекулярной генетики был дополнен представлениями о существовании процесса обратной транскрипции (о биосинтезе ДНК на матрице РНК) и репликации РНК, что позволило придать ему следующий вид:

Одновременно все более детализировались представления о строении и функциях белков, необходимых для катализа (ферменты) и регуляции (регуляторные белки, пептидные гормоны) всех важнейших молекулярно-генетических процессов.

Открытие и разработка методов целенаправленного использования целого ряда ферментов (обратной транскриптазы, ДНК-рестриктаз и др.) привели к созданию технологии получения рекомбинантных ДНК, возникновению генетической инженерии, что стало поистине революционным событием в истории молекулярной биологии.

В конце 70-х и начале 80-х годов XX в. молекулярная биология вступает в период расцвета. В это время выясняются механизмы сплайсинга (В. Келлер и др.), происходит открытие РНК-ферментов (рибозимов) и аутосплайсинга (Т.Чек), активно изучаются механизмы генетической рекомбинации и подвижные генетические элементы (Д. Хогнесс, Г. П. Георгиев), на новый уровень выходят работы в области структуры ферментов и биологических мембран (Ю.А. Овчинников), начинаются работы по расшифровке структуры геномов высших организмов (включая геном человека), создаются основы новых (генно-инженерных) биотехнологии, обнаруживаются и синтезируются каталитически активные антитела (абзимы), возникает белковая инженерия.

Постепенно молекулярная биология становится в центре наук, составляющих современную физико-химическую биологию:

Бурное развитие молекулярной биологии привело в начале 80-х годов XX в. к возникновению новой науки — биоинформатики (вычислительной биологии, компьютерной генетики), возникшей на стыке молекулярной генетики и информатики. Толчком к ее возникновению послужило появление быстрых методов определения нуклеотидных последовательностей ДНК, разработанных в 1975 — 1976 гг. Ф. Сангером и А. Коулсоном, а также А. Максамом и У. Гилбертом. В 1982 г. были организованы банки нуклеотидных последовательностей: Gen Bank в США и EMBL в Европе, в которых концентрировалась информация о расшифрованных нуклеотидных последовательностях ДНК различных организмов. Постепенно биоинформатика включилась в разработку ряда важных молекулярно-биологических проблем, включая: статистический анализ нуклеотидных последовательностей ДНК; предсказание функций по первичной структуре биополимеров (ДНК, РНК и белков); анализ (моделирование) пространственной структуры белков и нуклеиновых кислот; теорию молекулярной эволюции и систематики.

Прогресс в области определения нуклеотидных последовательностей (секвенирования) ДНК различных организмов, достигнутый в конце XX в. (в 1995 г. был

секвенирован первый бактериальный геном, в 1997 г. — геном дрожжей, в 1998 г. — геном нематоды, в 2000 г. — геном дрозофилы и почти полностью — геном человека), привел к возникновению геномики — науки, изучающей наборы всех генов данного организма как единое целое. Одновременно возникла протеомика — наука, исследующая полные наборы белков, функционирующих на различных этапах развития того или иного организма.

Задачи современной молекулярной биологии

В конце XX в. расширяются и становятся все более целенаправленными в научно-практическом отношении задачи молекулярной биологии, среди которых:

- расшифровка структуры геномов;
- создание банков генов;
- геномная дактилоскопия;
- изучение молекулярных основ эволюции, дифференцировки, биоразнообразия, развития и старения, канцерогенеза, иммунитета и др.;
- создание методов диагностики и лечения генетических болезней, вирусных заболеваний;
- создание новых биотехнологии производства пищевых продуктов и разнообразных биологически активных соединений (гормонов, антигормонов, релизинг-факторов, энергоносителей и др.)

Начало нового тысячелетия ознаменовалось выдающимся событием — расшифровкой нуклеотидной последовательности генома человека, с которой связаны надежды на решение многих проблем человечества (коррекция наследственных заболеваний, продление жизни и т.д.).

Таким образом, по праву считается, что XXI в. должен стать веком молекулярной биологии и новых биотехнологии, призванных освободить человечество от тяжелого груза болезней, пороков и лишений и заложить основы его будущего процветания.

Методы молекулярной биологии

- Микроскопия
- Физические методы
- Биологические методы

Нуклеиновые кислоты играют основную роль в хранении и реализации генетической информации. Различают два вида нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), которые обеспечивают хранение генетической информации, и рибонуклеиновые кислоты (РНК), принимающие участие в ее реализации. Хромосома прокариотической клетки представляет собой одну длинную двуцепочечную молекулу ДНК, собранную в компактное образование — нуклеоид. Эукариотические клетки содержат большое число молекул ДНК, которая неравномерно распределена по нескольким хромосомам в виде комплексов с многочисленными белками. Вирусы также содержат в качестве генетического материала нуклеиновые кислоты: у одних это ДНК, у других РНК.

В реализации генетической информации принимают участие различные виды РНК.

Нуклеиновые кислоты являются биологическими полимерами. Мономерными звеньями ДНК и РНК являются нуклеотиды — фосфорные эфиры нуклеозидов, которые, в свою очередь, построены из пентозы и гетероциклического основания. В РНК углеводный компонент — D-рибоза, в ДНК — D-2-дезоксирибоза. Связь между углеводным остатком и гетероциклическим основанием в нуклеотиде осуществляется с помощью N-гликозидной связи. В качестве гетероциклических оснований ДНК содержит два пурина: аденин (А) и гуанин (G) и два пиримидина: тимин (Т) и цитозин (С). В РНК вместо тимина содержится урацил (U).

Мономерные остатки в нуклеиновых кислотах связаны между собой фосфодиэфирными связями. Как в ДНК, так и в РНК, эта связь осуществляется только за счет 3'-ОН одного нуклеотидного остатка и 5'-ОН другого. Такую межнуклеотидную связь называют 3',5'-фосфодиэфирной. Цепи ДНК и РНК обладают определенной полярностью,

или направлением, поскольку все межнуклеотидные фосфодиэфирные связи ориентированы вдоль цепи одинаково.

Дезоксирибонуклеиновая кислота — ДНК — является уникальным носителем наследственной информации как у прокариотов, так и у эукариотов. Только у некоторых форм простейших вирусов наследственная информация закодирована не в ДНК, а в рибонуклеиновой кислоте.

Доказательством ведущей роли ДНК в наследственности является то, что, она локализована главным образом в хромосомах, поэтому молекулярная генетика не противоречит хромосомной теории наследственности и законам классической генетики. Количество ДНК в клетках каждого организма относительно постоянно, причем в половых клетках — гаметах — количество ее в два раза меньше, чем в соматических, что соответствует поведению хромосом в мейозе и при оплодотворении. Одним из главнейших свойств ДНК является ее способность самоудваиваться (реплицироваться) в интерфазе митотического цикла, благодаря чему в каждой клетке многоклеточного организма сохраняется полный объем наследственной информации. ДНК относительно константна.

Особенности строения молекулы ДНК свидетельствуют об ее исключительном многообразии, видовой и индивидуальной специфичности. Изменение в строении молекулы ДНК обуславливает изменение признака или свойства организма.

Двойная спираль ДНК (модель Уотсона—Крика). В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик предложили модель структуры ДНК. При построении модели ученые основывались на четырех группах данных:

1. ДНК представляет собой полимер, состоящий из нуклеотидов, соединенных 3'-5'-фосфодиэфирными связями.
2. Состав нуклеотидов ДНК подчиняется правилам Чаргаффа: в любой ДНК содержание пуриновых нуклеотидов (А+Г) всегда равно содержанию пиримидиновых нуклеотидов (Т+С); число остатков А всегда равно числу остатков Т, число остатков Г — числу остатков С.
3. Рентгенограммы волокон ДНК, впервые полученные М. Уилкинсом и Р. Франклином, указывают на то, что молекула обладает спиральной структурой и содержит более одной полинуклеотидной цепи.
4. Кислотно-щелочное титрование ДНК показывает, что ее структура стабилизируется водородными связями. Титрование и нагревание нативной ДНК вызывает заметные изменения ее физических свойств, в частности вязкости, переводя ее в «денатурированную» форму, причем ковалентные связи при этом не разрушаются.

### **Контрольные вопросы**

- 1.1. Что изучает молекулярная биология?
- 1.2. Перечислите задачи молекулярной биологии.
- 1.3. Расскажите об истории возникновения и развития молекулярной биологии.
- 1.4. Перечислите основополагающие открытия молекулярной биологии.
- 1.5. Какое место занимает молекулярная биология среди других естественных наук?
- 1.6. Какие методы используются в молекулярной биологии?
- 1.7. Какие физико-химические методы и для чего используются в молекулярной биологии?
- 1.8. Роль нуклеиновых кислот.
- 1.9. Химическое строение молекулы ДНК. Структура ДНК.
- 1.10. Белки и их роль.

## ***Тема 2. Молекулярные механизмы основных процессов хранения и передачи генетического материала.***

Вирусы — это внеклеточная форма жизни, обладающая собственным геномом и способная к воспроизведению только в клетках живых организмов.

Вирион (или вирусная частица) состоит из одной или нескольких молекул ДНК или РНК, заключенных в белковую оболочку (капсид), иногда содержащую также липидные и углеводные компоненты.

Вирусы размножаются только после инфицирования живых клеток. Различные вирусы проникают в животные и растительные клетки, а также бактерии (вирусы бактерий называются бактериофагами). Вирусы являются внутриклеточными паразитами на генетическом уровне и используют для своего размножения белок-синтезирующий аппарат клетки-хозяина.

Жизненный цикл вируса начинается с проникновения внутрь клетки. Для этого он связывается со специфическими рецепторами на ее поверхности и либо вводит свою нуклеиновую кислоту внутрь клетки, оставляя белки вириона на ее поверхности, либо проникает целиком в результате эндоцитоза. В последнем случае после проникновения вируса внутрь клетки следует его «раздевание» — освобождение геномных нуклеиновых кислот от белков оболочки. В результате этой процедуры вирусный геном становится доступным для ферментных систем клетки, обеспечивающих экспрессию генов вируса. Именно после проникновения вирусной геномной нуклеиновой кислоты в клетку заключенная в ней генетическая информация расшифровывается генетическими системами хозяина и используется для синтеза компонентов вирусных частиц. По сравнению с геномами других организмов вирусный геном относительно мал и кодирует лишь ограниченное число белков, в основном белки капсида и один или несколько белков, участвующих в репликации и экспрессии вирусного генома. Необходимые метаболиты и энергия поставляются хозяйской клеткой.

Геном вирусов, заключенный внутри вирионов, может быть представлен ДНК или РНК, последние могут быть одно- и двуцепочечными, кольцевыми и линейными.

### *Типы генетического материала и механизм его репликации у различных вирусов*

РНК-содержащие вирусы (РНК → РНК). Геномы почти всех известных РНК-содержащих вирусов — это линейные молекулы, их удобно разделить на 3 группы.

Первая группа — это однонитевые геномы положительной полярности, т. е. с нуклеотидной последовательностью, соответствующей таковой у мРНК. Такие геномы обозначают как (+) РНК.

Вторая группа — это однонитевые геномы с негативной полярностью, т.е. (-) РНК-геномы. К вирусам с негативным РНК-геномом относятся вирусы гриппа, кори, бешенства, желтой карликовости картофеля и др.

Третью группу составляют двунитевые геномы, (±) РНК-геномы. Известные двунитевые геномы всегда сегментированы (т.е. состоят из нескольких разных молекул).

РНК-содержащие вирусы (РНК → ДНК → РНК). Сюда относятся вирусы, у которых цикл репликации генома можно разбить на две главные реакции: синтез РНК на матрице ДНК и синтез ДНК на матрице РНК. При этом в состав вирусной частицы в качестве генома может входить либо РНК (ретровирусы), либо ДНК (ретроидные вирусы).

В эту группу входят вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и некоторые возбудители злокачественных новообразований. Вирусная частица содержит две молекулы геномной одноцепочечной (+) РНК.

ДНК-содержащие вирусы. Первая группа — вирусы с двуцепочечной ДНК, репликация которых осуществляется по схеме: ДНК → РНК → ДНК. Они получили название ретроидные вирусы. Представителями этой группы вирусов являются вирус гепатита В и вирус мозаики цветной капусты.

Вторая группа — вирусы с двуцепочечной ДНК, репликация которых осуществляется по схеме ДНК → ДНК. В зараженной клетке ДНК-зависимая РНК-

полимераза транскрибирует с генома этих вирусов молекулы мРНК (т.е. (+) РНК), которые принимают участие в синтезе вирусных белков, а размножение вирусного генома осуществляет фермент ДНК-зависимая ДНК-полимераза.

Третья группа — вирусы с одноцепочечной ДНК, либо с негативной, либо с позитивной полярностью. Попав в клетку, вирусный геном сначала превращается в двуцепочечную форму, это превращение обеспечивает клеточная ДНК-зависимая ДНК-полимераза.

#### *Типы взаимодействия вируса с клеткой-хозяином*

Существуют два типа взаимодействия вируса и клетки, где главное различие — степень автономии вируса от клетки-хозяина. Это так называемый литический путь инфекции — он заканчивается гибелью клетки-хозяина. В данном случае вирус не подчиняется клеточному контролю.

Альтернативным является лизогенный путь инфекции, при котором линейные инфицирующие молекулы ДНК фага X замыкаются в кольцо и включаются (интегрируют) в кольцевую хромосому клетки-хозяина.

В животных клетках, как и у бактерий, ДНК-вирусы могут размножаться литическим путем, ведущим к гибели клетки. Такие животные клетки называют пермиссивными. Клетки, в которых размножение вирусов блокируется, называются непермиссивными; вирусная хромосома в таких случаях либо включается в геном клетки-хозяина и затем размножается вместе с ним, либо образует плазмиду — кольцевую молекулу ДНК, репликация которой регулируется и не ведет к гибели клетки. Иногда это вызывает в непермиссивных клетках определенное генетическое изменение, в результате которого начинается их неконтролируемый рост, т. е. нормальные клетки превращаются в раковые.

Способы передачи генетической информации у микроорганизмов:

- Конъюгация
- Трансдукция
- Трансформация

Содержание РНК в любых клетках в 5—10 раз превышает содержание ДНК. Основная роль РНК состоит в трансляции генетической информации с образованием белков, а также в осуществлении некоторых специализированных эндонуклеазных функций, возможно регулирующих различные этапы экспрессии генов. Геномы некоторых вирусов (ретровирусов и множества вирусов животных, растений и насекомых) представлены одно- и двуцепочечной молекулой РНК.

