

Министерство образования Республики Беларусь

**Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»**

Г.Г. ГОНЧАРЕНКО, А.А. СУРКОВ, А.Н. ЛЫСЕНКО

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

**ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО
к выполнению лабораторных работ**

**Гомель
УО «ГГУ им. Ф. Скорины»
2012**

УДК 577.21:575.113.1(075.8)

ББК 28.04я73

Г 657

Рецензенты:

В.Б. Гедых, ведущий научный сотрудник ГНУ «Институт Леса НАН Беларуси», доктор биологических наук;

А.В. Крук, начальник учебно-методического управления УО «ГГУ им. Ф. Скорины», доцент, кандидат биологических наук

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

Гончаренко, Г.Г.

Г 657 Генная инженерия: практическое руководство к выполнению лабораторных работ / Г.Г. Гончаренко, А.А. Сурков, А.Н. Лысенко; М-во образования Республики Беларусь, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Гомель: ГГУ им. Ф.Скорины, 2012. – 48 с.
ISBN

В практическое пособие включены требования по выполнению лабораторных работ дисциплины «Генная инженерия». Руководство также включает темы четырех занятий по данному курсу.

Адресовано студентам специализации “Зоология” специальности 1 – 31 01 01 – 02 “Биология (научно-педагогическая деятельность)”.

УДК 577.21:575.113.1(075.8)

ББК 28.04я73

© Гончаренко Г.Г.2012

© УО «ГГУ им. Ф. Скорины», 2012

ВВЕДЕНИЕ

Генная инженерия - технология получения новых комбинаций генетического материала с помощью проводимых *in vitro* манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот и переноса созданных конструкций генов в реципиентный организм.

Методы генной инженерии успешно применяются для решения фундаментальных проблем биологии. С возникновением данной области биологической науки у исследователей появилась возможность изучать структуру, функционирование и регуляцию индивидуальных генов прокариотических и эукариотических организмов, а также целенаправленно проводить изменение их геномов.

Генная инженерия дала толчок зарождению нового направления биотехнологии - молекулярной биотехнологии. Технологии рекомбинантных ДНК позволили осуществлять конструирование штаммов-суперпродуцентов ферментов, антибиотиков, витаминов и других биомолекул, используемых в пищевой и фармацевтической промышленности, для нужд сельского хозяйства, при проведении мероприятий по охране окружающей среды. В медицине методы генной инженерии получили применение для создания новых способов диагностики и лечения различных заболеваний, в том числе наследственных. Таким образом, генная инженерия является важным звеном в подготовке современных специалистов-биотехнологов.

Цель курса - сформировать у студентов теоретическое представление об основных методах генной инженерии и дать элементарные навыки постановки генно-инженерного эксперимента в ходе лабораторных занятий.

Задачи курса:

- 1) познакомить студентов с основными ферментами, векторами, используемыми в качестве инструментов генной инженерии;
- 2) дать представление об основных методах и аппаратуре, применяемых для постановки генно-инженерных экспериментов;
- 3) научить студентов анализировать современные данные об использовании методов генной инженерии для создания трансгенных растений и животных с полезными свойствами.

Эффективность самостоятельной работы студентов целесообразно проверять в ходе текущего и итогового контроля знаний в форме устного опроса, коллоквиумов, тестового компьютерного контроля по темам и разделам курса. Для общей оценки качества усвоения студентами учебного материала рекомендуется использование рейтинговой системы.

ЗАНЯТИЕ 1

ТЕМА: Молекулярные основы наследственности

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться с молекулярными основами наследственности

1. Теоретическая часть

Всю первую половину XX века ученые считали, что наследственная информация о развитии всех признаков и свойств организма заключена в белках. Однако эксперименты, проведенные на микроорганизмах позволили установить, что генетическая информация сосредоточена в нуклеиновых кислотах.

1.1 Доказательства роли ДНК в наследственности

Большую роль в выяснении молекулярных основ наследственности сыграли эксперименты Ф. Гриффитса, который в 1928 г. обнаружил явление **трансформации**. Ученый вводил мышам **вирулентный** капсульный (S) и **невирулентный** бескапсульный (R) штаммы пневмококков, *Streptococcus pneumoniae*. При введении мышам вирулентного штамма S они заболевали пневмонией и погибали, а при введении невирулентного R – оставались живыми (рис. 1а,б). Мыши также не погибали, если им вводили вирулентный штамм S, но убитый нагреванием (рис. 1в). В решающем эксперименте Гриффитс ввел смесь

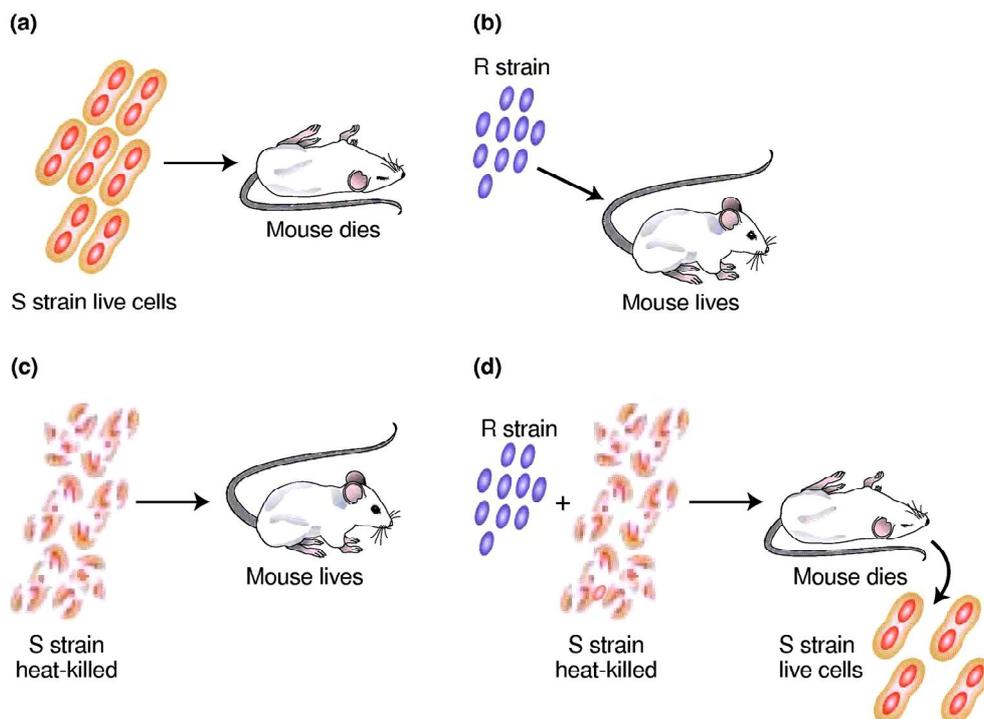


Рис. 1. Схема экспериментов Ф. Гриффитса на мышах по трансформации у пневмококков, *Streptococcus pneumoniae*.

невирулентного штамма R со штаммом убитого нагреванием вирулентного S и получил неожиданный результат – мыши заболели пневмонией и погибли. Из погибших животных были выделены бактерии, которые обладали вирулентностью и были способны образовывать капсулу (рис. 1г). Следовательно, живые бактерии невирулентного бескапсульного штамма R **трансформировались** – приобрели свойства убитых болезнетворных капсульных бактерий S. Однако химическая природа «**трансформирующего фактора**», обеспечивающего наследуемое превращение бактерии одного типа в другой в результате экспериментов Гриффитса, осталась неустановленной.

В 1944 г. О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Карти получили убедительные доказательства того, что **трансформирующим фактором** является дезоксирибонуклеиновая кислота (**ДНК**). Препараты ДНК, взятые из болезнетворного штамма S, ученые разделили на порции, каждую из которых обрабатывали ферментами **дезоксирибонуклеазой, рибонуклеазой** или **протеазой**, которые разрушают соответственно ДНК, РНК и белки. После обработки каждая порция использовалась для трансформации штаммов R в штаммы S. Оказалось, что только обработка дезоксирибонуклеазой (ДНК-азой) полностью прекращала трансформирующую активность ДНК.

Еще одним серьезным доказательством генетической роли ДНК были эксперименты А. Херши и М. Чейз, проведенные в 1952 г. с бактериофагом T2 – вирусом бактерий, состоящим лишь из белкового чехла и упакованной в него молекулы ДНК. Белок фага T2 поместили радиоактивной серой (^{35}S), которая включается только в белок, а ДНК фага радиоактивным фосфором (^{32}P), который включается только в ДНК. После заражения бактерий мечеными фагами было установлено, что в клетку бактерии проникает только молекула ДНК, а белковая оболочка фага остается снаружи (рис. 2). Тем не менее в клетках зараженных бактерий образовалось множество зрелых частиц бактериофага T2. Это однозначно говорило о том, что **наследственная информация** о всех признаках и свойствах фага заключена в **ДНК**.

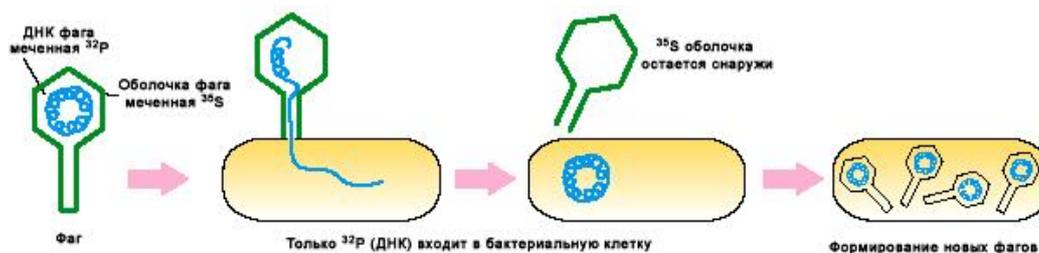


Рис. 2. Схема эксперимента Херши и Чейз, демонстрирующего, что генетическим материалом фага является ДНК.