Виды РНК. Во всех клетках присутствуют следующие виды РНК: рибосомная (рРНК), транспортная (тРНК) и информационная, или матричная (мРНК). Большинство клеток содержат много малых цитоплазмических РНК (мцРНК), а в клетках эукариот присутствуют малые ядерные РНК (мЯРНК).

Генетическая программа клеточных организмов записана в нуклеотидной последовательности ДНК. Для сохранения уникальных свойств организма необходимо точное воспроизведение этой последовательности в каждом последующем поколении. Во время деления клетки содержание ДНК должно удвоиться, чтобы каждая дочерняя клетка могла получить полный спектр ДНК. Так, кишечная палочка при образовании каждого последующего поколения должна дублировать практически без ошибок полный геном размером 4-10<sup>6</sup> н.п., точно так же должны быть скопированы почти 6 млрд н. п. в любой соматической клетке человека.

Процесс удвоения родительских молекул геномной ДНК во время воспроизводства клеток живого организма получил название репликации, или репликативного синтеза ДНК.

Репликация ДНК является примером матричного синтеза биологических макромолекул. Основу хромосомы составляет одна непрерывная двуцепочечная молекула ДНК. Во время репликации каждая из цепей родительской ДНК служит матрицей для

синтеза комплементарной дочерней цепи. Положение каждого нуклеотида в строящейся цепи ДНК по правилам комплементарности (О—С и А—Т) однозначно определяется положением соответствующего нуклеотида матрицы.

Механизм происходящей при репликации ДНК химической реакции заключается в переносе остатка дезоксирибонуклеозид-монофосфата от дезоксирибонуклеозидтрифосфата на концевой нуклеотидный остаток, растущей в процессе синтеза нуклеотидной цепи.

Так как формирование нового полинуклеотида идет на полинуклеотидной матрице при непрерывном замыкании водородных связей между комплементарными пуриновыми и пиримидиновыми основаниями матрицы и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, то условием функционирования этого механизма является одноцепочечная структура матрицы. В связи с этим существенным моментом в биосинтезе является расхождение биспирального поли-дезоксирибонуклеотида на одиночные полидезоксирибонуклеотидные цепи, на которых осуществляется сборка комплементарных им полинуклеотидов. В итоге из одной биспиральной молекулы ДНК образуются две биспиральные молекулы ДНК, совершенно идентичные друг другу и исходной молекуле ДНК. После одного раунда репликации одна цепь в каждой из двух дочерних молекул является родительской, т. е. консервативной, а другая — синтезированной заново. Такой способ удвоения молекул ДНК называется полуконсервативным. В 1958 г. М. Мезельсон и Ф. Сталь получили экспериментальное доказательство полуконсервативного способа репликации ДНК.

### Контрольные вопросы и задачи

2.1. Экспериментальные доказательства генетической функции ДНК.

**Задача:** В одной из цепочек молекулы ДНК нуклеотиды расположены в такой последовательности:

...АЦГ ТТА ГЦТ АГТ...

Какова последовательность нуклеотидов в другой цепочке этой же молекулы?

2.2. Виды РНК и их функции.

**Задача:** В одной из цепочек молекулы ДНК нуклеотиды расположены в такой последовательности:

а) АЦА ГГТ АЦГ АЦГ ТАГ ...

б) ТГЦ ААТ ЦГГ АЦТ ГАЦ ...

Укажите последовательность нуклеотидов в другой цепочке молекулы?

2.3. Вирусы, вирионы, жизненный цикл.

**Задача:** Одна из цепочек ДНК имеет последовательность нуклеотидов: АГТ АЦЦ ГАТ АЦТ ЦГА ТТТ АЦГ ... Какую последовательность нуклеотидов имеет вторая цепочка ДНК той же молекулы.

2.4. Типы генетического материала и механизмы его репликации у РНК-содержащих вирусов (РНК→РНК).

**Задача:** На фрагменте одной нити ДНК нуклеотиды расположены в последовательности: А-А-Г-Т-Ц-Т-А-Ц-Г-Т-А-Т. Определите процентное содержание всех нуклеотидов в этом фрагменте ДНК и длину гена.

2.5. Типы генетического материала и механизмы его репликации у РНК-содержащих вирусов (РНК→ДНК→РНК).

**Задача:** В молекуле ДНК на долю цитидиловых нуклеотидов приходится 18%. Определите процентное содержание других нуклеотидов в этой ДНК.

2.6. Типы генетического материала и механизмы его репликации у ДНК-содержащих вирусов.

**Задача:** В молекуле ДНК обнаружено 880 гуанидиловых нуклеотидов, которые составляют 22% от общего числа нуклеотидов в этой ДНК. Определите: а) сколько других нуклеотидов в этой ДНК? б) какова длина этого фрагмента?

2.7. Способы передачи генетического материала у бактерий и вирусов.

**Задача:** Дана молекула ДНК с относительной молекулярной массой 69 000, из них 8625 приходится на долю адениловых нуклеотидов. Найдите количество всех нуклеотидов в этой ДНК. Определите длину этого фрагмента.

2.8. Типы взаимодействия вируса с клеткой-хозяином.

**Задача:** Ферменты, осуществляющие репликацию ДНК, движутся со скоростью 0,6 мкм в 1 мин. Сколько времени понадобится для удвоения ДНК в хромосоме, имеющей 500 репликонов, если длина каждого репликона 60 мкм?

2.9. Полуконсервативная репликация ДНК. Механизм репликации.

**Задача:** Молекула ДНК распалась на две цепочки, одна из них имеет строение : ТАГ АЦТ ГГТ АЦА ЦГТ ГГТ ГАТ ТЦА ... Какое строение будет иметь вторая молекула ДНК, когда указанная цепочка достроится до полной двухцепочечной молекулы ?

2.10. Вилка репликации ДНК. Регуляция репликации ДНК у бактерий. Понятие о репликоне и репликаторе.

**Задача:** На фрагменте одной нити ДНК нуклеотиды расположены в последовательности: А-А-Г-Т-Ц-Т-А-Ц-Г-Т-А-Т.

Определите процентное содержание всех нуклеотидов в этом гене и его длину.

### ***Тема 3. Реализация наследственной информации.***

Процесс биосинтеза сложный и включает ряд этапов — транскрипцию, сплайсинг и трансляцию.

Первый этап называется транскрипцией. Он происходит в ядре клетки: на участке определенного гена молекулы ДНК синтезируется мРНК. Этот синтез осуществляется при участии комплекса ферментов, главным из которых является ДНК-зависимая РНК-полимераза, которая прикрепляется к начальной (инициальной) точке молекулы ДНК, расплетает двойную спираль и, перемещаясь вдоль одной из нитей, синтезирует рядом с ней комплементарную нить мРНК. В результате транскрипции мРНК содержит генетическую информацию в виде последовательного чередования нуклеотидов, порядок которых точно скопирован с соответствующего участка (гена) молекулы ДНК.

Дальнейшие исследования показали, что в процессе транскрипции синтезируется так называемая про-мРНК — предшественник зрелой мРНК, участвующей в трансляции. Про-мРНК имеет значительно большие размеры и содержит фрагменты, не кодирующие синтез соответствующей полипептидной цепи. В ДНК наряду с участками, кодирующими рРНК, тРНК и полипептиды, имеются фрагменты, не содержащие генетической информации. Они получили название интронов в отличие от кодирующих фрагментов, которые называются экзонами. Интроны обнаружены на многих участках молекул ДНК. Длина интрона бывает различной — от двухсот до тысячи пар нуклеотидов ДНК. Интроны считываются (транскрибируются) одновременно с экзонами, поэтому про-мРНК значительно длиннее, чем зрелая мРНК. В ядре в про-мРНК специальными ферментами вырезаются интроны, а фрагменты экзона «срашиваются» между собой в строгом порядке. Этот процесс называется сплайсингом. В процессе сплайсинга образуется зрелая мРНК, которая содержит только ту информацию, которая необходима для синтеза соответствующего полипептида, то есть информативную часть структурного гена.

**Транскрипция.** Транскрипция — процесс переноса генетической информации от ДНК к РНК. Все виды РНК - мРНК, рРНК и тРНК - синтезируются в соответствии с

последовательностью оснований в ДНК, служащей матрицей. Транскрибируется только одна, так называемая «+» -цепь ДНК. Процесс транскрипции у прокариот и эукариот существенно различается.

Транскрипция отличается от репликации ДНК рядом особенностей. Количество молекул РНК, копируемых с определенного участка ДНК, контролируется регуляторными белками, которые связываются со специфическими участками ДНК, закрывая кодирующие последовательности гена. В любой клетке в любой момент времени некоторые гены используются для синтеза РНК в очень больших количествах, тогда как другие гены не транскрибируются совсем. Для некоторых активных генов в каждом клеточном поколении один и тот же участок ДНК может транскрибироваться тысячи раз. Поскольку каждая молекула РНК может транслироваться во многие тысячи копий, то информация, содержащаяся в маленьком участке ДНК, может направлять синтез миллионов копий специфического белка.

Трансляция у прокариот. Стартовым сигналом к началу синтеза белка служит расположенный на мРНК кодон AUG, кодирующий метионин (Met) [иногда это кодон GUC для Валина (Val)]. В растущей полипептидной цепи первым аминокислотным остатком всегда будет либо Met, либо Val. Тогда возникает законный вопрос: каким образом клетка отличает стартовый сигнал от кодонов AUG или GUC, расположенных в середине молекулы мРНК? Эта проблема решается с помощью модифицированной формы Met (или Val) и специальной иницирующей тРНК.

Формилметионин (fMet) и является той модифицированной формой Met, с которой начинается синтез белка. Он присоединяется к молекулам тРНК определенного типа (тРНК<sub>f</sub>), отличным от тРНК<sub>Met</sub>, посредством которых Met включается в срединную часть полипептидной цепи. И тРНК<sub>f</sub>, и тРНК<sub>Met</sub> узнают кодон AUG, но лишь тРНК<sub>f</sub> способна присоединяться к стартовому кодону AUG.

Инициация синтеза белка начинается с момента образования иницирующего комплекса на 30S-субчастице, состоящего из мРНК, 30S-субчастицы рибосомы и молекулы аминоацил-тРНК<sub>f</sub> с присоединенным fMet, которая связывается с участком P. Следующим шагом является присоединение 50S-субчастицы, в результате чего образуется 70S-иницирующий комплекс. Источником энергии для инициации синтеза белка служит реакция гидролиза GTP до GDP и P<sub>i</sub>. На этом этапе необходимы еще несколько белков, называемых факторами инициации (IF1, IF2 и IF3).

Элонгация — это последовательное включение аминокислотных остатков в состав растущей полипептидной цепи. Каждый акт элонгации состоит из трех этапов: 1) узнавание кодона, 2) образование пептидной связи и 3) транслокация.

Узнавание кодона заключается в связывании антикодона очередной молекулы аминоацил-тРНК с кодоном свободного участка А на рибосоме. Чтобы прикрепиться к рибосоме, тРНК с присоединенной к ней аминокислотой должна сначала образовать комплекс с белком, называемым фактором элонгации EF-Tu, или EF1, который предварительно должен быть активирован с помощью GTP. После того как произойдет связывание всего комплекса с участком А рибосомы, осуществляется гидролиз GTP до GDP и P<sub>i</sub> удовлетворяющий энергетические потребности на этом этапе элонгации. Фактор EF1 • GDP, неспособный более связываться с тРНК, покидает рибосому, на которой остается аминоацил-тРНК. Регенерацию активированного фактора EF1 катализирует второй фактор элонгации, EF-Ts, или EF2, который замещает GDP в неактивированном комплексе, в результате чего образуется комплекс EF1 • EF2.

Образование пептидной связи происходит лишь тогда, когда оба участка, А и Р, заняты молекулами аминоацил-тРНК. Часть 50S-субчастицы представляет собой фермент пептидилтрансферазу, катализирующий образование. В результате этой реакции растущая полипептидная цепь оказывается присоединенной к тРНК участка А, а тРНК участка Р высвобождается из комплекса с пептидом и несет на 3'-конце группу —ОН.

Транслокация включает три акта, катализируемых еще одним фактором элонгации, EF-G(EF3), и энергетически сопряженных с гидролизом GTP. Сначала тРНК участка Р, не связанная с пептидом, покидает рибосому, затем молекула полипептидил-тРНК переходит с участка А на Р и, наконец, рибосома перемещается вдоль мРНК на три нуклеотидных остатка в сторону 3'-конца. В результате этих трех актов освобождается участок А и экспонируется очередной кодон, что позволяет начаться следующему циклу элонгации.

Терминация т. е. окончание синтеза, происходит по команде кодонов UAA, UGA или UAG. В природе не существует таких молекул тРНК, антикодоны которых соответствовали бы этим кодоном. Вместо продолжения синтеза цепи происходит терминация, катализируемая специальными белками, которые названы факторами терминации и которые узнают терминирующие кодоны, когда свободен участок А. Эти факторы изменяют специфичность фермента пептидил-трансферазы таким образом, что происходит гидролиз связи между концевым пептидом и тРНК, а освобожденная полипептидная цепь диффундирует от рибосомы. Вслед за этим происходит диссоциация комплекса мРНК—рибосома. Далее рибосома диссоциирует на 30S- и 50S-субчастицы. После реассоциации этих субчастиц с другой молекулой мРНК весь цикл синтеза белка начинается сначала.

*Генетический код.* Кодом наследственности или генетическим кодом называется процесс перевода триплетной последовательности нуклеотидов молекулы ДНК в последовательность аминокислот в белковой молекуле. Одним из важнейших свойств генетического кода является его колинеарность — четкое соответствие между последовательностями кодонов нуклеиновых кислот и аминокислотами полипептидных цепей.

Первое основание	Второе основание								Третье основание
	У		Ц		А		Г		
У	УУУ	Фенил-аланин	УЦУ	Серин	УАУ	Тирозин	УГУ	Цистеин	У
	УУЦ		УЦЦ		УАЦ		УГЦ		
	УУА	лейцин	УЦА		УАА	«Стоп»	УГА «Стоп»		Ц
	УУГ		УЦГ	УАГ	УГГ Триптофан		Г		
Ц	ЦУУ	Лейцин	ЦЦУ	Пролин	ЦАУ	Гистидин	ЦГУ	Аргинин	У
	ЦУЦ		ЦЦЦ		ЦАЦ		ЦГЦ		
	ЦУА		ЦЦА		ЦАА	Глутамин	ЦГА		Ц
	ЦУГ	ЦЦГ	ЦАГ	ЦГГ	Г				
А	АУУ	Изолейцин	АЦУ	Треонин	ААУ	Аспарагин	АГУ	Серин	У
	АУЦ		АЦЦ		ААЦ		АГЦ		
	АУА		АЦА		ААА	Лизин	АГА	Аргинин	Ц
	АУГ	Метионин	АЦГ	ААГ	АГГ		Г		
Г	ГУУ	Валин	ГЦУ	Аланин	ГАУ	Аспарагино-вая кислота	ГГУ	Глицин	У
	ГУЦ		ГЦЦ		ГАЦ		ГГЦ		
	ГУА		ГЦА		ГАА	Глутамино-вая кислота	ГГА		Ц
	ГУГ	ГЦГ	ГАГ	ГГГ	Г				

\* *Правила пользования таблицей: первый нуклеотид в триплете берется из левого вертикального ряда, второй – из верхнего горизонтального ряда и третий – из правого вертикального. Там, где пересекутся линии, идущие от всех трех нуклеотидов, и находится искомая аминокислота.*

Важное значение для раскрытия генетического кода имели исследования М. Ниренберга и Дж. Маттеи, а затем С. Очао с сотрудниками, начатые ими в 1961 г. в США. Они разработали метод и экспериментально установили последовательность нуклеотидов в кодонах мРНК, контролирующая местоположение данной аминокислоты в полипептидной цепи. В бесклеточную среду, содержащую все аминокислоты, рибосомы, тРНК, АТФ и ферменты, Ниренберг и Маттеи вводили искусственно синтезированный биополимер типа мРНК, представляющий собой цепочку одинаковых нуклеотидов — УУУ — УУУ — УУУ — УУУ — и т. д. Биополимер кодировал синтез полипептидной цепи, содержащей только одну аминокислоту — фенилаланин; такая цепь называется

полифенилаланином. Если мРНК состояла из кодонов, содержащих нуклеотиды с азотистым основанием цитозин, то синтезируется полипептидная цепь, содержащая аминокислоту пролин, — полипролин. Искусственные полимеры мРНК, содержащие кодоны АГУ, синтезировали полипептидную цепь из аминокислоты серии — полисерин и т. д. Этот метод позволил в начале 60-х годов полностью расшифровать генетический код и определить его свойства.

#### *Свойства генетического кода*

Генетический код универсален — един для всех организмов (вирусов, бактерий, растений, животных и человека).

Код триплетный. Местоположение каждой аминокислоты кодируется сочетанием строго определенных трех нуклеотидов в мРНК, образующих один специфический кодон.

Код вырожденный. Одна аминокислота может кодироваться несколькими (от одного до шести) кодонами. Только две аминокислоты кодируются одним триплетом — метионин (АУГ) и триптофан (УГГ).

Код неперекрывающийся. Нуклеотидная последовательность считывается подряд в одном направлении — от 5' к 3', триплет за триплетом.

Кодон АУГ, находящийся в начале мРНК на конце 5', является инициатором синтеза полипептидной цепи. Если данный кодон находится в середине мРНК, то он кодирует аминокислоту метионин.

Кодоны УАГ («амбер»), УАА («охра») и УГА («опал») являются терминаторами (стоп-сигналами) синтеза. Когда считывание генетической информации в мРНК доходит до одного из этих кодонов, дальнейший синтез прекращается и полипептидная цепь отделяется от рибосомы.

Следовательно, в каждой клетке в молекулах ДНК закодирована вся генетическая информация, которая может быть реализована в онтогенезе через биосинтез в виде биохимических процессов, физиологических свойств и морфологических признаков.

### **Контрольные вопросы, задачи**

3.1. Что такое транскрипция и трансляция?

**Задача:** Какой последовательностью азотистых оснований ДНК кодируется участок белка, если он имеет следующее строение:

пролин – орнитин – пролин – лейцин – валин – аргинин?

3.2. Что такое кодон и антикодон? Какова их биологическая роль?

**Задача:** Альбумин сыворотки крови человека имеет молекулярную массу 68400. Определите количество аминокислотных остатков в молекуле этого белка, если средняя молекулярная масса одного аминокислотного остатка принимается за 120.

3.3. Что такое генетический код? Назовите его свойства.

**Задача:** Фрагмент молекулы и-РНК имеет следующую последовательность нуклеотидов: ГАГ ЦЦА ААУ АЦУ УУА. Определите последовательность аминокислот в молекуле белка и её молекулярную массу.

3.4. За счет каких механизмов организм воспроизводит различные белки с сохранением их аминокислотной последовательности?

**Задача:** Закодируйте следующую последовательность аминокислот:

тирозин-аспарагин-треонин-пролин-цистеин,

используя одни, а затем другие триплеты, учитывая «вырожденность» генетического кода.

3.5. Приведите пример доказательства роли ДНК в наследственности.

**Задача:** Определите количество аминокислот, составляющих белковую молекулу, при условии, что молекулярный вес гена, контролирующего синтез этого белка, равен 323100. Средний молекулярный вес одного нуклеотида равен 340 дальтон.

3.6. Строение, действие и свойства генов.

**Задача:** Укажите последовательность аминокислот в белковой молекуле, кодируемых следующими нуклеотидами ДНК:

...АТА ЦТГ АЦА ТТА ГАА ...

Какой будет последовательность аминокислот, если между десятым и одиннадцатым нуклеотидами произойдет вставка гуанина?

3.7. Перечислите ингибиторы белкового синтеза.

**Задача:** Напишите последовательность расположения аминокислот на одном из участков молекулы белка, если известно, что он кодируется такой последовательностью нуклеотидов ДНК: АТГ ТЦГ ЦГТ ААА ЦАТ ...

Как изменится ответ, если химическим путем из молекулы ДНК будет удален десятый нуклеотид?

3.8. Строение и свойства хромосом. Их роль в наследственности. Как осуществляется реализация наследственной информации? (Биосинтез белка).

**Задача:** В синтезе белковой молекулы приняли участие 145 молекул т-РНК. Определите число нуклеотидов в и-РНК, гене ДНК и количество аминокислот в синтезированной молекуле белка.

3.9. ДНК и РНК, схема строения, сходства и различия между ними.

**Задача:** Определите молекулярный вес гена, детерминирующего образование инсулина, состоящего из 51 аминокислоты, если известно, что средний молекулярный вес нуклеотида равен 340 дальтон.

3.10. В чем значение упаковки ДНК в хроматине и хромосомах?

**Задача:** Участок гена состоит из следующих нуклеотидов:

...АГГ ТТЦ ГАЦ ТЦГ ЦАЦ АТГ ...

Расшифруйте последовательность аминокислот в белковой молекуле, кодируемой данным геном.

#### ***Тема 4. Изменчивость генетического материала.***

Изменчивость как состояние. В этом значении термин «изменчивость» служит для обозначения отличий биологических объектов друг от друга в данный момент времени. Всегда существуют различия между частями одного организма, между разными организмами в популяции, между разными внутривидовыми группировками, между популяциями.

Изменчивость как процесс. В этом значении термин «изменчивость» служит для обозначения изменения биологического объекта во времени. В этом случае изменчивость отражает развитие особи, отличие потомков от родителей.

Любая наблюдаемая изменчивость является фенотипической. В свою очередь, фенотипическая, или общая изменчивость включает три компонента:

Наследственная (генетическая, или генотипическая изменчивость) – в значительной мере обусловлена влиянием генетических факторов. Например, в сходных условиях выращивается несколько сортов одного вида растений. Тогда различия между результатами эксперимента (например, урожайность) обусловлены генетическими особенностями каждого сорта. В основе генетической изменчивости лежит мутационная и комбинативная изменчивость.

Ненаследственная (модификационная) изменчивость – в значительной мере обусловлена действием негенетических (экзогенных) факторов. Например, один сорт растений выращивается в разных условиях. Тогда различия между результатами эксперимента (например, урожайность) обусловлены влиянием условий выращивания растений.

Неконтролируемая (остаточная изменчивость) – обусловлена неконтролируемыми (по крайней мере, в данном эксперименте) факторами.

Для разных признаков влияние генотипа и условий среды на общую фенотипическую изменчивость неодинаково. Например, окраска шерсти, жирномолочность у крупного рогатого

скота, масса яиц у кур зависят, в основном, от особенностей породы (т.е. от генотипа) – эти признаки обладают высокой наследуемостью. Другие признаки: качество шерсти, общая удоимость у КРС, яйценоскость у кур – зависят, в основном, от условий выращивания и содержания – эти признаки обладают низкой наследуемостью.

2. Мутационная изменчивость. Основные положения мутационной теории. Общие свойства мутаций

Термин «мутация» (от лат. *mutatio* – изменение) долгое время использовался в биологии для обозначения любых скачкообразных изменений. Например, немецкий палеонтолог В.Вааген называл мутацией переход от одних ископаемых форм к другим. Мутацией называли также появление редких признаков, в частности, меланистических форм среди бабочек.

Современные представления о мутациях сложились к началу XX столетия. Например, российский ботаник Сергей Иванович Коржинский в 1899 г. разработал эволюционную теорию гетерогенезиса, основанную на представлениях о ведущей эволюционной роли дискретных (прерывистых) изменений.

Однако наиболее известной стала мутационная теория голландского ботаника Хьюго (Гуго) Де Фриза (1901 г.), который ввел современное, генетическое понятие мутации для обозначения редких вариантов признаков в потомстве родителей, которые не имели этого признака.

Основные положения мутационной теории Де Фриза остаются справедливыми и по сей день (разумеется, с некоторыми современными уточнениями):

	Положения мутационной теории Де Фриза	Современные уточнения
1	Мутации возникают внезапно, без всяких переходов.	существует особый тип мутаций, накапливающихся в течение ряда поколений (прогрессирующая амплификация в интронах).
2	Успех в выявлении мутаций зависит от числа проанализированных особей.	без изменений
3	Мутантные формы вполне устойчивы.	при условии 100%-ной пенетрантности и 100%-ной экспрессивности
4	Мутации характеризуются дискретностью (прерывистостью); это качественные изменения, которые не образуют непрерывных рядов, не группируются вокруг среднего типа (моды).	существуют ликовые мутации, в результате которых происходит незначительное изменение характеристик конечного продукта
5	Одни и те же мутации могут возникать повторно.	это касается генных мутаций; хромосомные aberrации уникальны и неповторимы
6	Мутации возникают в разных направлениях, они могут быть вредными и полезными.	сами по себе мутации не носят адаптивный характер; только в ходе эволюции, в ходе отбора оценивается «полезность», «нейтральность» или «вредность» мутаций в определенных условиях; при этом «вредность» и «полезность» мутаций зависит от генотипической среды

В настоящее время принято следующее определение мутаций:

Мутации – это качественные изменения генетического материала, приводящие к изменению тех или иных признаков организма.

Организм, во всех клетках которого обнаруживается мутация, называется мутантом. Это происходит в том случае, если данный организм развивается из мутантной клетки (гаметы, зиготы, споры). В ряде случаев мутация обнаруживается не во всех соматических клетках организма; такой организм называют генетической мозаикой. Это происходит, если мутации появляются в ходе онтогенеза – индивидуального развития. И, наконец, мутации могут происходить только в генеративных клетках (в гаметах, спорах и в клетках зародышевого пути – клетках-предшественницах спор и гамет). В последнем случае организм не является мутантом, но часть его потомков будет мутантами.

Различают «новые» мутации (возникающие *de novo*) и «старые» мутации. Старые мутации – это мутации, появившиеся в популяции задолго до начала их изучения; обычно о старых мутациях идет речь в генетике популяций и в эволюционной теории. Новые мутации – это мутации, появляющиеся в потомстве немутантных организмов ( $\text{♀ AA} \times \text{♂ AA} \rightarrow \text{Aa}$ ); обычно именно о таких мутациях идет речь в генетике мутагенеза.

Мутация – это случайное явление, т.е. невозможно предсказать: где, когда и какое изменение произойдет. Можно только оценить вероятность мутации в популяциях, зная фактические частоты определенных мутаций. Например, вероятность появления у кишечной палочки устойчивости к тетрациклину равна  $10^{-10}$  (одна десятиллиардная), поскольку лишь одна из 10 миллиардов клеток обнаруживает устойчивость к этому антибиотику (зато все потомство этой бактерии будет устойчивым к тетрациклину).

Установлено, что мутабельность гена (т.е. частота появления определенной мутации) зависит от природы гена: существуют гены, склонные к мутированию, и относительно стабильные гены.

В настоящее время считается, что многие мутации не оказывают существенного влияния на жизнеспособность особей; такие мутации называются нейтральными. Нейтральность мутаций часто обусловлена тем, что большинство мутантных аллелей рецессивно по отношению к исходному аллелю. Однако существуют мутации, приводящие к гибели организма (летальные) или заметно снижающие его жизнеспособность (полуметальные). В определенных условиях мутации могут повышать жизнеспособность организмов (как в примере с серповидноклеточной анемией).

По способности передаваться при половом размножении различают соматические и генеративные мутации. Соматические мутации не затрагивают половые клетки и не передаются потомкам. В результате соматических мутаций возникают генетические мозаики. Генеративные мутации происходят в половых клетках и могут передаваться потомкам. При участии мутантных половых клеток образуются полностью мутантные организмы.

Мутации возникают как в аутосомах, так и в половых хромосомах; соответственно различают аутосомные мутации и мутации, сцепленные с полом. Кроме того, по возможности проявления в фенотипе различают доминантные, полудоминантные и рецессивные мутации (заметим, что подавляющее большинство мутаций является рецессивными).

#### Классификации мутаций

Мутации классифицируют на основании различных критериев. Например, по уровню фенотипического проявления различают следующие мутации: биохимические (изменяется структура белков); физиолого-биохимические (изменяется обмен веществ); онтогенетические (изменяется характер онтогенеза); физиолого-репродуктивные (изменяются плодовитость, границы репродуктивного периода); анатомо-морфологические (изменяется внутреннее и внешнее строение организмов); этологические (поведенческие).

По уровню организации генетического материала, затронутого изменением, все мутации делят на генные, хромосомные и геномные.

Генные мутации выражаются в изменении структуры отдельных участков ДНК. По своим последствиям генные мутации делятся на две группы: мутации без сдвига рамки считывания и мутации со сдвигом рамки считывания.

Нонсенс-мутации. Особую группу генных мутаций составляют нонсенс-мутации с появлением стоп-кодонов. Нонсенс-мутации могут возникать как вследствие замен нуклеотидных пар, так и с потерями или вставками. С появлением стоп-кодонов синтез полипептида вообще обрывается. В результате могут возникать нуль-аллели, которым не соответствует ни один белок.