Эксперименты Эвери с соавторами, а также Херши и Чейз позволили сделать заключение, что именно **молекула ДНК**, по крайней мере у бактерий и фагов является носителем наследственной информации. В последующем было установлено, что у некоторых прокариот наследственная информация зашифрована в молекулах РНК.

1.2 Состав и строение нуклеиновых кислот

В 1869 г. – Ф. Мишер из ядер лейкоцитов человека, а затем из спермы лосося выделил вещество, которое он назвал «**нуклеином**». В конце XIX века было установлено, что кислый компонент «нуклеина» является **нуклеиновой кислотой**, которая содержит **азотистые основания** (пурины и пиримидины), **углевод** и **фосфорную кислоту**.

К 30-м годам XX века П. Левен с сотрудниками установил, что азотистое основание, углевод и фосфорная кислота соединены в блоки – **нуклеотиды** (рис. 3), расположенные вдоль линейной молекулы нуклеиновой кислоты. Нуклеотидов оказалось четыре: **аденин, гуанин, цитозин и тимин**.

Поскольку углеводный компонент оказался **дезоксирибозой**, кислота получила название **дезоксирибонуклеиновой – ДНК**. Вместе с ядерной была выделена цитоплазматическая нуклеиновая кислота, которая в качестве углевода содержала **рибозу** и поэтому получила название **рибонуклеиновой – РНК**.

В 40-50 гг. XX века Э. Чаргафф разработал точные методы определения количества азотистых оснований и установил, что в ДНК сумма **пуринов** равна сумме **пиримидинов** ($A+G=T+C$), и количество аденина равно количеству тимина ($A=T$), а гуанина – цитозину ($G=C$).

На основе рентгеноструктурного анализа М. Уилкинс и Р. Франклин в 1953 г. получили данные, указывающие на то, что ДНК имеет двухцепочечную структуру в форме спирали (рис. 4).

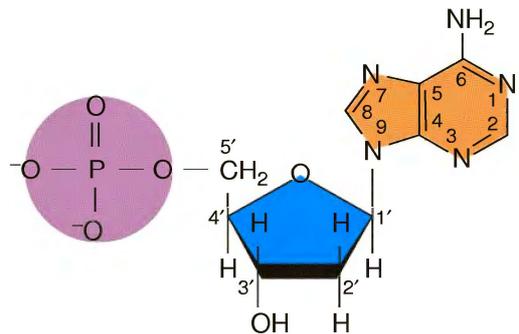


Рис. 3. Нуклеотид аденин состоящий из дезоксирибозы, остатка фосфорной кислоты и азотистого основания аденина

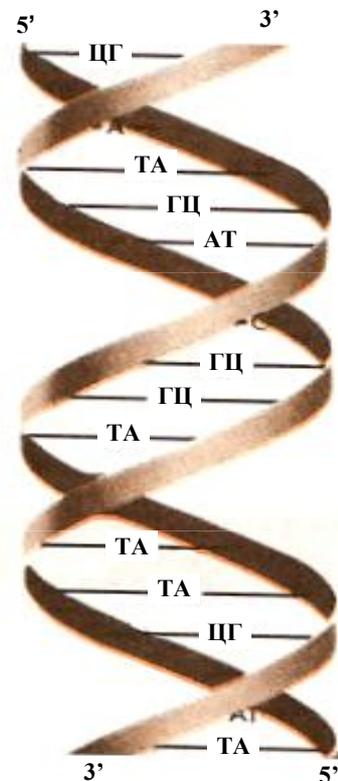


Рис. 4. Модель двухцепочечной структуры ДНК по Уотсону и Крику

В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик основываясь на данных Чаргаффа и Франклин построили пространственную модель молекулы ДНК и истолковали ее роль как носителя генетической информации. Согласно их модели **молекула ДНК** состоит из **двух полинуклеотидных комплементарных цепочек** закрученных в **двойную спираль** (рис. 4).

Азотистые основания нуклеотидов обеих цепей ДНК заключены внутри между витками спирали и соединены водородными связями. В соответствии с правилами Чаргаффа аденин одной цепи связан только с тимином другой цепи, а гуанин – только с цитозином. Пара **аденин-тимин** соединена двумя водородными связями, а пара **гуанин-цитозин** – тремя (рис. 5). Такой порядок соответствия азотистых оснований (А=Т и Г=Ц) называется **комплементарностью**, и, следовательно, цепи в ДНК комплементарны друг другу.

В каждой из цепей ДНК нуклеотиды последовательно соединены друг с другом с помощью остатка фосфорной кислоты и молекулы дезоксирибозы. Дезоксирибоза связывается с одной молекулой фосфорной кислоты через углерод в положении 3', а с другой – через углерод 5', образуя сахаро-фосфатный остов.

Следует отметить, что обе цепи в молекуле ДНК имеют противоположную направленность. Межнуклеотидная связь в одной цепи имеет направление 5'-3', а в другой 3'-5' (рис. 5).

С развитием физико-химических методов выделения ДНК из различных организмов модель, разработанная Уотсоном и Криком была подтверждена экспериментально. Однако предстояло установить, как ДНК копируется (реплицируется) и кодирует синтез белка.

1.3 Репликация ДНК

Согласно предложенной в 1953 г Уотсоном и Криком схеме **репликации** спиралевидная двухцепочная ДНК сначала расплетается, и цепи расходятся (рис. 6). При этом к нуклеотидам каждой цепи присоединяются **комплементарные** нуклеотиды, которые с помощью ферментов **ДНК-полимераз** связываются в новые полинуклеотидные

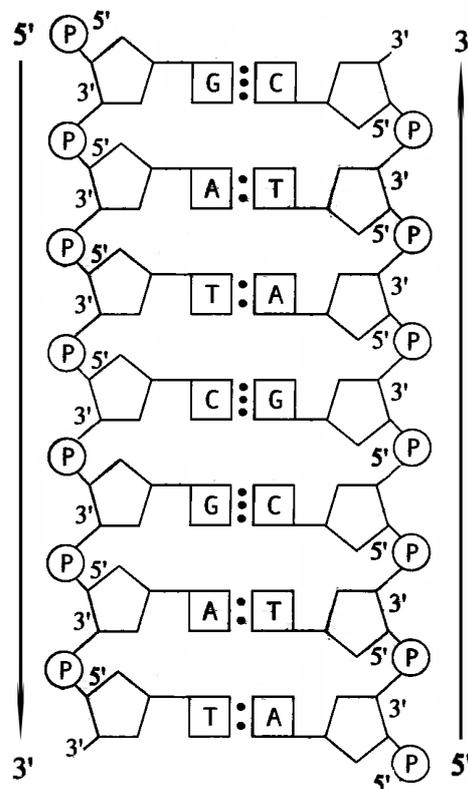


Рис. 5 Схема отрезка молекулы ДНК

цепи. В результате из одной образуются две дочерние двухцепочечные молекулы ДНК (рис. 6). Таким образом, каждая реплицированная дочерняя молекула ДНК состоит из одной «старой» и одной «новой» цепей, вот почему такой способ репликации получил название - **полуконсервативный**. Два других теоретически возможных способа репликации – *консервативный* и *дисперсный* в отличие от полуконсервативного не получили экспериментального подтверждения.

В 1958 г М. Мезелсон и Ф. Сталь в блестящем эксперименте убедительно доказали именно полуконсервативный характер репликации ДНК предсказанный Уотсоном и Криком.

На первом этапе они выращивали клетки *E. coli* на питательной среде содержащей азот ^{15}N – «тяжелый» изотоп, который имеет на один нейтрон больше чем ^{14}N . После культивирования на такой среде во все азотосодержащие молекулы *E. coli*, в том числе и ДНК включается тяжелый ^{15}N . С помощью ультрацентрифугирования в пробирках можно разделить ДНК содержащую ^{15}N и ^{14}N . Тяжелые молекулы ^{15}N оседают ближе ко дну пробирки (рис. 7).

На втором этапе меченные тяжелым изотопом бактерии переносили на новую среду, содержащую обычный ^{14}N . Следовательно вся вновь синтези-

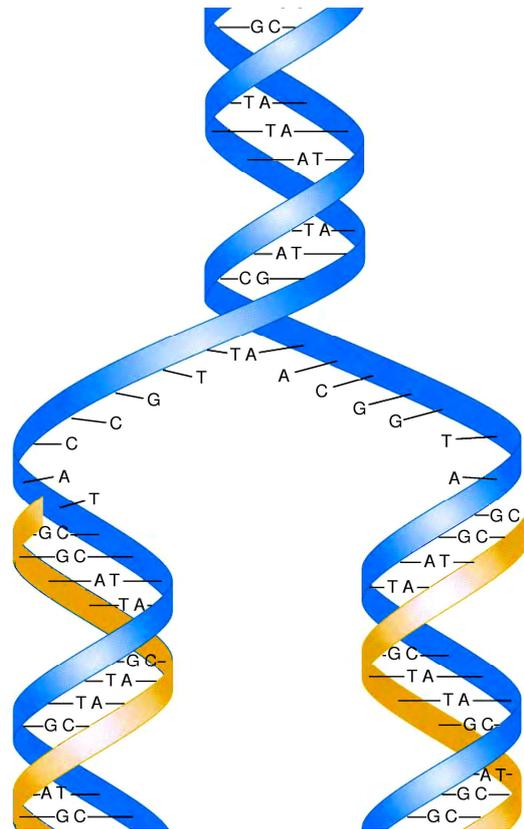
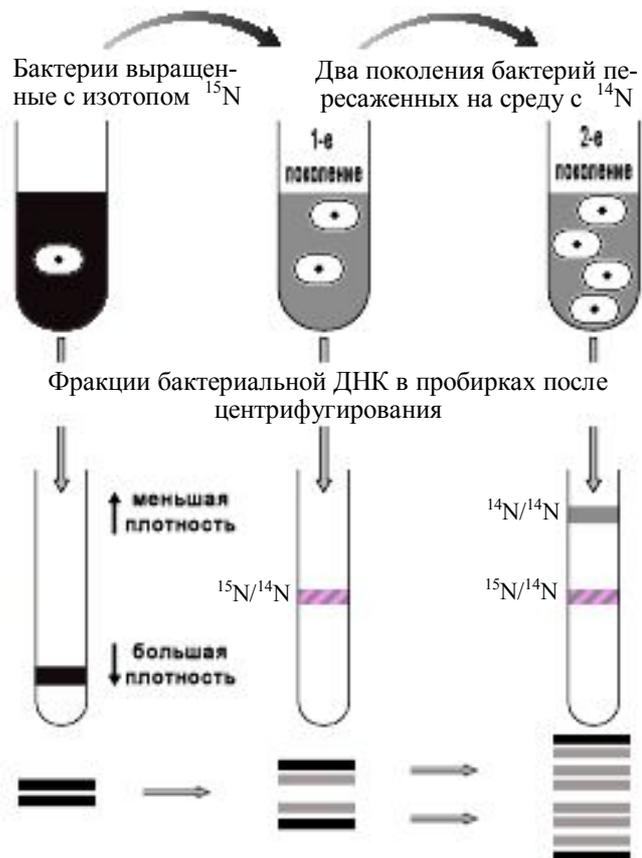


Рис. 6 Полуконсервативная модель репликации ДНК, предложенная Уотсоном и Криком



рованная ДНК *E. coli* содержала легкий изотоп ^{14}N . Как видно из рис. 7 выделенная из *E. coli* после одного поколения культивирования ДНК в результате центрифугирования осаждалась в пробирке одной фракцией промежуточной плотности, так как одна цепь содержала «легкий» изотоп, а вторая – «тяжелый».