Кроме того, мутация в одном гене может подавлять мутации, происходящие в других (неаллельных) генах. Это явление называется межгенной супрессией.

Методы выявления генных мутаций можно разделить на две группы: методы генетического анализа и биохимические методы.

1. Методы генетического анализа основаны на скрещивании возможных носителей мутации с тестерными линиями (линиями-анализаторами). Самый простой метод – это скрещивание носителей предполагаемой мутации с соответствующей рецессивно-гомозиготной линией, т.е. обычное анализирующее скрещивание.

2. Биохимические методы выявления мутаций исключительно разнообразны и основаны на применении различных методик.

а). Методики, основанные на выявлении определенных биохимических продуктов мутантных генов. Легче всего выявлять мутации по изменению активности ферментов или по утрате какого-либо биохимического признака. Например, у микроорганизмов на селективных питательных средах выявляются ауксотрофные формы, не способные синтезировать определенные вещества (по сравнению с нормальными, прототрофными формами).

б). Методики, основанные на непосредственном выявлении измененных нуклеиновых кислот и белков с помощью гель-электрофореза в сочетании с другими методиками (блот-гибридизации, автордиографии).

По причинам возникновения различают спонтанные и индуцированные мутации.

Спонтанные (самопроизвольные) мутации возникают без видимых причин. Эти мутации иногда рассматривают как ошибки трех Р: процессов репликации, репарации и рекомбинации ДНК. Это означает, что процесс возникновения новых мутаций находится под генетическим контролем организма. Например, известны мутации, которые повышают или понижают частоту других мутаций; следовательно, существуют гены-мутаторы и гены-антимутаторы.

Индукцированные мутации возникают под действием мутагенов. Мутагены – это разнообразные факторы, которые повышают частоту мутаций. Впервые индуцированные мутации были получены отечественными генетиками Г.А. Надсоном и Г.С. Филипповым в 1925 г. при облучении дрожжей излучением радия.

Различают несколько классов мутагенов:

- Физические мутагены: ионизирующие излучения, тепловое излучение, ультрафиолетовое излучение.
- Химические мутагены: аналоги азотистых оснований (например, 5-бромурацил), альдегиды, нитриты, метилирующие агенты, гидроксилламин, ионы тяжелых металлов, некоторые лекарственные препараты и средства защиты растений.
- Биологические мутагены: чистая ДНК, вирусы, антивирусные вакцины.
- Аутомутагены – промежуточные продукты обмена веществ. Например, этиловый спирт сам по себе мутагеном не является. Однако в организме человека он окисляется до ацетальдегида, а это вещество уже является мутагеном.

К физическим мутагенам относятся: ионизирующее излучение (альфа-, бета-, гамма-, нейтронное и рентгеновское излучение), коротковолновое ультрафиолетовое излучение, СВЧ-излучение, действие экстремальных температур.

К химическим мутагенам относятся самые разнообразные вещества: алкилирующие агенты вызывают алкилирование ДНК (например, метилирование, этилирование и т.д.). В результате при репликации ДНК нарушается принцип комплементарности, и происходит замена нуклеотидных пар: ГЦ → АТ; ГЦ → ЦГ; ГЦ → ТА; гидроксилламин избирательно аминирует цитозин, что также нарушает принцип комплементарности при репликации ДНК. В результате происходит замена ГЦ → АТ; нитриты осуществляют окислительное дезаминирование гуанина, аденина, цитозина. Также нарушается принцип комплементарности при репликации ДНК. В результате происходит замена АТ → ГЦ; аналоги оснований способны образовывать комплементарные пары с разными «нормальными» основаниями.

Установлено, что мутагены при определенных условиях оказывают канцерогенное и тератогенное действие. Канцерогены – это факторы, провоцирующие развитие онкологических заболеваний; тератогены – это факторы, провоцирующие развитие различных аномалий, уродств. Тератогенный эффект дают многие лекарственные препараты. Например, в 1960-е гг. на Западе широко использовалось снотворное талидомид, применение которого привело к рождению большого числа детей с недоразвитыми конечностями.

Наряду с тератами – уродствами – часто встречаются морфозы – изменения, которые не ведут к утрате органом его функций. Отличить мутагенное действие от тератогенного сравнительно легко: тераты (уродства) являются ненаследственными модификациями, они предсказуемы (направлены) и не сохраняются в последующих поколениях. Например, серая окраска тела у дрозофилы – это нормальный признак. В то же время известна мутация yellow – желтое тело (эту мутацию легко получить искусственно, обрабатывая родителей особей различными мутагенами; при этом разные мутагены могут давать одинаковый фенотипический эффект). Если же личинкам дрозофилы добавлять в корм азотнокислое серебро, то все эти личинки разовьются в мух с желтым телом. Но, если от этих желтых мух получить потомство и выращивать его на обычной питательной среде, то все потомки вновь станут серыми. Таким образом, в данном случае «пожелтение» тела мух – это не мутация, а модификация, или

фенокопия (модификация, по фенотипу копирующая мутацию); азотнокислое серебро в данном случае является не мутагеном, а тератогеном.

#### Хромосомные и геномные мутации

Хромосомными перестройками, или хромосомными аберрациями называются видимые изменения структуры хромосом. (Иногда хромосомные перестройки называют хромосомными мутациями.) Хромосомные аберрации (в отличие от генных мутаций) всегда уникальны, неповторимы. Поэтому при отсутствии близкородственного скрещивания хромосомные аберрации встречаются только в гетерозиготном состоянии: в сочетании с нормальными хромосомами или в компаунде с другими аберрациями. При близкородственном скрещивании (инбридинге) возможно образование гомозигот.

Различают внутривхромосомные аберрации (фрагментацию, нехватки, дубликации, инверсии, транспозиции) и межхромосомные (транслокации). Фрагментация – это дробление хромосом с образованием множества различных фрагментов. У некоторых организмов существуют полицентрические хромосомы, и при фрагментации каждый из фрагментов получает центромеру, тогда он может нормально реплицироваться и участвовать в делении клетки.

Концевые нехватки, или дефишенсы – потери концевых, теломерных участков хромосом. В результате образуются линейные фрагменты, лишённые центромеры (линейные ацентрики). Ацентрики не участвуют в делении клетки и утрачиваются.

Нехватки внутренних участков, или делеции – потери участков хромосом, не затрагивающие теломеры. Утраченные участки, лишённые центромер, обычно образуют кольцевые ацентрики, которые также утрачиваются.

Дубликации – это удвоения участков хромосом. В результате возникают тандемные последовательности генов, например: abcabc. Дубликации – один из путей возникновения новых генов.

Инверсии – повороты участков хромосом на  $180^\circ$ . Различают перичентрические инверсии (инвертированный участок включает центромеру) и парацентрические (инвертированный участок лежит в одном из плеч хромосомы вне центромеры). У гетерозигот при перекресте нормальных и инвертированных хромосом возникают ацентрики и дицентрики; в результате возникают неполноценные клетки, и продукты кроссинговера не переходят в последующие поколения (поэтому инверсии образно называют «запирающими кроссинговера»). Таким образом, инверсии способствуют сохранению целых блоков генов – супергенов. Если инверсии сочетаются с дубликациями, то могут возникать палиндромы, например: abcbsa.

Транспозиции – это перемещения участков хромосомы в другие локусы (точки) этой же хромосомы. Существуют участки хромосом, склонные к транспозициям, их называют «прыгающими генами», мобильными генетическими элементами, или транспозонами. При транспозициях гены, изменившие свое положение, могут изменять свою активность – такое явление называется эффектом положения. В результате эффекта положения гены изменяют свои первоначальные функции, что приводит, в сущности, к появлению новых генов.

Транслокации – это перемещения участков хромосомы или всей хромосомы в другую хромосому. В некоторых случаях происходит полное слияние гомологичных хромосом с образованием двуцентромерных структур – дицентриков. В других случаях из двух акроцентрических хромосом образуется одноцентромерная двуплечая хромосома. Такое слияние хромосом называется Робертсоновской транслокацией. Робертсоновские транслокации часто встречаются у грызунов.

Последствия хромосомных аберраций у разных организмов различны. У относительно низкоорганизованных организмов (у растений, насекомых, грызунов) хромосомные перестройки могут приводить к появлению новых признаков, но могут и не проявляться фенотипически. У человека хромосомные перестройки в гетерозиготном состоянии снижают плодовитость, а в гомозиготном – летальны.

Методы выявления хромосомных аберраций. Для выявления хромосомных аберраций используются различные методы цитогенетического анализа. Например, анафазный анализ позволяет выявить мосты и отставания (дицентрики и другие продукты транслокаций), фрагменты (ацентрики). Метафазный и пахитенный анализ позволяют выявить изменение структуры хромосом, линейные и кольцевые фрагменты. Особое место в выявлении хромосомных аберраций занимает анализ гигантских политенных хромосом, встречающихся в слюнных железах личинок двукрылых (комаров, мух) и в некоторых клетках других организмов. Этот метод основан на

нарушении нормальной соматической конъюгации политенных хромосом у гетерозигот по хромосомным aberrациям; в результате образуются различной формы петли.

Изменение числа хромосом в клетке означает изменение генома. (Поэтому такие изменения часто называют геномными мутациями.) Известны различные цитогенетические феномены, связанные с изменением числа хромосом.

Автополиплоидия представляет собой многократное повторение одного и того же генома, или основного числа хромосом ( $x$ ).

Этот тип полиплоидии характерен для низших эукариот и покрытосеменных растений. У многоклеточных животных автополиплоидия встречается крайне редко: у дождевых червей, некоторых насекомых, некоторых рыб и земноводных. Автополиплоиды у человека и других высших позвоночных погибают на ранних стадиях внутриутробного развития.

У большинства эукариотических организмов основное число хромосом ( $x$ ) совпадает с гаплоидным набором хромосом ( $n$ ); при этом гаплоидное число хромосом – это число хромосом в клетках, образовавшихся в хорде мейоза. Тогда в диплоидных ( $2n$ ) содержится два генома  $x$ , и  $2n=2x$ . Однако у многих низших эукариот, многих споровых и покрытосеменных растений в диплоидных клетках содержится не 2 генома, а некоторое иное число. Число геномов в диплоидных клетках называется геномным числом ( $\Omega$ ). Последовательность геномных чисел называется полиплоидным рядом.

Положительные эффекты полиплоидии связаны с увеличением числа копий одного и того же гена в клетках, и, соответственно, в увеличении дозы (концентрации) ферментов. Однако в ряде случаев полиплоидия приводит к угнетению физиологических процессов, особенно при очень высоких уровнях плоидности. Например, 84-хромосомная пшеница менее продуктивна, чем 42-хромосомная.

Однако автополиплоиды (особенно несбалансированные) характеризуются сниженной плодовитостью или полным бесплодием, что связано с нарушениями мейоза. Поэтому многие из них способны только к размножению вегетативным путем.

Аллополиплоидия представляет собой многократное повторение двух и более разных гаплоидных хромосомных наборов, которые обозначаются разными символами. Полиплоиды, полученные в результате отдаленной гибридизации, то есть от скрещивания организмов, принадлежащих к различным видам, и содержащие два и более набора разных хромосом, называются аллополиплоиды.

Аллополиплоиды широко распространены среди культурных растений. Однако, если в соматических клетках содержится по одному геному от разных видов (например, один геном А и один – В), то такой аллополиплоид – бесплоден. Бесплодие простых межвидовых гибридов связано с тем, что каждая хромосома представлена одним гомологом, и образование бивалентов в мейозе оказывается невозможным. Таким образом, при отдаленной гибридизации возникает мейотический фильтр, препятствующий передаче наследственных задатков в последующие поколения половым путем.

Анеуплоидия (гетерополиплоидия) – это изменение числа хромосом в клетках, не кратное основному хромосомному числу. Различают несколько типов анеуплоидии. При моносомии утрачивается одна из хромосом диплоидного набора ( $2n - 1$ ). При полисомии к кариотипу добавляется одна или несколько хромосом. Частным случаем полисомии является трисомия ( $2n + 1$ ), когда вместо двух гомологов их становится три. При нуллисомии отсутствуют оба гомолога какой-либо пары хромосом ( $2n - 2$ ).

У человека анеуплоидия приводит к развитию тяжелых наследственных заболеваний. Часть из них связана с изменением числа половых хромосом. Однако существуют и другие заболевания:

- Трисомия по 21-ой хромосоме (генотип 47, +21); синдром Дауна; частота среди новорожденных – 1:700. Замедленное физическое и умственное развитие, широкое расстояние между ноздрями, широкая переносица, развитие складки века (эпикант), полуоткрытый рот. В половине случаев встречаются нарушения в строении сердца и кровеносных сосудов. Обычно понижен иммунитет. Средняя продолжительность жизни – 9-15 лет.
- Трисомия по 13-ой хромосоме (генотип 47, +13); синдром Патау. Частота среди новорожденных – 1:5.000.
- Трисомия по 18-ой хромосоме (генотип 47, +18); синдром Эдвардса. Частота среди новорожденных – 1:10.000.

Уменьшение числа хромосом в соматических клетках до основного числа называется гаплоидия. Существуют организмы–гапобионты, для которых гаплоидия – это нормальное состояние (многие низшие эукариоты, гаметофиты высших растений, самцы перепончатокрылых насекомых). Гаплоидия как аномальное явление встречается среди спорофитов высших растений: у томата, табака, льна, дурмана, некоторых злаков. Гаплоидные растения отличаются пониженной жизнеспособностью; они практически бесплодны.

Псевдополиплоидия (ложная полиплоидия). В некоторых случаях изменение числа хромосом может произойти без изменения объема генетического материала. Образно выражаясь, изменяется число томов, но не изменяется число фраз. Такое явление называется псевдополиплоидия. Различают две основные формы псевдополиплоидии:

1. Агматополлиплоидия. Наблюдается в том случае, если крупные хромосомы распадаются на множество мелких. Встречается у некоторых растений и насекомых. У некоторых организмов (например, у круглых червей) происходит фрагментация хромосом в соматических клетках, но в половых клетках сохраняются исходные крупные хромосомы.

2. Слияние хромосом. Наблюдается в том случае, если мелкие хромосомы объединяются в крупные. Встречается у грызунов.

### Контрольные вопросы, задачи

4.1. Что такое мутация и мутагенез?

**Задача:** У человека, имеющего нормальный (*HbA*) гемоглобин, один из триплетов ДНК, его кодирующий, имеет следующую последовательность азотистых оснований ЦТТ, в случае серповидноклеточности гемоглобина (*HbS*) эта последовательность мутационно изменена на ЦАТ, а в случае гемоглобина с (*HbC*) на — ТТТ. Укажите, какими заменами аминокислот в гемоглобине сопровождаются эти мутации.

4.2. Что такое полиплоидия? Значение полиплоидов в повышении продуктивности сельскохозяйственных растений.

**Задача:** Участки смысловой цепочки структурных «нормальных» генов имеют следующую последовательность азотистых оснований:

а) ГГГ АТА Г АТ ААА ГЦА ТЦГ ЦТТ ТГА

б) АГГ ААА ТГТ АГГ ТЦГ ГЦА ЦАГ АГГ

в) ТАГ ГАТ ТЦГ АЦЦ ТТТ АГГ ААГ ГАА

При мутации генов в четвертом триплете каждой цепочки произошла замена первого азотистого основания А на Ц. Изобразите первичную структуру белка детерминированного «нормальными» и мутантными генами.

В вышеприведенных участках структурных генов после второго триплета выпало первое основание третьего триплета и добавился гуанин после пятого триплета. К каким изменениям в первичной структуре белка это приведет?

4.3. Какие типы генных мутаций вам известны?

**Задача:** Под действием ионизирующей радиации иногда происходит выпадение отдельных нуклеотидов ДНК, сама же молекула сохраняет при этом все свои свойства. Допустим, что в одном случае из молекулы ДНК бактериальной клетки выпал только один нуклеотид, в другом три нуклеотида подряд, а в третьем — тоже три нуклеотида, но расположенные на некотором расстоянии друг от друга. Как это отразится на белке, синтезируемом такими мутантными генами? В каких случаях образующийся белок будет отличаться от нормального всего сильнее, всего слабее?

4.4. Чем отличаются генные мутации от геномных?

**Задача:** Участок смысловой цепочки гена бактериальной клетки имел следующий состав и последовательность азотистых оснований:

ГГТ ТГГ ЦАГ ТЦГ ГАГ ГГГ ТТТ ААГ

Определить, как изменится состав кодируемых им аминокислот, если под воздействием ионизирующей радиации:

а) выбит 13 слева нуклеотид, б) выбиты 13, 14, 15 нуклеотиды, в) выбиты 2, 5, 7 нуклеотиды.

4.5. Спонтанный и искусственный мутагенез. Мутагенные факторы.

**Задача:** Азотистая кислота превращает цитозин в гуанин. Какое строение будет иметь участок синтезируемого белка, если должен был синтезироваться белок, РНК — содержащего вируса табачной мозаики со следующей последовательностью аминокислот: серин — глицин — серин — изолейцин — треонин — пролин — серин, но все цитозиновые основания соответствующего участка РНК вируса подверглись указанному химическому превращению?

4.6. Какая изменчивость называется мутационной? Современная классификация мутаций, их характеристика и причины возникновения.

**Задача:** Вирус коровьей оспы содержит двухцепочную ДНК. После внедрения в клетку — хозяина при участии собственной транскриптазы происходит синтез как вирусной РНК, так и репликация вирусной ДНК. Составьте схему репликаций ДНК, транскрипции и трансляции белков капсулы следующих участков вирусной ДНК:

а) ТГГ ГАА АГТ ЦАГ ААГ ЦТГ АЦЦ

б) ГГТ ТЦА АЦЦ ТАЦ ГТА ЦЦА ЦАЦ

в) ААЦ ГАЦ ТАЦ ЦГА ТТА ЦТЦ ТЦЦ

Определить, к каким изменениям в молекулах ДНК и закодированным на них аминокислотам приведет:

а) выпадение первого нуклеотида из второго триплета;

б) вставка нуклеотида с аденином после третьего триплета;

в) замена цитозина на тимин в шестом триплете.

4.7. Понятие о кариотипе и хромосомные мутации у сельскохозяйственных животных.

**Задача:** Бактериофаг, паразитирующий в кишечной палочке, содержит в зрелых частицах одноцепочную ДНК (+) цепь. После внедрения в бактериальную клетку молекула ДНК достраивает комплементарную (—) цепь, которая становится матрицей для синтеза И-РНК и детерминирует синтез белковой оболочки фага. Составьте схему транскрипции и трансляции следующих (+) цепей ДНК бактериофага:

а) АГТ ГТА ТАЦ ГГГ АТА ЦГА АЦЦ

б) ТЦЦ АЦГ ТГГ ЦЦТ АТЦ ГАЦ ТЦА

в) ЦЦТ ЦАГ ГАТ ТТА ГТА ЦАЦ ГГА

4.8. Классификация мутаций по характеру гена.

**Задача:** В синтезе белковой молекулы приняли участие 145 молекул т-РНК. Определите число нуклеотидов в и-РНК, гене ДНК и количество аминокислот в синтезированной молекуле белка.

4.9. Чем отличаются aberrации хромосомного типа от хроматидных aberrаций?

**Задача:** Энцефалит лошадей вызывается РНК содержащим вирусом. Вирусная РНК зрелой частицы обозначается как (+) цепь. Внедрившись в клетки животного (+) цепь достраивает комплементарную (—) цепь РНК, которая служит как для образования белков капсулы, так и для новых вирионных (+) цепей. Составьте схему образования новых вирионных цепей и капсидных белков следующих (+) цепей вируса энцефалита лошадей:

а) УАУ УГУ АГУ ЦУА ГАУГГЦ

б) АУГ АЦГ ЦГА ААГ АГУ ГАА

в) ГАГ УГГ ГУА УУА ЦАЦ ГЦА

4.10. Чем отличаются aberrации хромосомного типа от хроматидных aberrаций?

**Задача:** Участок ДНК содержит информацию о следующей последовательности аминокислот:

мет – тре – про – ала – глу – гли – сер

При транскрипции произошла потеря первого нуклеотида. Каков фенотипический эффект мутации?

### ***Тема 5. Генная инженерия.***

В 1972 г. Пол Берг с сотрудниками опубликовали первую работу о получении *in vitro* (вне организма) рекомбинантной (гибридной) молекулы ДНК, состоящей из фрагментов фаговой, бактериальной и вирусной ДНК. Так родилась новая отрасль молекулярной биологии, получившая название "генетическая (генная) инженерия". Своей целью она имеет создание новых генетических структур и, в конечном счете, создание организмов с новыми наследственными свойствами.

Цель прикладной генетической инженерии заключается в конструировании таких рекомбинантных молекул ДНК, которые при внедрении в генетический аппарат придавали бы организму свойства, полезные для человека.

Технология рекомбинантных ДНК использует следующие методы:

- специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами, ускоряющее выделение и манипуляции с отдельными генами;
- быстрое секвенирование всех нуклеотидов очищенном фрагменте ДНК, что позволяет определить границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую им;
- конструирование рекомбинантной ДНК;
- гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большей точностью и чувствительностью, основанную на их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот;
- клонирование ДНК: амплификация *in vitro* с помощью цепной полимеразной реакции или введение фрагмента ДНК в бактериальную клетку, которая после такой трансформации воспроизводит этот фрагмент в миллионах копий;
- введение рекомбинантной ДНК в клетки или организмы.

Трансгенные растения и животные. Веками селекционеры работают над выведением новых сортов культурных растений, придавая им свойства, необходимые для практического использования. Достаточно сравнить цветок розы с цветком шиповника, чтобы убедиться, сколь велики достижения трудов человеческих. Правда, при этом вспоминаешь, что путь от диких предков к культурным растениям простирается на десятки тысяч лет. При этом чем лучше сорт растения или порода животного, тем они капризнее, больше подвержены различным вирусным и микробным заболеваниям, малоустойчивы к насекомым, засухе и т.д.

С этой целью была разработана система переноса в растения различных чужих генов, которые могут сообщать растениям полезные свойства. Наиболее распространен перенос генов с помощью вируса, поражающего фитопатогенную бактерию *Agrobacterium tumefaciens*. Плазмида найденного в клетках *A. tumefaciens* способна переносить часть своей ДНК в растительные клетки. Именно в эту ДНК встраивается необходимый "полезный" ген. Растения, в хромосому которых встраивается чужой ген, называются трансгенными.

Впервые трансгенные растения были получены в 1982 году учеными из Института растениеводства в Кельне и компании Monsanto. В результате растения приобрели устойчивость к антибиотику канамицину, ингибирующему рост. В настоящее время только в компании Monsanto получено более 45 тысяч независимых линий трансгенных растений.

Одна из важных задач - получение растений, устойчивых к вирусам, так как в настоящее время не существует прямых способов борьбы с вирусными инфекциями сельскохозяйственных культур. Ученые из Университета штата Вашингтон решили, что устойчивость к вирусам можно "привить" растениям, вводя в растительные клетки гены белка оболочки вируса табачной мозаики. Эксперимент полностью подтвердил это предположение: интенсивный синтез белка оболочки любого вируса в клетках растений вызывает устойчивость к данному вирусу. В настоящее время получены трансгенные растения, способные противостоять воздействию более десятка различных вирусных инфекций. Еще одна задача связана с защитой растений от насекомых-вредителей. Применение инсектицидов не вполне эффективно, во-первых, из-за их токсичности, во-вторых, потому, что дождевой водой они смываются с растений. В генно-инженерных лабораториях Бельгии и США были успешно проведены работы по внедрению в растительную клетку генов, отвечающих за синтез инсектицидов бактериального происхождения. Эти гены ввели в клетки картофеля, томатов и хлопчатника. Трансгенные растения картофеля и томатов были устойчивы к колорадскому жуку, растения хлопчатника оказались устойчивыми к разным насекомым, в том числе к хлопковой совке. Применение инсектицидов было сокращено на 40 - 60%.

Генные инженеры вывели трансгенные растения с удлинённым сроком созревания плодов. Такие помидоры, например, можно снимать с куста красными, не боясь, что они перезреют при транспортировке.

Список растений, к которым успешно применены методы генной инженерии, составляет около пятидесяти видов, включая яблоню, сливу, виноград, капусту, баклажаны, огурец, пшеницу, сою, рис, рожь и много других сельскохозяйственных растений, возделывание которых в ближайшем будущем будет существенно облегчено благодаря генетическим модификациям.

При использовании *Agrobacterium* вводимая ДНК (чужеродный ген) включается в бактериальную плазмиду. Бактериями, несущими химерную плазмиду, заражают клетки растений и переносят в них нужную ДНК. Второй метод — так называемая ДНК-пушка — состоит в том, что растительные клетки бомбардируют металлическими частицами, покрытыми ДНК. В обоих случаях попавшая в клетку ДНК встраивается в ее хромосомы, затем клетка делится, и из нее регенерирует целое растение.

Если гибридную ДНК ввести в оплодотворенную яйцеклетку, могут быть получены трансгенные организмы, экспрессирующие мутантный ген и передающие его потомкам. Генетическая трансформация животных позволяет установить роль отдельных генов и их белковых продуктов как в регуляции активности других генов, так и при различных патологических процессах. С помощью генетической инженерии созданы линии животных, устойчивых к вирусным заболеваниям, а также породы животных с полезными для человека признаками. Например, микроинъекция рекомбинантной ДНК, содержащей ген соматотропина быка в зиготу кролика позволила получить трансгенное животное с гиперпродукцией этого гормона. Полученные животные обладали ярко выраженной акромегалией.

Клонирование животных. Под клоном обычно подразумевается популяция клеток или организмов - потомков одной клетки или организма, полученных неполовым путем. Таким образом, все особи в клоне имеют идентичный набор генов и должны быть точной копией взятого для размножения экземпляра (соответствующего прототипа).

У животных генетики могут получить подобные клоны в том случае, когда используемые ими объекты размножаются путем партеногенеза, т.е. бесполом путем, без предшествующего оплодотворения. У нас в стране блестящие работы по клонированию выполнены на шелкопряде академиком В.А. Струнниковым. Выведенные ими клоны шелкопряда (партеноклоны мужского пола, дающие на 20% больше шелка, чем женские) известны на весь мир.

Высшие животные в природе размножаются только половым путем. Клетки животных, дифференцируясь, лишаются тотипотентности. Считают, что в ходе клеточной дифференцировки у позвоночных происходит или потеря определенных генных локусов или их необратимая инактивация. В этом - одно из существенных их отличий от клеток растений и главное препятствие для клонирования взрослых позвоночных животных. Поэтому для клонирования взрослых позвоночных в основном используют малодифференцированные (не прошедшие специализации) делящиеся клетки.

Для клонирования животных ядро оплодотворенной яйцеклетки заменяют ядром, взятым от другой особи (с другой генетической информацией). Собственно ядро удаляется или инактивируется хирургически. Оказалось, что тотипотентность (возможность развиваться во взрослую особь) сохраняют ядра из клеток очень ранних эмбрионов. Когда число клеток (бластомер) эмбриона не превышает восьми, они еще тотипотентны и каждая из них может дать начало новому организму. Это позволяет проводить искусственное разделение 4-8 клеточных эмбрионов на отдельные клетки, культивировать их *in vitro* до стадии бластоцисты и имплантировать в матку "приемной" (суррогатной) матери, где они развиваются до рождения. Таким путем можно получать генотипически одинаковые особи (однойцевых близнецов).

### **Контрольные вопросы, задачи**

- 5.1. В чем сущность генной инженерии?
- 5.2. Как получают трансгенных животных?
- 5.3. В чем заключается метод клонирования млекопитающих?
- 5.4. Какие методы использует технология рекомбинантных ДНК?
- 5.5. Достижения генной инженерии.
- 5.6. Методы генной инженерии.
- 5.7. Как получают трансгенных растений?
- 5.8. Какие задачи решает генная инженерия?
- 5.9. Что такое полимеразная цепная реакция и для чего она используется?
- 5.10. Перспективы развития генной инженерии.
- 5.11. Что такое гибридизация ДНК?

### ***Тема 6. Ферменты генной инженерии.***

Ферменты, применяемые в генной инженерии, лишены видовой специфичности, поэтому экспериментатор может сочетать в единое целое фрагменты ДНК любого происхождения в избранной им последовательности. Это позволяет генной инженерии преодолевать установленные природой видовые барьеры и осуществлять межвидовое скрещивание.

Ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК, можно разделить на несколько групп:

- ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (рестриктазы);
- ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (обратные транскриптазы);
- ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (лигазы);
- ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК.

Рестриктазы (рестрицирующие эндонуклеазы, эндонуклеазы рестрикции) - это ферменты, узнающие и атакующие определенные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК (сайты рестрикции).