После второго поколения культивирования плотность образца ДНК, взятой из *E. coli* разделилась на две фракции, с промежуточной ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) и легкой ($^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$) плотностями (рис. 7). Эти результаты в точности соответствуют полуконсервативному механизму репликации ДНК.

Дальнейшие исследования показали, что процесс **полуконсервативной репликации** молекул ДНК начинается в определенной **точке инициации (ori)**. В хромосомах эукариот имеется по несколько таких точек. Цепи ДНК в точке инициации репликации разъединяются (раскручиваются) под влиянием фермента **геликазы** (рис. 8). Возникает **репликационная вилка** с одноцепочечными участками ДНК, которые становятся матрицами для репликации (рис. 8). Эти участки связываются с **белками SSBP** (single-stranded binding proteins), которые не позволяют им вновь соединиться в двойную спираль. Возникающая суперскрученность и напряжение в нераскрученной части ДНК репликационной вилки (рис. 8) снимает ферментный комплекс **топоизомераза** (ДНК-гираза у прокариот).

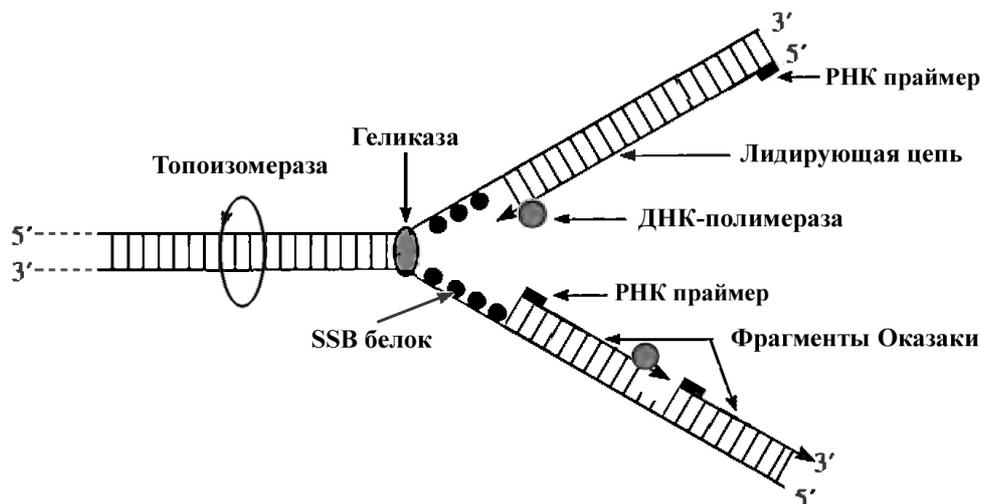


Рис. 8. Репликационная вилка с указанием лидирующей и запаздывающей цепей вновь синтезированной ДНК.

ДНК-полимераза, осуществляет процесс репликации в направлении 5'-3', она способна присоединять нуклеотиды только к 3'-ОН группе предыдущего нуклеотида и для синтеза новой цепи ей требуется затравка (праймер) со свободным 3'-концом. Поэтому сначала на ДНК-матрице с помощью **праймазы** (РНК-полимераза) синтезируется короткий (~10

нуклеотидов) фрагмент РНК. Именно к такому **РНК-праймеру** ДНК-полимераза присоединяет дезоксирибонуклеотиды, синтезируя новую цепь (рис. 8). Затем РНК-праймер вырезается, замещаясь фрагментом ДНК.

Репликация начинается на материнской цепи, идущей от точки инициации в направлении 3'-5' и идет непрерывно в виде сплошной линии. Эта цепь называется **лидирующей** (рис. 8). Синтез на второй цепи идет в обратном направлении в виде отдельных коротких (200-2000 нуклеотидов) **фрагментов Оказаки**, названных так по имени открывшего их ученого. Эта цепь получила название **запаздывающей**. После завершения синтеза РНК праймеры в составе фрагментов Оказаки заменяются на ДНК и все фрагменты соединяются при помощи фермента **лигазы** в общую полинуклеотидную цепочку. В результате репликации образуются две идентичные молекулы ДНК, которые в хромосомах эукариот становятся двумя хроматидами.

1.4 Транскрипция ДНК

При рассмотрении вопроса о том как генетическая информация заложенная в ДНК реализуется в процессе синтеза белка Уотсон и Крик теоретически предсказали существование **и-РНК** (посредника).

РНК отличается от ДНК тем, что у нее углеводом является **рибоза** вместо дезоксирибозы. Кроме того, вместо нуклеотида тимина у нее **урацил** (рис. 9). И наконец, в отличие от ДНК она имеет в основном **одноцепочечное строение**.

В 1962 г. Э. Волкин и Л. Астрохан обнаружили, что при синтезе белка в клетках *E. coli*, зараженных фагом Т2 резко усиливается синтез **короткоживущих молекул РНК**, которые были комплементарны одной из цепей фага Т2, но не ДНК *E. coli*. Позднее в многочисленных экспериментах было показано, что наследственная информация, записанная в ДНК (гене), точно **транскрибируется (переписывается)** в нуклеотидную последовательность короткоживущих **и-РНК**, которые определяют синтез конкретных белков у всех организмов.

Транскрипция осуществляется с помощью фермента ДНК-зависимой **РНК-полимеразы** и всегда идет в направлении 5'-3'. **Матрицей** для синтеза и-РНК служит только одна цепь ДНК - **3'-5'**, которая

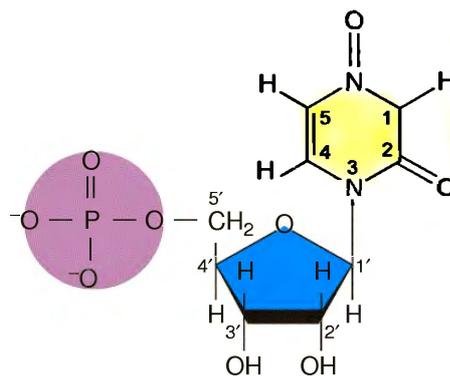


Рис. 9. Нуклеотид урацил состоящий из рибозы, остатка фосфорной кислоты и азотистого основания урацил

(как ни странно) называется *некодирующей*. Комплементарная ей цепь 5'-3', последовательность нуклеотидов в которой совпадает с последовательностью и-РНК называется *кодирующей*. Синтез и-РНК начинается с участка *инициации* транскрипции, называемого **промотором**. Промотор расположен перед геном и включает 40-80 нуклеотидов. В нем имеются важный участок «ТАТА-бокс» (рис. 10,а). При помощи белковой σ -субъединицы РНК-полимераза соединяется с промотором и разъединяет комплементарные цепи ДНК в области ТАТА последовательности (рис. 10,б). Затем этот фермент движется вдоль гена и по

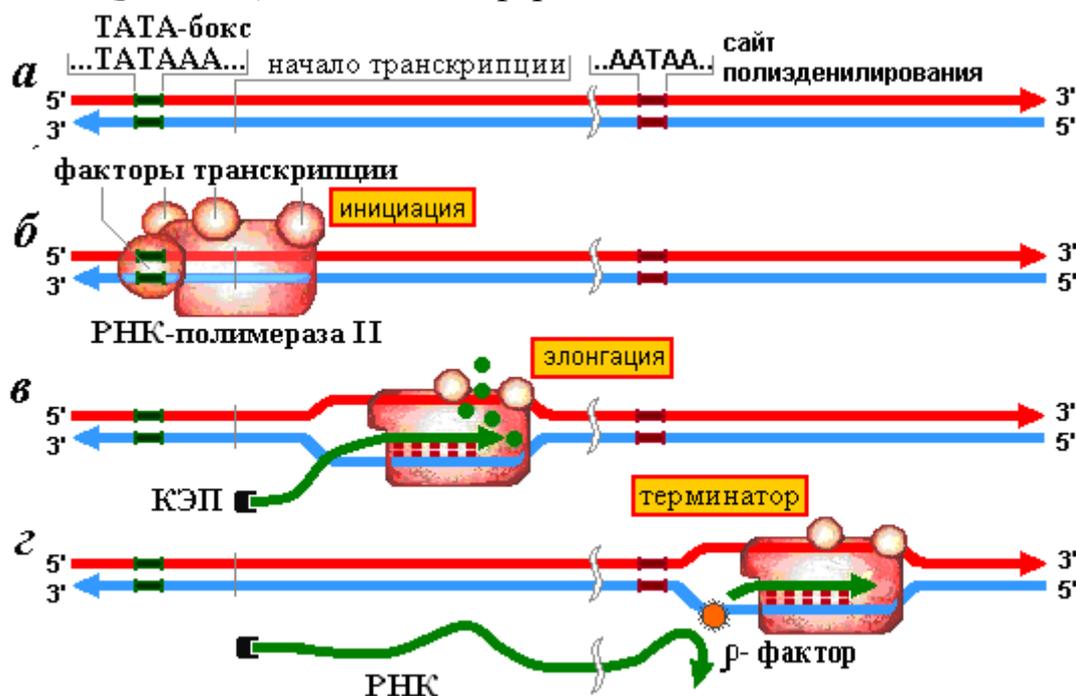


Рис. 10. Схематическое изображение этапов транскрипции

мере разъединения цепей ДНК на одной (3'-5'), ведет синтез и-РНК, согласно принципу комплементарности присоединяя аденин к тимину, урацил к аденину, цитозин к гуанину и гуанин к цитозину (рис. 10,в). Те участки гена, на которых полимеразы образовала и-РНК, вновь соединяются, а синтезируемая молекула и-РНК постепенно отделяется от ДНК. Конец синтеза и-РНК определяется участком остановки транскрипции – *терминатором* (рис. 10,г). Нуклеотидные последовательности промотора и терминатора узнаются специальными белками, регулирующими активность РНК-полимеразы.

У эукариот в структурной части гена имеются отрезки ДНК, не содержащие информации, которые были названы **интронами**. Участки ДНК, несущие информацию, называются **экзонами** (рис. 11).

В ходе считывания информации с определенного участка ДНК (гена) сначала образуется **первичный транскрипт** всей последова-

тельности (**про-мРНК**), а затем происходит процесс **сплайсинга** (сшивания), который заключается в том, что интроны из РНК как бы «выпетливаются» и удаляются, а информативные участки – экзоны соединяются при помощи фермента **сплайсазы** в одну непрерывную последовательность и-РНК. Перед выходом из ядра к начальной (5') части и-РНК присоединяется **метилованный гуанин**, называемый «КЭП» (колпачек), а к 3'-концу и-РНК присоединяется примерно 200 остатков аденина, образуя **поли-А хвост** (рис. 11). В таком виде **зрелая и-РНК** (матричная РНК) проходит через ядерную мембрану в ци-

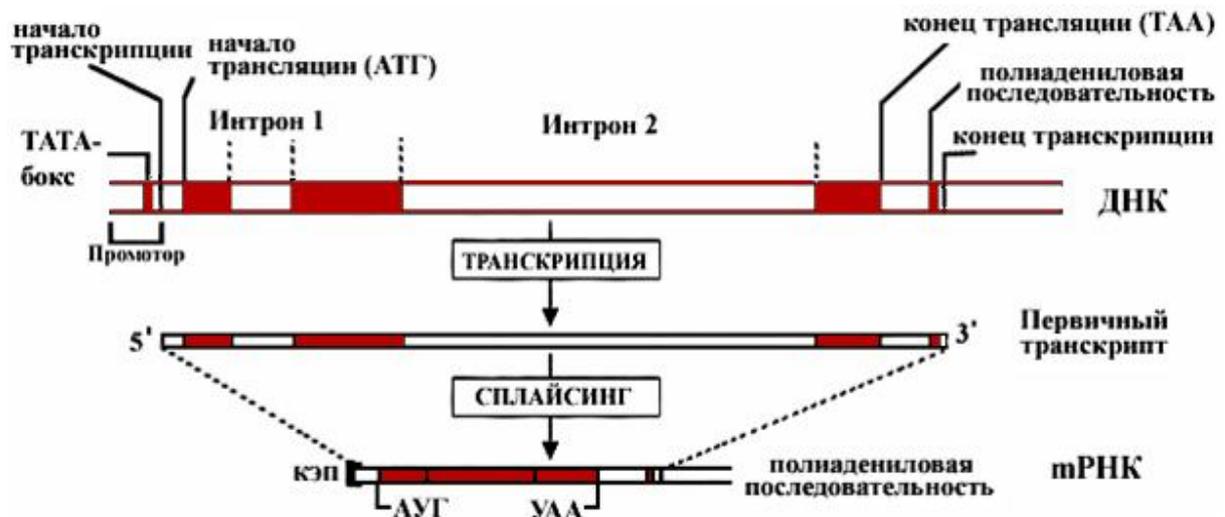


Рис. 11. Упрощенная схема β-глобинового гена человека и матричной мРНК после процесса **транскрипции** и **сплайсинга**. Этот ген состоит из более чем 2 тыс. н.п. Однако из них только около 450 н.п. несут информацию об аминокислотной последовательности β-глобина. Кроме трех кодирующих участков (экзонов), ген включает два некодирующих (интроны 1 и 2). Образующийся первичный транскрипт РНК состоит из ~1600 н.п. Во время сплайсинга РНК интроны, удаляются и оба конца РНК модифицируются.

топлазму, где соединяется с рибосомой. Считают, что у эукариот «КЭП» и поли-А хвост защищают и-РНК от разрушения в ходе ее продвижения к рибосомам в цитоплазме. Предполагается также, что «КЭП» играет определенную роль в связывании и-РНК с малой субчастицей рибосомы.

1.5 Генетический код

Идея о том, что **гены контролируют структуру белков**, впервые была высказана в 1902 г. А. Гэрродом, изучавшим **алкаптонию** – врожденное наследственное заболевание, при котором организм не расщепляет гомогентизиновую кислоту, что приводит к серьезным нарушениям метаболизма.

В 1941 г. Г. Бидл и Э. Татум на основе генетических экспериментов на грирке *Neurospora crassa* показали, что одна мутация приводит к потере метаболической активности только одного фермента (белка)

и установили закономерность: **один ген – один белок**.

После открытия Уотсона и Крика необходимо было понять, как последовательность из 4-х азотистых оснований в ДНК, из которых состоит ген определяет (**кодирует**) последовательность из 20 аминокислот в белке. Можно было предположить, что **генетический код** не может состоять из одного или двух нуклеотидов, так как их только четыре и сочетаний из двух нуклеотидов (4^2) может быть только 16, а аминокислот 20. Мысль о том, что генетический код должен быть **триплетным** впервые в 1954 г высказал физик Г. Гамов. В этом случае (4^3) получается 64 триплетных сочетания, и их вполне достаточно для кодирования всех аминокислот. **Триплет** – три рядом стоящих нуклеотида, кодирующих одну аминокислоту получил название **кодона**.

Начало экспериментальному анализу по расшифровке генетического кода положили в 1961 г. М. Ниренберг и Дж. Матеи. Они создали простейшую искусственную иРНК, содержащую только урацил, Затем вводили полиУ РНК в бесклеточную среду из кишечной палочки *E. coli*. В результате был получен полипептид, состоящий только из фенилаланина. Таким образом, **кодон** для **фенилаланина** был расшифрован как **УУУ**.

Затем в течение нескольких лет в лабораториях М. Ниренберга и С. Очоа был определен состав большинства кодонов. Однако требовалось установить последовательность нуклеотидов в кодонах. Г. Корана с сотр. разработал метод химического синтеза фрагментов ДНК с заданной последовательностью нуклеотидов, что позволяло получить иРНК также с известной последовательностью и использовать ее в бесклеточной системе белкового синтеза. Вторым методом предложили М. Ниренберг и П. Ледер. Так как одного триплета иРНК достаточно для связывания с рибосомой и тРНК, ученые использовали триплеты с известной последовательностью нуклеотидов для того, чтобы определить, какую аминокислоту доставит тРНК.

Уже к 1966 г. на основе методов, разработанных Кораной, Ниренбергом и Ледером, были определены все триплеты, кодирующие ту или иную аминокислоту и следовательно *генетический код* был полностью *расшифрован*. Структура генетического кода по иРНК представлена ниже в виде таблицы 1. Оказалось, что **61 триплет** кодирует **аминокислоты**, а **3 триплета** УАА, УГА и УАГ являются «стоп кодонами» и соответственно **останавливают** процесс **трансляции** (табл. 1). Таким образом, усилиями ученых в течение нескольких лет удалось полностью выяснить природу связи между структу-

рой гена и соответствующего белка.

В результате проведенных исследований были установлены все **основные свойства** генетического кода: **триплетность** - каждая аминокислота кодируется тремя нуклеотидами; **неперекрываемость** - один и тот же нуклеотид не может входить одновременно в состав двух соседних триплетов; **колинеарность** - порядок расположения кодонов в иРНК совпадает с порядком расположения аминокислот в синтезирующейся полипептидной цепи; **вырожденность** - 18 из 20 аминокислот (кроме метионина и триптофана), кодируются более чем

Таблица 1. Соответствие кодонов и-РНК аминокислотам

Основания кодонов					
первое	второе	третье			
		У	Ц	А	Г
У	У	Фен	Фен	Лей	Лей
	Ц	Сер	Сер	Сер	Сер
	А	Тир	Тир	-	-
	Г	Цис	Цис	-	Три
Ц	У	Лей	Лей	Лей	Лей
	Ц	Про	Про	Про	Про
	А	Гис	Гис	Глн	Глн
	Г	Арг	Арг	Арг	Арг
А	У	Иле	Иле	Иле	Мет
	Ц	Тре	Тре	Тре	Тре
	А	Асн	Асн	Лиз	Лиз
	Г	Сер	Сер	Арг	Арг
Г	У	Вал	Вал	Вал	Вал
	Ц	Ала	Ала	Ала	Ала
	А	Асп	Асп	Глу	Глу
	Г	Гли	Гли	Гли	Гли

Обозначения аминокислот: Ала - аланин, Арг - аргинин, Асп - аспарагиновая кислота, Асн - аспарагин, Вал - валин, Гис - гистидин, Гли - глицин, Глн - глутамин, Глу - глутаминовая кислота, Иле - изолейцин, Лей - лейцин, Лиз - лизин, Мет - метионин, Про - пролин, Сер - серин, Тир - тирозин. Тре - треонин, Три - триптофан, Фен - фенилаланин, Цис - цистеин.

одним триплетом; **универсальность** - код одинаков практически для всех живых организмов.