Системы рестрикции и модификации широко распространены у бактерий; их существование играет важную роль в защите резидентной ДНК от загрязнения

последовательностями чужеродного происхождения. Рестриктаза, которая расщепляла неметилованную ДНК была выделена в 1968 г. Мезельсоном и Юанем. Этот фермент был высокоспецифичен по отношению к определенной последовательности ДНК, но расщеплял молекулы неспецифически, в другом месте, на некотором удалении от участка узнавания. Вскоре, в 1970 г. Смит и Вилькоккс выделили из *Haemophilus influenzae* первую рестриктазу, которая расщепляла строго определенную последовательность ДНК (Hind III). Поскольку разные бактерии по-разному метят свою ДНК, то и рестриктазы должны узнавать разные последовательности. И действительно, с тех пор выделены рестриктазы, узнающие более 150 сайтов рестрикции (мест расщепления ДНК).

Различают 3 основных класса рестриктаз: 1, 2 и 3.

Все рестриктазы узнают на двуспиральной ДНК строго определенные последовательности, но рестриктазы 1-го класса осуществляют разрывы в произвольных точках молекулы ДНК, а рестриктазы 2-го и 3-го классов узнают и расщепляют ДНК в строго определенных точках внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии.

Ферменты типов 1 и 3 имеют сложную субъединичную структуру и обладают двумя типами активностей - модифицирующей (метилирующей) и АТФ-зависимой эндонуклеазной.

Ферменты второго класса состоят из 2 отдельных белков: рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы, поэтому в генной инженерии используются исключительно ферменты 2-го класса. Они нуждаются в ионах магния в качестве кофакторов.

В настоящее время выделено более 500 рестриктаз класса 2, однако среди ферментов, выделенных из различных микроорганизмов, встречаются такие, которые узнают на ДНК одни и те же последовательности. Такие пары или группы называют изошизомерами. Различают истинную изошизомерию, когда ферменты узнают одну и ту же последовательность нуклеотидов и разрезают ДНК в одних и тех же точках, и ложную, когда ферменты, узнавая один и тот же сайт на ДНК, производят разрывы в разных точках в пределах того же сайта.

Полимераза. Впервые ДНК-полимераза была выделена Корнбергом с сотрудниками в 1958 году из *E. coli*.

ДНК-полимераза I *E. coli* (Pol I) не связывается с молекулами двухцепочечной кольцевой ДНК. Однако, если такие молекулы денатурировать и получить одноцепочечные формы, то с последними полимераза связывается в количествах, пропорциональных длине этих участков — примерно одна молекула на 300 нуклеотидных остатков. Pol I связывается с одноцепочечными участками двойной спирали ДНК, в местах одноцепочечных разрывов с 3'-гидроксильной группой и 5'-фосфатом, а также с концами двухцепочечных молекул ДНК.

Фермент состоит из мономерной полипептидной цепи с молекулярной массой 103 кДа и имеет 3-х доменную структуру. Каждый домен обладает своей ферментативной активностью: 5' - 3' полимеразной, 3' - 5' экзонуклеазной, 5' - 3' экзонуклеазной.

1. 5'— 3' полимеразная активность. Для реакции необходимо наличие одноцепочечной ДНК-матрицы и комплементарного участку этой цепи фрагмента — праймера (затравки) с 3'-ОН концом.

2. 3'- 5' экзонуклеазная активность. Гидролизует одноцепочечную или двухцепочечную ДНК с 3'-ОН конца. 3'—5' нуклеаза расщепляет дизфирную связь только в неспаренных участках ДНК. Известно, что при полимеразной реакции с определенной частотой возможно включение в растущую цепь некомлементарного нуклеотида. Однако полимераза не может присоединять нуклеотид к неправильно спаренному концу, образовавшемуся при ее участии. На помощь приходит 3'—5' экзонуклеаза, убирающая ошибочный нуклеотид, на место которого затем присоединяется правильный нуклеотид-предшественник. 3'—5' экзонуклеолитическая активность проявляется в направлении,

обратном синтезу ДНК. Таким образом, 3'—5' экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы играет важную роль в точности полимеризации, направляемой матрицей. Эффективность, или число оборотов, данной экзонуклеазы в оптимальных условиях составляет 2% от числа оборотов субъединицы с полимеразной активностью.

3. 5'—3' экзонуклеазная активность. Деградирует одну цепь двухцепочечной ДНК, начиная со свободного 5'-конца. В отличие от 3'—5' экзонуклеазы 5'—3' экзонуклеаза расщепляет диэфирную связь только в спаренных участках двухцепочечной молекулы ДНК. Более того, в то время как 3'—5' нуклеаза отщепляет одномоментно только один нуклеотид, 5'—3' нуклеаза может вырезать с 5'-конца олигонуклеотиды длиной до десяти остатков (около 20% продуктов гидролиза): Скорость нуклеазного отщепления увеличивается на порядок при одновременно протекающей реакции полимеризации. При этом увеличивается относительное количество олигонуклеотидов в продуктах гидролиза ДНК.

Такое сочетание ферментативных активностей позволяет ДНК-полимеразе I *E. coli* играть активную роль в репарации повреждений ДНК *in vivo*. N-концевой домен соединен с соседней петлей из аминокислотных остатков и легко отделяется с помощью протеолитических ферментов. Оставшаяся часть бифункциональна, так как состоит из полимеразы и 3' - 5' экзонуклеазы. Она названа фрагментом Кленова (по фамилии одного из авторов, описавших ее). Фрагмент Кленова (Pol IK) обычно используют для достройки одноцепочечных 5'-концов на двухцепочечной ДНК, часто генерируемых рестриктазами, до тупых; для синтеза второй цепи на одноцепочечной ДНК, а также для гидролиза одноцепочечных 3'-концов на двухцепочечных молекулах ДНК.

Обратная транскриптаза используется для транскрипции м-РНК в комплементарную цепь ДНК. При изучении ретровирусов, геном которых представлен молекулами одноцепочечной РНК, было обнаружено, что в процессе внутриклеточного развития ретровирус проходит стадию интеграции своего генома в виде двухцепочечной ДНК в хромосомы клетки-хозяина. В 1964 г. Темин выдвинул гипотезу о существовании вирусспецифичного фермента, способного синтезировать на РНК-матрице комплементарную ДНК. Усилия, направленные на выделение такого фермента, увенчались успехом, и в 1970 г. Темин с Мизутани, а также независимо от них Балтимор открыли искомым фермент в препарате внеклеточных вирионов вируса саркомы Рауса. Данная РНК-зависимая ДНК-полимераза получила название обратная транскриптаза, или ревертаза.

Наиболее детально изучена ревертаза ретровирусов птиц. Каждый вирион содержит около 50 молекул этого фермента. Обратная транскриптаза состоит из двух субъединиц — а (65 кДа) и b (95 кДа), присутствующих в эквимольном количестве. Обратная транскриптаза обладает, по крайней мере, тремя ферментативными активностями:

- 1) ДНК-полимеразной, использующей в качестве матрицы как РНК, так и ДНК;
- 2) активностью РНКазы Н, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК—ДНК, но не одно- или двухцепочечную РНК;
- 3) ДНК-эндонуклеазной активностью.

Обратную транскриптазу преимущественно используют для транскрипции матричной РНК в комплементарную ДНК (кДНК). Реакцию обратной транскрипции проводят в специально подобранных условиях с использованием сильных ингибиторов РНКазной активности. При этом удается получать полноразмерные ДНК-копии целевых молекул РНК. В качестве праймера при обратной транскрипции поли (А)-содержащих мРНК используют олиго (dT), а для молекул РНК, не имеющих 3'-поли (А) концов, — химически синтезированные олигонуклеотиды, комплементарные 3'-концу изучаемой РНК. После синтеза на мРНК комплементарной цепи ДНК и разрушения РНК (обычно применяют обработку щелочью) осуществляют синтез второй цепи ДНК. При этом используют способность ревертазы образовывать на 3'-концах одноцепочечных кДНК самокомплементарные шпильки, которые могут выполнять функции праймера.

Лигазы. В 1961 г. Мезельсон и Вейгл на примере фага  $\lambda$  показали, что рекомбинация включает разрыв и последующее воссоединение молекул ДНК. Это положило начало поискам фермента, участвующего в сшивании фрагментов ДНК. В 1967 году такой фермент был найден и получил название ДНК-лигаза. Он катализирует синтез фосфодиэфирной связи в 2-х цепочечной молекуле нуклеиновой кислоты.

Иными словами, ДНК-лигазы сшивают рядом расположенные нуклеотиды, образуя связь между остатками сахаров. ДНК-лигазы абсолютно необходимы в процессах репарации ДНК, в процессах репликации - при удвоении цепи ДНК.

Существует 2 типа ДНК-лигаз, отличающихся по потребностям в кофакторах и способу действия. ДНК-лигаза *E. coli* в качестве кофактора использует дифосфопиридиннуклеотид, а лигаза фага T4 - АТФ в присутствии  $Mg^{2+}$ . Лигаза фага T4 более универсальна, так как помимо лигирования липких концов способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами. Она используется чаще.

### Контрольные вопросы

- 6.1. Какие ферменты используются при конструировании рекомбинантных ДНК?
- 6.2. Что такое рестриктазы и для чего они используются в генной инженерии?
- 6.3. Что такое лигазы и для чего они используются в генной инженерии?
- 6.4. Что такое полимеразы и для чего они используются в генной инженерии?
- 6.5. Что такое ревертаза и для чего она используется в генной инженерии?
- 6.6. Получение биологически активных соединений.
- 6.7. Гибридизация нуклеиновых кислот.
- 6.8. Для чего используется обратная транскриптаза?
- 6.9. Перечислите ферменты, применяемые в генной инженерии.
- 6.10. Для чего в генной инженерии используется реакция гибридизации нуклеиновых кислот?

### *Тема 7. Методы генной инженерии.*

Технология переноса в геном растений, животных, микроорганизмов чужеродных генов (трансгенов = целевых генов) и их передача в ряду поколений называется трансгенезом или трансгенозом (от англ. transgenesis). Организмы, полученные в результате переноса в их геном (с помощью генно-инженерных методов) чужеродных генов, называются трансгенными (их еще называют генетически модифицированными - ГМ). Процесс, в результате которого чужеродная ДНК проникает в реципиентную клетку и вызывает у нее наследуемые изменения, называют трансформацией. Трансформацию клеток могут осуществлять как молекулы ДНК, реплицирующиеся в клетках внехромосомно (плазмиды), так и молекулы ДНК, интегрирующиеся в геном клетки (хромосомы).

Основными этапами создания трансгенных организмов являются следующие: Получение нужного гена (трансгена), намеченного для переноса. Ген может быть выделен из естественных источников (из подходящего генома) или геномной библиотеки. Он может быть синтезирован искусственно: химическим путем (по имеющейся последовательности нуклеотидов) или ферментативным путем с использованием механизма обратной транскрипции (синтез кДНК на матрице мРНК с помощью обратной транскриптазы), получен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Создание специальных генетических конструкций - векторов (переносчиков), в составе которых гены (трансгены) будут внедряться в геном другого вида или

клонированы в клетках про- или эукариот. Клонирование предполагает получением большого числа копий фрагментов ДНК, идентичных исходному.

Генетическая трансформация, т.е. перенос и включение генетических векторов (рекДНК) в клетки-мишени хозяина (реципиента).

Молекулярная селекция - отбор клонов, несущих рекДНК, что осуществляется с использованием различных маркерных генов, которые находятся в векторной молекуле наряду с трансгеном.

Обязательной генетической конструкцией, используемой в экспериментах по генной инженерии, является вектор. Векторы - это молекулы ДНК, способные переносить включенные в них чужеродные гены в клетку, где эти молекулы реплицируются автономно или после интеграции с геномом (хромосомой). Т.е. векторы используются в генной инженерии для переноса трансгена от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования генов. Почему нельзя ввести чужеродный фрагмент ДНК сразу в клетку эукариот или некоторых бактерий (без вектора)? Это связано с тем, что при обычном введении ДНК в клетку она, как правило, подвергается атаке ферментов, которые разрезают ее на отдельные фрагменты. Для того чтобы рекДНК стала составной частью генетического аппарата клетки, она должна либо встроиться в ее геном (интегрировать в хромосому) и реплицироваться за его счет, либо быть способной к автономной репликации.

Вектор должен обладать следующими свойствами.

Способность к автономной (т.е. независимо от хромосомы реципиента) репликации в клетке реципиента.

Наличие сайта, в котором возможно встраивание желаемого фрагмента ДНК. Для этого вектор должен содержать один, или самое большое два участка (сайта рестрикции), чувствительных к определенной рестриктазе, которая расщепляет вектор и позволяет встроить желаемый трансген.

Наличие одного или нескольких маркерных генов, благодаря которым клетка-реципиент будет обладать новыми признаками, позволяющими отличить трансформированные клетки (т.е. содержащие рекДНК) от исходных. Это могут быть селективные гены, которые придают клеткам селективное преимущество (устойчивость к антибиотикам, гербицидам). Такие гены кодируют ферменты, разрушающие или модифицирующие антибиотики, гербициды. В этом случае трансформанты отбирают на питательных средах с высоким содержанием этих веществ. В качестве маркерных используют и так называемые репортерные гены, экспрессия которых не дает селективных преимуществ, но продукты генов удобны для тестирования, например, по изменению окраски.

Кроме того, для того чтобы чужеродный ген экспрессировался, необходимо его поместить под соответствующий промотор. У эукариотических организмов механизм регуляции транскрипции более сложный, чем у эукариот. Регуляторные последовательности эукариотических генов отличаются от прокариотических, и бактериальная РНК-полимераза не узнает их. Поэтому для экспрессии эукариотических генов в клетках прокариот нужно, чтобы гены находились под контролем бактериального промотора (т.е. промотора клетки-хозяина). В качестве промотора широко используется промотор гена (3-лактомазы (ген устойчивости к ампициллину), локализованного в векторе pBR322, lac-промотор *E. coli* и др.

В качестве векторных молекул могут быть использованы плазмиды бактерий или дрожжей (простых эукариотических организмов), ДНК бактериофагов или вирусов, искусственные хромосомы дрожжей (YAC) и бактерий (BAC). Созданы также гибридные (искусственные) векторы-космиды, объединяющие преимущества плазмид и фагов.

Для растений используются векторы, сконструированные на основе Ti- и Ri-плазмид почвенных агробактерий. Эти бактерии поражают до 60% двудольных растений и некоторые однодольные растения, вызывая формирование опухолей - корончатых галлов

(*Agrobacterium tumefaciens*) или образование "косматых" корней (*A. rhizogenes*). В плаزمидах можно клонировать фрагменты ДНК размером не более 10 тпн.