Интересно отметить, что в митохондриях четыре кодона имеют другую кодировку: кодон УГА определяет триптофан, АУА - метионин, а кодоны АГА и АГГ стали терминирующими. Открытие новых кодонов у митохондрий может служить доказательством того, что код эволюционировал и не сразу стал таким как сейчас.

1.6 Трансляция

Трансляция наряду с репликацией и транскрипцией является еще одним важнейшим этапом реализации генетической информации

в клетке. В самом общем виде **трансляция** – это *процесс биосинтеза белка по матрице иРНК*, который протекает на рибосомах. В этом процессе кроме информационной РНК принимают активное участие еще два типа РНК – транспортные и рибосомные.

Транспортные РНК. Роль **тРНК** заключается в том, что они *переносят аминокислоты к рибосомам и участвуют в процессе синтеза белка*. Транспортные РНК, которых насчитывается более 60-ти, состоят из 75-90 нуклеотидов и имеют структуру в виде клеверного листа (рис. 12). Каждая аминокислота присоединяется к определенной тРНК. На одном конце тРНК находится **акцепторный триплет ЦЦА**, к аденину которого присоединяется специфическая аминокислота. На другом конце (в антикодонной петле) каждой тРНК находится **антикодон** – специфический триплет, с помощью которого **тРНК** «узнает» соответствующий **комплементарный кодон** в **иРНК**, и тем самым определяет место, куда должна быть поставлена данная аминокислота в синтезируемой молекуле белка. Боковые петли тРНК, по-видимому, используются для связывания с рибосомой и со специфической аминоацил-тРНК-синтетазой.

Рибосомные РНК. Размер рибосомных **рРНК** составляет 120–3100 нуклеотидов. Они служат *каркасом рибосом* и способствуют *первоначальному связыванию иРНК с рибосомой* в ходе биосинтеза белка.

Рибосомы являются клеточными органеллами, на которых протекает процесс биосинтеза белка. Их число в клетке прокариот составляет примерно $\approx 10^4$, а у эукариот $\approx 10^5$. В период синтеза белка рибосомы могут объединяться в **полисомы**. Рибосомы состоят из двух субъединиц разного размера и формы. Размер *эукариотической рибосомы* составляет **80S** (S – ед. Сведберга, характеризующая скорость седиментации при центрифугировании). Большая субъединица величиной **60S** состоит из **рРНК** трех типов - **28S**, **5S** и **5,8S** и 50 белков, а малая величиной **40S** - из **18S** рРНК и 33 белков. У *прокариот рибосома* имеет величину **70S** и состоит из большой (**50S**) субъединицы, в состав которой входит **23S** и **5S** рРНК, а также 34 белка и малой (**30S**), состоящей из **16S** рРНК и 21 белка.

Как уже отмечалось, трансляция заключается в том, что последовательность расположения кодонов в иРНК переводится в строго

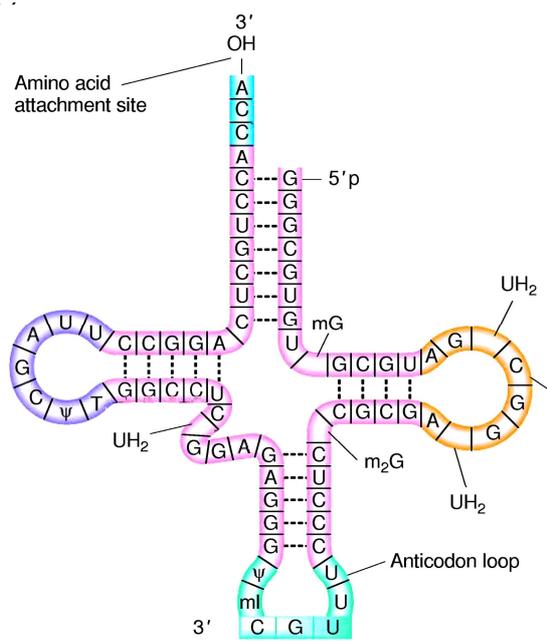


Рис. 12. тРНК с антикодоном ЦГУ, доставляющая к месту синтеза белка аминокислоту аланин

упорядоченную последовательность расположения аминокислот в молекуле синтезируемого белка (рис.13). Процесс трансляции включает **два этапа**: активирование аминокислот и присоединение их к «своим» тРНК и непосредственно синтез белковой молекулы.

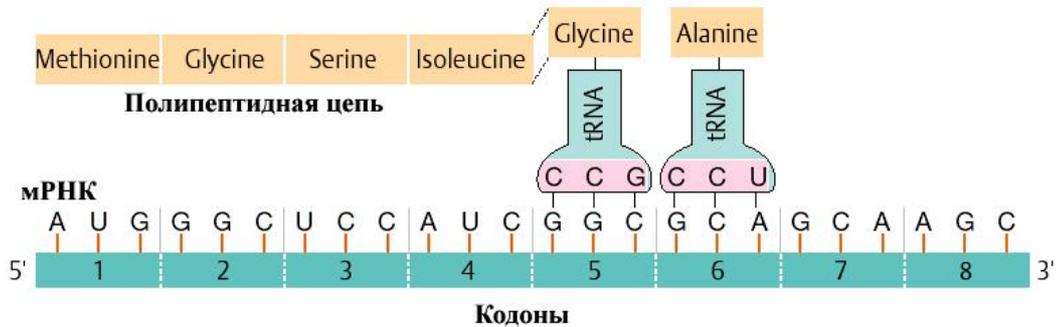


Рис. 13. Схематическое изображение принципа трансляции

Активирование свободных аминокислот и присоединение их к тРНК осуществляется при помощи специализированных ферментов – **аминоацил-тРНК-синтетаз**. В молекуле каждой аминоацил-тРНК-синтетазы имеется по крайней мере три центра связывания: для аминокислоты, тРНК и АТФ. Сначала осуществляется связь аминоацил-тРНК-синтетазы с определенной аминокислотой, а затем активированная с помощью АТФ аминокислота присоединяется к аденину акцепторного триплета ЦЦА тРНК (рис. 14). В результате образуется **аминоацил-тРНК (aa-тРНК)**. Аминоацил-тРНК взаимодействует с одним из белковых факторов, который в комплексе с **ГТФ** необходим для транспорта и связывания aa-тРНК с рибосомой.

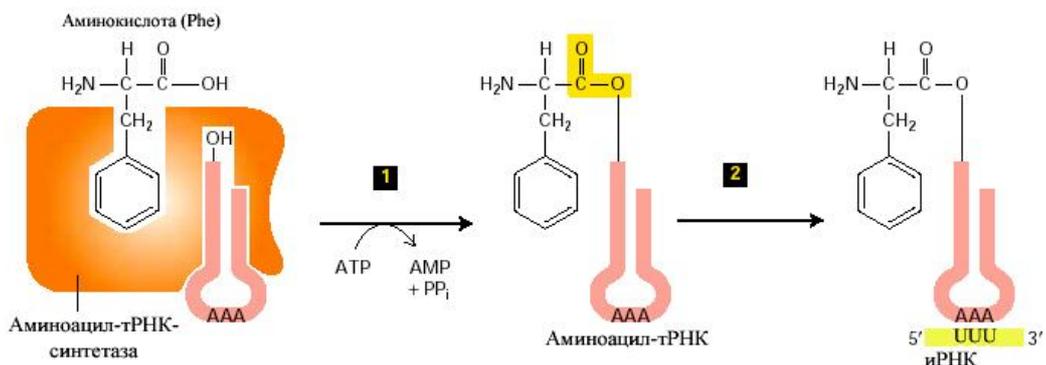


Рис. 14. Присоединение аминокислоты фенилаланина к терминальному аденозину соответствующей тРНК с помощью фермента аминоацил-тРНК-синтетазы (этап 1) и соединение антикодона ААА аминоацил-тРНК^{Phe} с соответствующим кодоном УУУ мРНК (этап 2).

Процесс синтеза белка на рибосомах подразделяется на три стадии: инициация, элонгация и терминация (рис. 15).

Инициация. Инициация синтеза полипептидной цепи начинается с присоединения малой субъединицы рибосомы к соответствующему

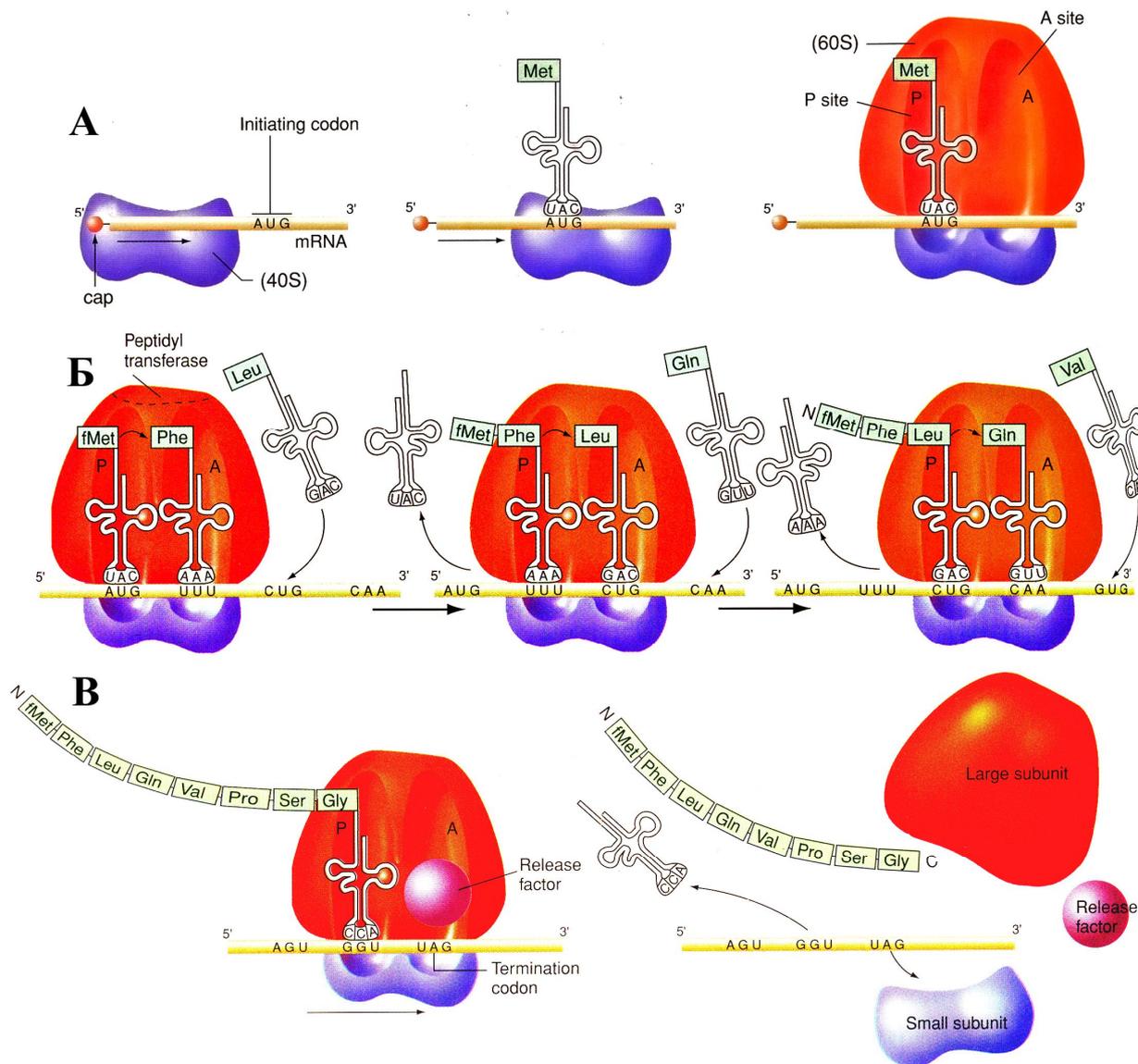


Рис. 15. Схематическое изображение основных этапов трансляции на рибосомах (А - инициация, Б - элонгация, В - терминация).

центру связывания на иРНК (рис. 15, А). Сигналом инициации трансляции служит кодон для метионина АУГ, который расположен в начале иРНК. К кодону АУГ своим антикодоном УАЦ присоединяется аа-тРНК с метионином (у бактерий с формилметионином). Затем к этому комплексу, присоединяется большая субъединица рибосомы. В результате образуется полная рибосома (80S), включающая молекулу иРНК и инициаторную аа-тРНК с метионином, которая располагается в *пептидном центре* большой субъединицы (рис. 15, А).

Элонгация. В свободный *аминоцильный центр* рибосомы со второй аминокислотой поступает следующая аа-тРНК, которая своим антикодоном соединяется со строго с комплементарным кодоном иРНК (рис. 15, Б). В этот момент при помощи фермента **пептидилтрансферазы** предшествующая аминокислота (метионин) своей карбоксильной

группой (COOH) соединяется с аминогруппой (NH₂) вновь пришедшей аминокислоты. Между ними образуется пептидная связь (–CO–NH–). В результате тРНК, принеся метионин, освобождается, а в аминоацильном центре к тРНК присоединен уже дипептид. Дипептидил-тРНК благодаря перемещению рибосомы на один кодон при участии фермента **транслоказы** и белкового **фактора элонгации** продвигается из аминоацильного центра в пептидильный. Освободившаяся тРНК и связанный с ней кодон иРНК АУГ выходят из рибосомы. (рис. 15, Б). Следующая aa-тРНК приносит новую аминокислоту в освободившийся аминоацильный центр в соответствии с поступившим туда кодоном. Эта аминокислота при помощи пептидной связи соединяется с предыдущей. При этом рибосома снова продвигается еще на один кодон, и процесс повторяется (рис. 15, Б).

Терминация. Как только в аминоацильный центр рибосомы поступит один из завершающих кодонов иРНК (УАА, УАГ или УГА), к нему присоединяется белковый фактор терминации и блокирует дальнейшую элонгацию цепи (рис. 15, В). После этого синтезированная полипептидная цепь отделяется от тРНК, рибосомные субъединицы диссоциируют и освобождают тРНК и иРНК, которые могут принять участие в синтезе следующей полипептидной цепи (рис. 15, В).

На одной молекуле иРНК работает не одна рибосома, а многие (до 100). На каждой из рибосом строится полипептидная цепь. У бактерий транскрипция и трансляция связаны между собой и трансляция начинается до завершения синтеза иРНК на ДНК. Образующиеся при синтезе полипептидные цепи претерпевают ряд посттрансляционных преобразований и только после этого начинают выполнять в организме свои специфические функции.

1.7 Белки, их структура и функции

Таким образом, белки – это конечные продукты экспрессии генов. Основным классом белков – это **ферменты** (энзимы), которые служат биологическими катализаторами, обеспечивающими высокую скорость и точность всех биохимических реакций в организме. Ферменты осуществляют как *синтез (анаболизм)*, так и *расщепление (катаболизм)* всех органических молекул в клетке, включая углеводы, липиды, белки и нуклеиновые кислоты.

Белки выполняют также огромное количество других функций. Так *структурные функции* осуществляют – **коллаген** (хрящи, сухожилия), **кератин** (перья, волосы, когти, рога); *транспортные* – **гемоглобин** (перенос O₂ и CO₂), **альбумин** (жирные кислоты), **глобулины** (гормоны металлы); *сократительные* – **актин**, **миозин** (работа мышц), **тубулин**

(веретено деления, реснички); *гормональные* – **инсулин** (регулирует содержание глюкозы).

Белки – это полимеры мономерами, которых являются аминокислоты. В состав природных белков входит только 20 аминокислот (табл. 2). *Аминогруппа* одной аминокислоты способна взаимодействовать с *карбоксильной* группой другой аминокислоты с образованием **пептидной связи** ($-\text{CO}-\text{NH}-$) и выделением молекулы воды. При этом образуется **дипептид**:

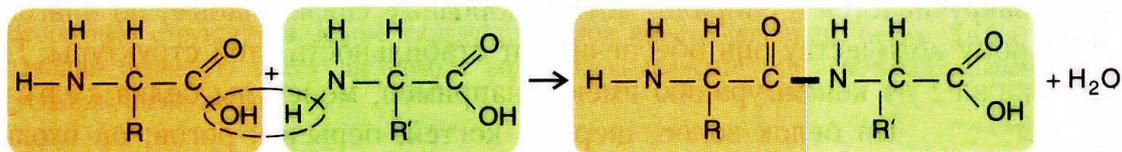


Таблица 2. Аминокислоты, входящие в состав

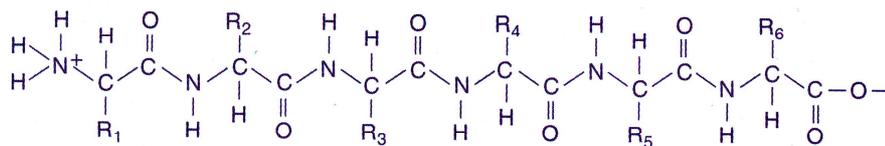
A					
	Gly (G)	Ala (A)	Val (V)	Leu (L)	Ile (I)
	Pro (P)	Phe (F)	Trp (W)	Cys (C)	Met (M)
B					
	Ser (S)	Thr (T)	Tyr (Y)	Asn (N)	Gln (Q)
B	1. Basic (positively charged)			2. Acid (negatively charged)	
	Arg (R)	Lys (K)	His (H)	Asp (D)	Glu (E)

Примечание: А – нейтральные аминокислоты; Б - полярные аминокислоты; В – положительно- и отрицательнозаряженные аминокислоты.

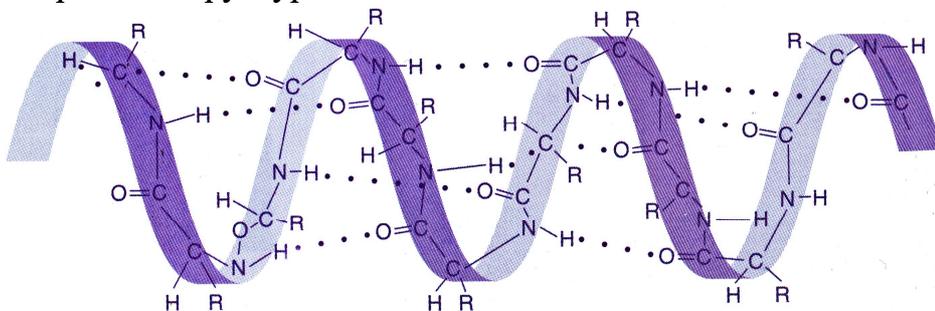
Если таким образом соединяется несколько аминокислот (более 10), то образуется – **полипептид**. Полипептиды в молекулы, которых входит более 50 аминокислотных остатков называются **белками**.