Фаговые векторы, чаще всего, создают на базе умеренного бактериофага X, содержащего двухцепочечную линейную молекул ДНК.

Линейная двухцепочечная ДНК бактериофага X состоит примерно из 50 тпн. На концах ДНК имеются cos-участки, отвечающую за упаковку фаговой ДНК в ее протеиновую капсулу.

Зачастую полноразмерные гены и мультигенные комплексы (>100тпн) эукариот слишком велики для встраивания в обычные векторы. Для переноса крупных трансгенов и их клонирования используют искусственные хромосомы дрожжей (YAC- яки от англ. yeast artificial chromosomes), вмещающие фрагменты геномной ДНК длиной от 100 тпн до 1 млн пн. Для их создания к плазмиде дрожжей "пришивают" центромерные (CEN) последовательности, теломеры (концевые последовательности), последовательности для автономной репликации (ARS) в дрожжевой клетке, сайты рестрикции и селективные маркеры (TRP1 и URA3 - независимость от наличия триптофана и урацила соответственно).

Челночные векторы. Это векторы (сконструированные на основе плазмидной ДНК), способные реплицироваться в клетках двух и более организмов.

Рестриктазно-лигазный метод, по сравнению с коннекторным методом, находит более широкое применение в генно-инженерных манипуляциях, поскольку он более прост биохимически и, кроме того, дает возможность легко выщепить встроенный фрагмент из гибридной молекулы ДНК, что часто бывает важно при переносе фрагмента в другое генетическое окружение.

Данный метод не ограничивается использованием в каждом конкретном эксперименте лишь одной рестриктазы. Комбинируемые молекулы ДНК могут иметь разные липкие концы, генерируемые двумя рестриктазами. В этом случае фрагменты объединяются в строго определенной ориентации относительно друг друга. При смешении же фрагментов, полученных после гидролиза одной рестриктазой, возможны различные их ориентации в формирующихся гибридных молекулах ДНК. Более того, в процессе лигазной реакции может происходить ковалентное объединение не только двух, но и трех, а также большего числа фрагментов

Процедуры клонирования целевых фрагментов ДНК значительно упростились с развитием метода амплификации сегментов ДНК в полимеразной цепной реакции.

Спектр продуктов лигазной реакции зависит от концентрации участвующих в ней фрагментов ДНК. При высокой концентрации преимущественно будут формироваться линейные длинные молекулы ДНК. По мере снижения концентрации фрагментов повышается вероятность образования кольцевых молекул ДНК. Гибридные молекулы с наибольшей частотой будут состоять из двух фрагментов, реже из трех и более. Если препарат развести до определенной концентрации (так, что вероятность встречи фрагментов друг с другом в растворе будет мала), то преимущественно будут образовываться гомокольца.

Секвенирование ДНК и экспрессия трансгенов.

Существует два подхода к клонированию ДНК. Первый подход предполагает использование бактериальных или дрожжевых клеток для размножения введенной в них чужеродной ДНК. Второй способ представляет собой амплификацию ДНК *in vitro*.

Клонирование ДНК *in vivo*. Используя микроорганизмы, можно создавать два типа библиотек ДНК: геномную и клоновую (кДНК).

Геномная библиотека. Если геном какого-либо организма разрезать, вставить в плазмидные или вирусные вектора и ввести в клетку, то в таком виде его можно сохранить. При разрезании плазмидной или фаговой ДНК вероятность выпадения целых и неизмененных кусков генома довольно высока.

Такой способ получения геномной библиотеки получил название «метод дробовика», так как геном в данном случае представлен отдельными фрагментами.

Принципы создания плазмидных и вирусных векторов общие, поэтому рассмотрим их на примере плазмидных. Следует отметить, что из вирусных ДНК лучше использовать ДНК фагов, так как они имеют большую емкость и позволяют вставлять более крупные куски генома.

Очищенные кольцевые молекулы ДНК обрабатывают рестриктазой, получая линейную ДНК. Клеточную ДНК обрабатывают той же рестриктазой, добавляют к плазмидной, добавляют лигазы. Таким образом получают рекомбинантную плазмидную ДНК, которую вводят в бактериальные или дрожжевые клетки. Плазмида реплицируется с образованием многих копий. Многие плазмиды несут ген устойчивости к антибиотикам, и если в рекомбинантной плазмиде есть такой ген, то клетки легко выявлять, выращивая на среде с антибиотиком.

Каждая такая колония представляет собой клон или потомство одной клетки. Плазмиды одной колонии содержат клон геномной ДНК, а совокупность плазмид можно назвать библиотекой геномной ДНК. Недосток такого метода в том, что фрагменты ДНК образуются в огромном количестве. Разрезание геномной ДНК определяется случаем, поэтому лишь часть фрагментов содержат полноценные гены. Некоторые фрагменты могут содержать только часть гена или же интронные последовательности.

Библиотека кДНК. Создание кДНК начинается с синтеза на матрице РНК с помощью обратной транскриптазы комплементарной нити ДНК. Затем создают щелочные условия, разрушают цепь РНК на нуклеотиды, после чего с помощью ДНК-полимеразы синтезируют комплементарную цепь ДНК. При этом образуется фрагмент ДНК с тупыми концами. Такую ДНК встраивают в плазмиды и вводят в клетки бактерий. При амплификации плазмиды образуется клон комплементарной копии ДНК (кДНК).

Преимущества клоновой ДНК перед клонами геномной ДНК в том, что кодирующая белок нуклеотидная последовательность гена ничем не прерывается.

Гены эукариот содержат интроны, которые должны удаляться из транскриптной РНК перед превращением ее в матричную, после чего следует сплайсинг (сращивание). Бактериальные клетки не могут осуществлять такую модификацию РНК, образовавшуюся путем транскрипции гена эукариотической клетки. Поэтому если преследуют получение белка путем экспрессии клонированного гена, то лучше использовать банк кДНК, полученной на основе матричной РНК.

Полимеразная цепная реакция. В 1985 году К. Мюллис с сотрудниками разработали метод клонирования последовательностей ДНК *in vitro*, который получил название полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Из всех последних технических достижений в молекулярной биологии полимеразная цепная реакция (ПЦР) была гораздо полезнее других. Принцип действия ПЦР заключается в амплификации последовательностей ДНК совершенно невероятным способом. Даже если у вас имеется очень малое количество исходной молекулы ДНК, так мало, что ее трудно обнаружить, вы можете создать бесчисленное множество копий с помощью ПЦР.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - искусственная амплификация последовательности ДНК путем повторных циклов репликации и разделения нитей. ПЦР используется в клинической диагностике, генетическом анализе, геномной инженерии и судебно-криминалистическом анализе, а также в целом ряде практических примеров.

Используя метод ПЦР, можно *in vitro* селективно обогащать препарат ДНК фрагментом с определенной последовательностью в миллион и более раз. Это позволяет надежно выявлять однокопийные гены и их варианты в таких больших и сложных геномах, каким является геном человека. Чувствительность метода такова, что амплифицировать в ПЦР и выявить целевую последовательность можно даже в том случае, если она встречается однажды в образце из 10<sup>5</sup> клеток. Получаемый сегмент ДНК

надежно выявляется в виде дискретной полосы после электрофоретического разделения молекул ДНК и окраски их этидиум бромидом. Если к праймеру пришить фермент, то ферментная метка будет накапливаться при амплифицировании. Продукт амплификации проверяется по принципу ИФА, то есть добавляется субстрат и отмечается изменение окраски. В качестве метки можно использовать стрептавидин. Его можно пришивать как к праймеру, так и к нуклеотидам. В последнем случае нуклеотиды, меченные стрептавидином, добавляются к обычным, идущим на синтез комплементарной цепи ДНК. Этим достигается еще большее усиление сигнала.

Размноженный *in vitro* фрагмент получают в количествах, достаточных для его прямого секвенирования. Поскольку при этом не требуется промежуточный этап клонирования фрагмента ДНК в молекулярных векторах, ПЦР иногда называют бесклеточным молекулярным клонированием (*cell-free molecular cloning*). Автоматизированная процедура Таq-полимеразной цепной реакции, состоящая из 30 и более циклов, занимает 3—4 часа, что существенно быстрее и проще процедуры клонирования определенного фрагмента ДНК в составе векторных молекул. Ввести рекомбинантный ген в клетку можно 2 способами: используя вектора или путем прямого введения.

Можно выделить 2 группы маркерных генов, позволяющие отличить трансформированные клетки:

1. Селективные гены, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.), гербицидам (у растений). Это могут быть гены ауксотрофности по какому-либо субстрату и т.д. Основной принцип работы такого маркера – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток.
2. Репортерные гены, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано.

Метод биологической баллистики (биолистики) является одним из самых эффективных на сегодняшний день методов трансформации растений, особенно однодольных.

Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, диаметром 0,6—1,2 мкм, напыляется ДНК вектора, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию. Вольфрамовые частички, несущие ДНК, наносятся на целлофановую подложку и помещаются внутрь биолиственной пушки. Каллус или суспензия клеток наносится в чашку Петри с агаризированной средой и помещается под биолиственную пушку на расстоянии 10—15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые частички с огромной скоростью выбрасываются из биолиственной пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток.

С помощью биолиственной пушки были протрансформированы однодольные растения, такие, как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. При этом были получены стабильные растения-трансформанты. Кроме успехов в получении трансгенных однодольных, биолиственная трансформация применяется для прямого переноса ДНК в эмбрионную пыльцу и дальнейшего быстрого получения трансгенных дигамноидных растений, которые являются важным этапом в селекционной работе. В настоящее время этим методом была проведена трансформация растений табака и после регенерации гамноидных растений получены стабильные трансформанты.

### **Контрольные вопросы**

- 7.1. Перечислите основные этапы создания трансгенных организмов.
- 7.2. Что такое векторы и для чего они используются?

- 7.3. Какими свойствами должен обладать вектор?
- 7.4. Способ получения геномной библиотеки?
- 7.5. Расскажите о методе биологической баллистики.
- 7.6. Расскажите о рестриктазно-лигазном методе.
- 7.7. В чем сущность секвенирования ДНК?
- 7.8. Перечислите методы генной инженерии.
- 7.9. В чем сущность полимеразной цепной реакции?
- 7.10. Расскажите о способе получения кДНК.

### Раздел III. Тесты для контроля знаний

1. В чем состоит главная функция молекулы ДНК?
  - А) хранение наследственной информации о развитии признаков;
  - Б) генный контроль синтеза белков, ферментов, гормонов;
  - В) репликация молекул ДНК.
2. Что такое мутация?
  - А) стойкие наследственные изменения признаков; Б) изменение признаков организма;
  - В) изменение морфологических признаков.
3. Что определяет экспрессивность гена?
  - А) Частоту фенотипического проявления гена в популяции особей, несущих данный ген;
  - Б) Множественное действие гена, когда один ген определяет развитие нескольких признаков;
  - В) Стойкость передачи признаков от поколения к поколению;
  - Г) Степень проявления эффекта гена, определяющая степень выраженности признака у организма.
4. Что такое промотор?
  - А) участок ДНК, регулирующий работу оперона; Б) участок ДНК, опознаваемый РНК-полимеразой; В) участок ДНК, преграждающий движение РНК-полимеразы;
  - Г) участок и-РНК.
5. Чем характеризуются полулетальные мутации?
  - А) повышают жизнеспособность; Б) вызывают гибель в эмбриональном состоянии;
  - В) понижают жизнеспособность; Г) повышают плодовитость.
6. Фермент, распознающий специфическую последовательность нуклеотидов в двойной спирали молекул ДНК, носит название:
  - А) ревертаза; Б) рестриктаза; В) РНК-полимераза; Г) гомогентиназа
7. Единица генетического кода:
  - А) динуклеотид; Б) триплет; В) пиримидиновое основание; Г) интрон.
8. При генной мутации:
  - А) меняется порядок нуклеотидов внутри гена; Б) меняется структура хромосом;
  - В) меняется число хромосом; Г) меняется порядок сочетания генов внутри хромосомы.
9. Результат сплайсинга:
  - А) построение комплементарной нити ДНК; Б) построение зрелой М-РНК;
  - В) построение полипептидной цепочки; Г) построение Т-РНК.
10. Что такое ген?
  - А) единица наследственности, контролирующая развитие отдельного признака организма;
  - Б) единица рекомбинации; В) единица мутации.
11. Какое свойство генетического кода говорит о том, что аминокислота кодируется более чем одним кодоном?
  - А) универсальность; Б) вырожденность; В) триплетность; Г) неперекрываемость.
12. Не передаются последующим поколениям
  - А) точковые мутации; Б) спонтанные мутации; В) соматические мутации;
  - Г) генеративные мутации.

13. Главный фермент, участвующий в репликации:  
А) РНК-полимераза; Б) ревертаза; В) рестриктаза; Г) ДНК-полимераза.
14. Сплайсинг - это процесс:  
А) удаления экзонов; Б) построения пре-м-РНК; В) удаления интронов; Г) рекомбинации.
15. В каком химическом веществе хромосом заключен генетический код?  
А) в белке; Б) и-РНК; В) ДНК.
16. Каково общее название РНК и ДНК?  
А) центральные вакуоли; Б) нуклеиновые кислоты; В) наследственные вещества  
Г) делящиеся молекулы.
17. Построение аминокислотной последовательности в полипептидной последовательности называется:  
А) транскрипция; Б) процессинг; В) полиплоидия; Г) трансляция; Д) репликация
18. Избирательное увеличение числа копий отдельных генов носит название:  
А) полиплоидия; Б) амплификация; В) кроссинговер; Г) стигматизация.
19. Остовы двойной спирали ДНК сделаны из:  
А) сахаров и фосфатов; Б) белков и кальция; В) кислот и щелочей; Г) солей и металлов.
20. Точка, в которой молекула ДНК разделяется на две, называется:  
А) репродуктивным; Б) копирующим центром; В) репликационной вилкой;  
Г) фокусом деления.
21. Процесс передачи генетической информации от ДНК к РНК – это:  
А) трансформация; Б) Транспортиция; В) Транскрипция.
22. Процесс построения аминокислотных цепочек в соответствии с генетической информацией, скопированной в мРНК, - это:  
А) трансмиссия; Б) трансляция; В) трансмутация.
23. Как называется мутация, изменяющая одну пару оснований?  
А) точковая мутация; Б) парная мутация; В) делеция пары; Г) нуклеотидная нулификация.
24. Капсид – это:  
А) белковая оболочка вируса; Б) шапочка вирусологов; В) европейский цветок, поражаемый вирусом; Г) клетка, зараженная вирусом.
25. Жизненный цикл фага, который не убивает хозяйскую клетку, называется:  
А) щадящим циклом; Б) не литическим циклом; В) полуфаговым циклом; Г) лизогенным циклом.
26. ПЦР (полимеразная цепная реакция) используется для:  
А) выращивания E.coli в лаборатории; Б) снабжения клетки энергией; В) быстрой продукции многих копий последовательности ДНК; Г) очистки лабораторной посуды от ДНК.
27. Организм, сконструированный генетической инженерией, который может передавать новые гены потомству, называется:  
А) фотогеничным; Б) трансгенным; В) бионичным.
28. Клоном называется:  
А) генетически идентичная копия другого организма;  
Б) генетически модифицированная копия другого организма;  
В) генетический гибрид двух организмов;  
Г) бактерия, измененная для продукции человеческого гормона.