Белковые молекулы имеют четыре уровня (структуры) пространственной организации. **Первичная структура** молекулы белка представляет собой цепочку из аминокислот соединенных пептидными связями (рис. 16,а). Это наиболее важная структура, поскольку она определяет форму и свойства белка. *Каждый белок организма имеет уникальную первичную структуру.* **Вторичная структура** белковой молекулы возникает в результате образования водородных связей между атомом водорода NH-группы и СО-группы разных аминокислотных остатков полипептидной цепи (рис. 16,б). Полипептид при этом закручивается в спираль. Такая структура характерна для кератина, коллагена, инсулина, миозина, фибриногена и др. **Третичная структура**

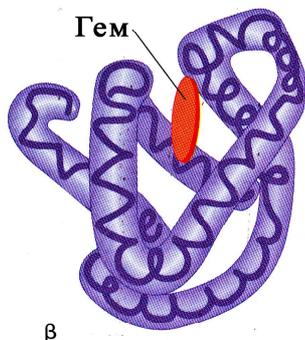
(а) Первичная структура



(б) Вторичная структура



(в) Третичная структура



(г) Четвертичная структура

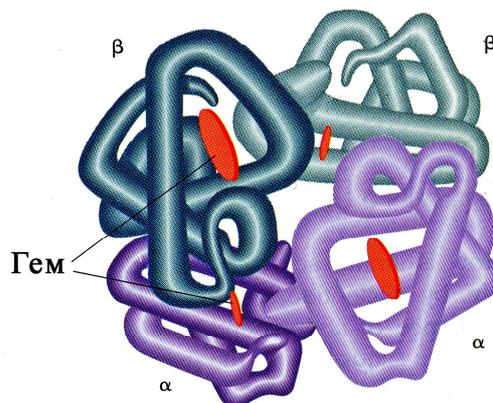


Рис. 16. Четыре уровня организации белков

создается S–S связями (дисульфидными мостиками), а также гидрофобно-гидрофильными взаимодействиями разных частей молекулы полипептида (рис. 16,в). Третичной структурой определяется специфичность белковых молекул, их биологическая активность. Некоторые белки имеют **четвертичную структуру**. В этом случае несколько полипептидных цепей с третичной структурой за счет межмолекулярных взаимодействий объединяются в единый комплекс. Ярким примером белка с четвертичной структурой является **гемоглобин**, состоящий из четырех полипептидных субъединиц и небелковой части – гемма (рис. 16,г).

Ключевые слова и понятия

<p> трансформация вирулентный штам <i>Streptococcus pneumoniae</i> трансформирующий фактор дезоксирибонуклеиновая кислота «нуклеин» молекула ДНК азотистые основания аденин, гуанин, цитозин, тимин нуклеотид дезоксирибоза рибоза рибонуклеиновая кислота (РНК) правила Чаргаффа принцип комплементарности двойная спираль репликация полуконсервативный принцип точка инициации (ori) репликационная вилка геликаза белки SSBP топоизомераза (ДНК-гираза) ДНК-полимераза </p>	<p> промотор «ТАТА-бокс» интрон, экзон первичный транскрипт (про-мРНК) сплайсинг КЭП (метилированный гуанин) поли-А хвост зрелая и-РНК алкаптонурия один ген – один белок генетический код триплет кодон стоп-кодон основные свойства кода трансляция транспортная РНК (т-РНК) акцепторный триплет ЦЦА антикодон рибосома рибосомная РНК (р-РНК) единица Сведберга (S) аминоацил-тРНК-синтетаза аминоацил-тРНК (aa-тРНК) </p>
---	--

праймаза РНК-праймер лидирующая цепь фрагменты Оказаки запаздывающая цепь лигазы урацил информационная РНК (и-РНК) транскрипция РНК-полимеразы матричная цепь 3'-5'	инициация кодон инициации АУГ элонгация пептидилтрансфераза аминокислотный центр пептидилный центр факторы элонгации терминация пептидная связь четыре структуры белка четвертичная структура
---	---

Вопросы для самоконтроля:

2. Лабораторная работа

Задание 1. Разобрать ключевые слова и понятия. Ответить на вопросы: Что такое генная инженерия? Каково строение ДНК и РНК? Что такое гены? Что такое репликация и какой принцип лежит в основе данного процесса? Каким образом и где осуществляются процессы транскрипции и трансляции? Как можно охарактеризовать генетический код? Что такое стоп-кодоны? Какова структура и функции белка?

Задание 2. Для самоконтроля решить тест. В каждом вопросе выберите одно правильное утверждение:

Тест

1. Явление трансформации открыл:
 - а) Г. Мендель в 1900 г.
 - б) Ф. Гриффитс в 1928 г.**
2. Вирулентный штамм - это штамм, от которого организм:
 - а) погибает.**
 - б) остается жив.
3. *Streptococcus pneumoniae* это:
 - а) штамм вызывающий заболевание пневманией.**
 - б) безвредный вирус, не вызывающий заболевание.
4. Трансформирующим фактором является:
 - а) мышь.
 - б) ДНК.**
5. Дезоксирибонуклеиновая кислота:
 - а) носитель наследственной информации.**
 - б) инактивирующий фермент.

6. «Нуклеин»:
- а) клейкое вещество.
 - б) нуклеиновая кислота.
7. Молекула ДНК:
- а) высокомолекулярный полимер, состоящий из четырех дезоксирибонуклеотидов.
 - б) низкомолекулярный мономер, состоящий из двух цепочек дезоксирибонуклеотидов.
8. Азотистые основания:
- а) компоненты нуклеиновой кислоты.
 - б) компоненты фосфорной кислоты.
9. Аденин, гуанин:
- а) пуриновые основания.
 - б) пиримидиновые основания.
10. Цитозин, тимин:
- а) пуриновые основания.
 - б) пиримидиновые основания.
11. Нуклеотид:
- а) соединение азотистого основания, углевода и фосфорная кислота.
 - б) ядро.
12. Дезоксирибоза:
- а) азотистое основание ДНК.
 - б) углеводный компонент ДНК.
13. Рибоза:
- а) азотистое основание ДНК.
 - б) углеводный компонент ДНК.
14. Рибонуклеиновая кислота (РНК):
- а) цитоплазматическая нуклеиновая кислота, которая в качестве углевода содержит рибозу.
 - б) двух цепочечная молекула, которая в качестве углевода содержит дезоксирибозу.
15. Правила Чаргаффа:
- а) $(A+G=T+C)$ ($A=T$) ($G=C$).
 - б) $(A+T=G+C)$ ($A=C$) ($G=T$).
16. Двойная спираль:
- а) две полинуклеотидные комплементарные цепочки ДНК.
 - б) две полинуклеотидные комплементарные цепочки РНК.
17. Принцип комплементарности:
- а) А-Т и Г-Ц.
 - б) А-Г и Т-Ц.

18.Репликация:

а) процесс точного самовоспроизведения молекул нуклеиновых кислот.

б) разрезающие ДНК по определенным нуклеотидным последовательностям.

19.Полуконсервативный принцип:

а) материнская молекула ДНК состоит из двух «старых» цепей.

б) дочерняя молекула ДНК состоит из одной «старой» и одной «новой» цепей.

20.Точка инициации (ori):

а) место начала репликации молекул ДНК.

б) место окончания репликации молекул ДНК.

21.Репликационная вилка:

а) столовый прибор.

б) одноцепочечные участки ДНК, которые становятся матрицами для репликации.

22.Геликаза:

а) фермент, под влиянием которого цепи ДНК разъединяются (раскручиваются) в точке инициации репликации.

б) мутаген, под влиянием которого цепи ДНК разрываются.

23.Белки SSBP:

а) не позволяют одноцепочечным участками ДНК вновь соединиться в двойную спираль.

б) соединяют одноцепочечные участки ДНК в двойную спираль.

24.Топоизомераза (ДНК-гираза):

а) снимает возникающую суперскрученность и напряжение в нераскрученной части ДНК репликационной вилки (ДНК-гираза у прокариот).

б) маркирует ДНК (ДНК-гираза у эукариот).

25.ДНК-полимераза:

а) осуществляет процесс репликации в направлении 3'-5'.

б) осуществляет процесс репликации в направлении 5'-3'.

26.Праймаза:

а) РНК-полимераза.

б) ДНК-полимер.

27.РНК-праймер:

а) длинный (~1000 нуклеотидов) фрагмент РНК.

б) короткий (~10 нуклеотидов) фрагмент РНК.

28.Лидирующая цепь:

а) начинается на материнской цепи, идущей от точки инициации в на-

правлении 3'-5' и идет непрерывно в виде сплошной линии.

б) начинается на дочерней цепи, идущей от точки инициации в направлении 5'-3' и идет прерывисто.

29. Фрагменты Оказаки:

а) отдельные короткие фрагменты (200-2000 нуклеотидов).

б) фрагменты в виде сплошной линии.

30. Запаздывающая цепь:

а) первая цепь, синтез на которой идет в направлении 3'-5'.

б) вторая цепь, синтез на которой идет в направлении 5'-3'.

31. Лигаза:

а) фермент, соединяющий в общую полинуклеотидную цепочку ДНК после репликации.

б) белок, разъединяющий в общую полинуклеотидную цепочку ДНК после репликации.

32. Урацил:

а) азотистое основание РНК.

б) азотистое основание ДНК.

33. Информационная РНК (и-РНК):

а) активный участник репликации.

б) активный участник трансляции.

34. Транскрипция:

а) транскрибирование с ДНК в нуклеотидную последовательность короткоживущих и-РНК.

б) денатурация белка.

35. РНК-полимеразы:

а) ферменты, осуществляющие транскрипцию в направлении 5'-3'.

б) ферменты, осуществляющие трансляцию в направлении 3'-5'.

36. Матричная цепь 3'-5':

а) цепь ДНК, служит для синтеза и-РНК.

б) цепь РНК, служит для синтеза ДНК.

37. Промотор:

а) участок гена иницирующий трансляцию.

б) участок гена иницирующий транскрипцию.

38. «ГАТА-бокс»:

а) участок промотора перед геном.

б) геном боксёра.

39. Интрон:

а) не содержащие информацию отрезки ДНК в структурной части гена у эукариот.

б) содержащие информацию отрезки ДНК в структурной части гена

у эукариот.

40. Экзон:

а) не содержащие информацию отрезки ДНК в структурной части гена у эукариот.

б) содержащие информацию отрезки ДНК в структурной части гена у эукариот.

41. Первичный транскрипт (про-мРНК):

а) РНК содержащая интроны и экзоны.

б) РНК содержащая только интроны.

42. Сплайсинг:

а) процесс удаления из про-мРНК экзонов.

б) процесс удаления из про-мРНК интронов.

43. КЭП (метилированный гуанин):

а) присоединяется перед выходом из ядра к начальной (5') части и-РНК.

б) отсоединяется перед входом в ядро с начальной (5') части и-РНК.

44. Поли-А хвост:

а) примерно 200 остатков аденина присоединяется к 3'-концу и-РНК.

б) примерно 20 остатков аденина присоединяется к 5'-концу и-РНК.

45. Зрелая и-РНК:

а) экзоны, КЭП и поли-А хвост.