## *Краткий словарь*

**Аберрация хромосомная** (или **хромосомная аномалия**) — обобщенное название любого из типов хромосомных мутаций: делеций, транслокаций, инверсий, дупликаций. Иногда также обозначают и геномные мутации (анеуплодии, трисомии и т. д.).

**Аллель** — одна из двух или более альтернативных форм гена, каждая из которых характеризуется уникальной последовательностью нуклеотидов; аллели, как правило, отличаются последовательностями нуклеотидов.

**Ампликон** — внехромосомная единица амплификации.

**Амплификатор ДНК** (термоциклер) — прибор, необходимый для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР); позволяет задавать нужное количество циклов и выбирать оптимальные временные и температурные параметры для каждой процедуры цикла.

**Амплификация** — увеличение числа копий генов (количества ДНК)

**Амплификация ДНК** — выборочное копирование определенного участка ДНК.

**Анеуплодия** — измененный набор хромосом, в котором одна или несколько хромосом из обычного набора или отсутствуют, или представлены дополнительными копиями.

**Антикодон** — последовательность из трех нуклеотидов в молекуле транспортной РНК, комплементарная кодирующему триплету в молекуле мРНК.

**Антимутагенез** — процесс предотвращения закрепления (становления) мутации, т. е. возврат первично поврежденной хромосомы или гена в исходное состояние.

**Бактериофаг** — вирус бактерий: состоит из ДНК или РНК, упакованной в белковую оболочку.

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

**Белковая инженерия** — создание искусственных белков с заданными свойствами путем направленных изменений (мутаций) в генах или путем обмена локусами между гетерологичными генами.

**Вектор** — молекула ДНК, способная к включению чужеродной ДНК и к автономной репликации, служащая инструментом для введения генетической информации в клетку.

**Вектор для клонирования** — любая небольшая плазида, фаг или ДНК содержащий вирус животных, в которые может быть встроена чужеродная вирусной ДНК.

**Вирусы** — инфекционные агенты неклеточной природы, способные в процессе реализации генетической информации, закодированной в их геноме, перестроить метаболизм клетки, направив его в сторону синтеза вирусных частиц. Вирусы могут иметь белковую оболочку, а могут и состоять только из ДНК или РНК.

**Ген** — последовательность нуклеотидов в ДНК, которая обуславливает определенную функцию в организме или обеспечивает транскрипцию другого гена.

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

**Генетический код** — соответствие между триплетами в ДНК (или РНК) и аминокислотами белков.

**Генная инженерия** — совокупность приемов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы.

**Генная терапия** — введение генетического материала (ДНК или РНК) в клетку, функцию которой он изменяет (или функцию организма).

**Геном** — общая генетическая информация, содержащаяся в генах организма, или генетический состав клетки. Термин «геном» иногда употребляется для обозначения гаплоидного набора хромосом.

**Генотип** 1) вся генетическая информация организма; 2) генетическая характеристика организма по одному или нескольким изучаемым локусам.

**Ген-регулятор** — ген, кодирующий регуляторный белок, активирующий или подавляющий транскрипцию других генов.

**Ген-репортер** — ген, чей продукт определяется с помощью простых и чувствительных методов и чья активность в тестируемых клетках в норме отсутствует. Используется в генно-инженерных конструкциях для маркирования целевого продукта.

**Ген-усилитель** (энхансер) — короткий сегмент ДНК, который влияет на уровень экспрессии примыкающих к нему генов, увеличивая частоту инициации и транскрипции.

**Гибридизация in situ** — гибридизация между денатурированной ДНК клеток на предметном стекле и меченной радиоактивными изотопами или иммуофлюоресцентными соединениями одноцепочечной РНК или ДНК.

**Гибридизация ДНК** — образование в опыте двуцепочечной ДНК или дуплексов ДНК:РНК в результате взаимодействия комплементарных нуклеотидов.

**Гибридизация соматических клеток** — слияние неполовых клеток, способ получения соматических гибридов (см.).

**Гибридомы** — гибридные лимфоидные клетки, полученные путем слияния опухолевой миеломной клетки с нормальными лимфоидными клетками иммунизированного животного или человека.

**Делеция** — тип хромосомной мутации, при которой утрачивается участок хромосомы; тип генной мутации, при которой выпадает участок молекулы ДНК.

**Денатурация** — нарушение пространственной структуры молекулы в результате разрыва внутри- или межмолекулярных нековалентных связей.

**ДНК-полимераза** — фермент, ведущий матричный синтез ДНК.

**Дрейф генов** — изменение частот генов в ряду поколений, обусловленное случайными событиями митоза, оплодотворения и размножения.

**Дупликация** — тип хромосомной мутации, при которой удвоен какой-либо участок хромосомы; тип генной мутации, при которой удвоен какой-либо участок ДНК.

**Зонд генетический** — короткий отрезок ДНК или РНК известной структуры или функции, меченный каким-либо радиоактивным или флуоресцентным соединением.

**Интрон** — некодирующий участок гена, который транскрибируется, а затем удаляется из предшественника мРНК при сплайсинге (см. сплайсинг).

**Интронированный ген** — ген, содержащий интроны.

**Итероны** — повторяющиеся последовательности нуклеотидных остатков в ДНК.

**Каллус** — масса недифференцированных клеток, образующаяся при повреждении растения. Может образовываться из единичных клеток при их культивировании на искусственных средах.

**Капсида** — белковая оболочка вируса.

**κДНК** — однополовая ДНК, синтезируемая in vivo по РНКовой матрице с помощью обратной транскриптазы.

**Клон** — группа генетически идентичных клеток, возникших неполовым путем от общего предка.

**Клонирование ДНК** — разделение смеси рекомбинантных молекул ДНК путем их введения в клетки методом трансформации или инфекции. Одна бактериальная колония представляет собой клон, все клетки которого содержат одну и ту же молекулу рекомбинантной ДНК.

**Клонирование клеток** — их разделение путем посева на питательном агаре и получение колоний, содержащих потомство от изолированной клетки.

**Кодон** — тройка расположенных подряд нуклеотидных остатков в ДНК или РНК, кодирующая определенную аминокислоту или являющаяся сигналом окончания трансляции.

**Компетентность** — способность клеток к трансформации.

**Комплементарность** (в генетике) — свойство азотистых оснований образовывать с помощью водородных связей парные комплексы аденин—тимин (или урацил) и гуанин—цитозин при взаимодействии цепей нуклеиновых кислот.

**Конкатемерная ДНК** — линейная ДНК, в которой некоторый элемент (например, фаговый геном) повторен несколько раз.

**Контиг** — группа из нескольких последовательно соединенных секвенированных участков ДНК.

**Конъюгация** — способ обмена генетической информацией у бактерий, при котором вследствие физического контакта между клетками происходит перенос клеточной, плазмидной или транспозонной ДНК от донорной клетки в реципиентную.

**Лигаза** — фермент, образующий фосфодиэфирную связь между двумя полинуклеотидами.

**Лизис** — распад клетки, вызванный разрушением её оболочки.

**Лизогения** — явление носительства бактериальными клетками фага в виде профага (см. профаг).

**Линия клеток** — генетически однородные клетки животных или растений, которые можно выращивать *in vitro* в течение неограниченно долгого времени.

**Лocus** — участок ДНК (хромосомы), где расположена определенная генетическая детерминанта.

**Маркерный ген** — ген в рекомбинантной ДНК, кодирующий селективный признак.

**Метаболизм** — совокупность ферментативных процессов, обеспечивающих существование и воспроизведение клетки.

**Метилазы** — ферменты, присоединяющие метильную группу к определенным азотистым основаниям в ДНК.

**Миниклетки** — клетки, не содержащие хромосомной ДНК. Модификация биополимера — изменение его структуры.

**Морфогенез** — осуществление генетической программы развития организма.

**Мутагенез** — процесс индукции мутаций.

**Мутагены** — физические, химические или биологические агенты, увеличивающие частоту возникновения мутаций.

**Мутация** — изменение генетического материала, часто приводящее к изменению свойств организма.

**Нуклеазы** — общее название ферментов, расщепляющих молекулы нуклеиновых кислот.

**Обратная транскриптаза** — фермент, катализирующий реакцию синтеза ДНК по РНК-матрице.

**Олигонуклеотид** — цепь, состоящая из нескольких (от 2 до 20) нуклеотидных остатков.

**Онкорнавирус** — РНК-содержащий вирус, вызывающий перерождение нормальных клеток в раковые; содержит в своем составе обратную транскриптазу.

**Оператор** — регуляторный участок гена (оперона), с которым специфически связывается репрессор (см. репрессор), предотвращая тем самым начало транскрипции.

**Оперон** — совокупность совместно транскрибируемых генов, обычно контролирующая родственные биохимические функции.

**Плазида** — кольцевая или линейная молекула ДНК, реплицирующаяся автономно от клеточной хромосомы.

**Полимеразы** — ферменты, ведущие матричный синтез нуклеиновых кислот.

**Полипептид** — полимер, состоящий из аминокислотных остатков, связанных пептидными связями.

**Праймер** — короткая олиго- или полинуклеотидная последовательность со свободной 3'-ОН-группой, комплементарно связанная с однонитевой ДНК или РНК; с его 3'-конца ДНК-полимераза начинает наращивать полидезоксирибонуклеотидную цепь.

**Промотор** — регуляторный участок гена (оперона), к которому присоединяется РНК-полимераза с тем, чтобы начать транскрипцию.

**Протоонкогены** — нормальные хромосомные гены, от которых произошли онкогены, содержащиеся в некоторых ретровирусах.

**Профаг** — внутриклеточное состояние фага в условиях, когда его литические функции подавлены.

**Процессинг** — частный случай модификации (см. модификация), когда в биополимере уменьшается число звеньев.

**Рекомбинантная молекула ДНК** (в генетической инженерии) — получается в результате ковалентного объединения вектора и чужеродного фрагмента ДНК.

**Рекомбинантная плазида** — плазида, содержащая фрагмент(ы) чужеродной ДНК.

**Рекомбинантный белок** — белок, часть аминокислотной последовательности которого кодируется одним геном, а часть — другим.

**Рекомбинация in vitro** — операции in vitro, приводящие к созданию рекомбинантных молекул ДНК.

**Рекомбинация гомологическая** — обмен генетическим материалом между двумя гомологичными молекулами ДНК.

**Рекомбинация сайт-специфическая** — объединение путем разрыва и слияния двух молекул ДНК или участков одной молекулы, происходящее по определенным сайтам.

**Ренатурация** — восстановление исходной пространственной структуры молекул.

**Репарация ДНК** — исправление повреждений молекулы ДНК, восстанавливающее её первоначальную структуру.

**Репликатор** — участок ДНК, ответственный за инициацию репликации.

**Репликация** — процесс удвоения молекул ДНК или геномных вирусных РНК.

**Репликон** — молекула ДНК или её участок, находящиеся под контролем репликатора.

**Репрессия** — подавление активности генов, чаще всего путем блокирования их транскрипции.

**Репрессор** — белок или антисмысловая РНК, подавляющие активность генов.

**Рестриктазы** — сайт-специфические эндонуклеазы, составляющие часть системы рестрикции-модификации.

**Рестрикты** — фрагменты ДНК, образовавшиеся после её гидролиза рестриктазой.

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

**Рестрикционный анализ** — установление мест расщепления ДНК рестриктазами.

**Ретровирусы** — РНК-содержащие вирусы животных, кодирующие обратную транскриптазу и образующие провирус с хромосомной локализацией.

**Рибонуклеазы (РНКазы)** — ферменты расщепляющие РНК.

**Сайт** — участок молекулы ДНК, белка и т. п.

**Секвенирование** — установление последовательности звеньев в молекулах нуклеиновых кислот или белков (полипептидов).

**Селективные среды** — питательные среды, на которых могут расти лишь клетки с определенными свойствами.

**Скрининг** — поиск в рассевах клеток или фагов тех колоний, которые содержат рекомбинантные молекулы ДНК.

**Слитый белок (полипептид)** — белок, образованный слиянием двух различных полипептидов.

**Спейсер** — в ДНК или РНК — некодирующая последовательность нуклеотидов между генами; в белках — аминокислотная последовательность, связывающая соседние глобулярные домены.

**Сплайсинг** — процесс формирования зрелой мРНК или функционального белка путем удаления внутренних частей молекул — интронов РНК или интеинов у белков.

**Трансдукция** — перенос фрагментов ДНК с помощью бактериофага.

**Транскрипция** — синтез РНК на ДНК-матрице; осуществляется РНК-полимеразой.

**Транскрипт** — продукт транскрипции, т. е. РНК, синтезированная на данном участке ДНК как на матрице и комплементарная одной из его нитей.

**Трансляция** — процесс синтеза полипептида, определяемый матричной РНК.

**Транспозон** — генетический элемент, реплицируемый в составе репликона и способный к самостоятельным перемещениям (транспозиции) и интеграции в разные участки хромосомной или внехромосомной ДНК.

**Трансфекция** — трансформация клеток с помощью изолированной ДНК.

**Трансформация** — изменение наследственных свойств клетки, вызванное поглощенной ДНК.

**Трансформация** (в молекулярной генетике) — перенос генетической информации посредством изолированной ДНК.

**Трансформация** (онкотрансформация) — частичная или полная дедифференцировка клеток, вызванная нарушением регуляции роста клеток.

**Умеренный фаг** — бактериофаг, способный лизогенизовать клетку и в виде профага находиться внутри бактериальной хромосомы или в плазмидном состоянии.

**Химеры** — лабораторные гибриды (рекомбинанты).