б) интроны, экзоны, КЭП и поли-А хвост.

46. Алкаптонурия:

а) приобретённое ненаследственное заболевание, при котором организм расщепляет гомогентизиновую кислоту, что приводит к серьезным нарушениям метаболизма.

б) врожденное наследственное заболевание, при котором организм не расщепляет гомогентизиновую кислоту, что приводит к серьезным нарушениям метаболизма.

47. Один ген – один белок:

а) закономерность, при которой, мутация приводит к потере метаболической активности только одного фермента (белка).

б) закономерность, при которой, мутация приводит к потере метаболической активности нескольких ферментов (белков).

48. Генетический код:

а) система записи наследственной информации в молекулах нуклеиновых кислот.

б) система записи генетических символов.

49. Триплет:

а) три рядом стоящих нуклеотида.

б) комбинация из трех последовательно расположенных ферментов в молекуле белка.

50. Кодон:

а) три рядом стоящих аминокислоты, кодирующих один нуклеотид.

б) три рядом стоящих нуклеотида, кодирующих одну аминокислоту.

51. Стоп-кодон:

а) три нуклеотид в информационной РНК, сигнализирующий об окончании синтеза полипептида и освобождении полной полипептидной цепи от рибосомы.

б) нуклеотид в информационной РНК, сигнализирующий о начале синтеза полипептида.

52. Основные свойства генетического кода:

а) обобщенность, консервативность, моногенность, универсальность.

б) триплетность, неперекрываемость, коллинеарность, вырожденность, универсальность.

53. Трансляция:

а) процесс биосинтеза белка по матрице иРНК, который протекает на рибосомах.

б) процесс биосинтеза белка по матрице кДНК, который протекает в ядре.

54. Транспортная РНК (т-РНК):

а) переносят аминокислоты к рибосомам и участвуют в процессе синтеза белка.

б) переносят нуклеотиды к рибосомам и участвуют в процессе синтеза ДНК

55. Акцепторный триплет ЦЦА:

а) к нему присоединяется специфическая аминокислота.

б) специфический триплет, с помощью которого тРНК «узнает» соответствующий комплементарный кодон в иРНК.

56. Антикодон:

а) к нему присоединяется специфическая аминокислота.

б) специфический триплет, с помощью которого тРНК «узнает» соответствующий комплементарный кодон в иРНК.

57. Рибосома:

а) клеточные органеллы, на которых протекает процесс биосинтеза белка.

б) неклеточные органеллы, на которых протекает процесс биосинтеза липидов.

58. Рибосомная РНК (р-РНК):

а) служит каркасом рибосом, и способствуют первоначальному связыванию иРНК с рибосомой в ходе биосинтеза белка.

б) переносят аминокислоты к рибосомам и участвуют в процессе синтеза белка.

59. Единица Сведберга (S) характеризует:

а) скорость седиментации при центрифугировании.

б) размер субъединиц рибосом.

60. Аминоацил-тРНК-синтетаза:

а) фермент, активирующий свободные аминокислоты и присоединение их к тРНК.

б) белок, дезактивирующий свободные аминокислоты и присоединение их к тРНК.

61. Аминоацил-тРНК (aa-тРНК):

а) образуется в результате разрыва связи аминоацил-тРНК-синтетазы с определенной аминокислотой, а затем дезактивированная с помощью АТФ аминокислота присоединяется к аденину акцепторного триплета ЦЦА тРНК.

б) образуется в результате связи аминоацил-тРНК-синтетазы с определенной аминокислотой, а затем активированная с помощью АТФ аминокислота присоединяется к аденину акцепторного триплета ЦЦА тРНК.

62. Инициация:

а) присоединение малой субъединицы рибосомы к соответствующему центру связывания на иРНК.

б) отсоединение малой субъединицы рибосомы с соответствующего центра связывания на иРНК.

63. Кодон инициации АУГ:

а) сигнал инициации трансляции.

б) сигнал инициации транскрипции.

64. Элонгация:

а) удлинение нуклеотидной цепи путем добавления новых нуклеотидов.

б) укорочение нуклеотидной цепи путем убавления нуклеотидов.

65. Пептидилтрансфераза - это фермент, который своей карбоксильной группой:

а) соединяет предшествующую аминокислоту с аминогруппой вновь пришедшей аминокислоты.

б) отсоединяет вновь пришедшую аминокислоту.

66. Аминоацильный центр:

а) малая субъединица рибосомы.

б) большая субъединица рибосомы.

67. Пептидильный центр
 а) малая субъединица рибосомы.
 б) **большая субъединица рибосомы.**
68. Терминация:
 а) **блокирует дальнейшую элонгацию цепи.**
 б) активизирует дальнейшую элонгацию цепи.
69. Пептидная связь
 а) **–CO–NH–.**
 б) –COOH–.
70. Четыре структуры белка:
 а) **первичная, вторичная третичная и четвертичная.**
 б) А, Т, Г, Ц.
71. Четвертичная структура белка:
 а) **несколько полипептидных цепей с третичной структурой объединенных в единый комплекс.**
 б) Четыре полипептидные цепей с первичной структурой объединенных в единый комплекс.

Литература

1. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. – М.: Мир, 1988., ил.
2. **Жимулев И.Ф.** Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
3. **Картель Н.А.** Биоинженерия: методы и возможности. Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
4. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии/** Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
5. **Гончаренко Г.Г.** Основы генетической инженерии. Гомель: ГГУ, 2003. – 118с.
6. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
7. **Льюин Б.** Гены: – Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 544 с., ил.
8. **Modern genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
9. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
10. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

ЗАНЯТИЕ 2

ТЕМА: Выделение геномной ДНК из эукариотических клеток

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться с методами выделения геномной ДНК из эукариотических клеток, выделить образец ДНК

1. Теоретическая часть

Чтобы провести молекулярный анализ ДНК, нужно, прежде всего, получить их в чистом виде. Источником выделения ДНК служат любые ядродержащие клетки. Наиболее часто при работе с материалом человека используют лейкоциты, буккальные клетки (клетки эпителия щеки). В зависимости от того, какие клетки будут использованы, необходимо подобрать оптимальные методы выделения, позволяющие получить максимально возможное количество чистого продукта.

Отбор образца ДНК должен проходить до еды или питья, или же спустя час после него, следует избегать приема теплых или горячих жидкостей перед отбором образца!

После гигиены полости рта (тщательно сполоснуть рот водой) чистыми руками взять ватный аппликатор (щеточку) и держа его за пластиковый стержень, потереть наконечником с внутренней стороны щечных поверхностей в течение 2-3 мин (избегая контакта с зубами и медленно поворачивая наконечник для сбора клеток).

ДНК из собранных клеток должна быть выделена в течение 24 часов.

Ниже приводятся наиболее оптимальные методы выделения ДНК – **щелочной метод** и **метод фенольной экстракции**.

Метод **щелочной экстракции ДНК** из буккальных клеток.

1. Ватный аппликатор с образцом ДНК помещаем в пронумерованные пробирки с крышкой, типа Eppendorf, объемом 1,5 мл. В каждую пробирку добавляем 300мкл щелочи 50 mM NaOH, закрываем пробирки и перемешиваем на центрифуге-вортексе «Elmi» в течение 10 сек.

2. Пробы устанавливаем в твердотельный термостат «Гном» и инкубируем пробы в течение 5 мин при 95⁰С.

3. Ватные аппликаторы удаляются из пробирок, при этом клетки аккуратно встряхиваются с тампона, встряхиваем на центрифуге-вортексе «Elmi» в течение 30 сек., затем центрифугируем около 1 мин при 5 тыс. оборотов/мин.

4. В каждую пробирку после непродолжительного охлаждения добавляем 30 мкл 1М Трис-HCl (рН довести до 8,0).

5. Полученную смесь центрифугируем на центрифуге с ротором СМ «Elmi» при 13 тыс. оборотов/мин. в течение 2 минут для осаждения белков и продуктов распада клеток

6. Супернатант (надосадочную жидкость) с растворенной в нем ДНК отбирают отдельным наконечником и переливают в новые маркированные пробирки. По окончании этой процедуры пробы готовы к постановке ПЦР.

Пробирки с разаликвоченным (разделенным на равные части) раствором содержащим ДНК хранят в морозильной камере ($t \approx -20^{\circ}\text{C}$). Срок годности проб не менее 5 лет.

Метод фенольной экстракции ДНК.

Для выделения геномной ДНК разрушают плазматическую и ядерную мембраны и освобождаются от клеточных белков. Удаление белков, часто проводят с помощью экстракции, из водных растворов нуклеиновых кислот, фенолом и(или) хлороформом. При выделении ДНК из клеточных лизатов чаще всего удаляют большинство белков гидролизом их протеолитическими ферментами, например протеиназа К, которые активны в отношении широкого спектра белков.

1. Пробу ДНК смешивают с равным объемом фенола или смеси фенол–хлороформ в полипропиленовой пробирке с пластмассовой крышкой.

2. Содержимое пробирки размешивают, пока не образуется эмульсия.

3. Центрифугирование – 3 мин при комнатной температуре. Если органическая и водная фазы разделились не достаточно хорошо, центрифугируют еще раз более продолжительное время или при большей скорости.

4. Верхний водный слой переносят пипеткой в новую полипропиленовую пробирку. Промежуточную фазу и нижнюю органическую фазу отбрасывают.

5. Добавляют равный объем смеси фенола и хлороформа (1:1). Повторяют стадии 2-4.

6. Добавляют равный объем хлороформа, и повторяют стадии 2-4.

7. Осаждают ДНК этанолом и собирают ее.

2. Ключевые слова и понятия

выделение ДНК геномная ДНК	ДНК пробы щелочной метод
-------------------------------	-----------------------------

буккальные клетки отбор образца ДНК	метод фенольной экстракции
--	----------------------------

3. Лабораторная работа

Задание 1. Выделить образец ДНК из буккальных клеток (клетки эпителия щеки) по методу щелочной экстракции ДНК.

Задание 2. Выделить образец ДНК из буккальных клеток (клетки эпителия щеки) по методу фенольной экстракции ДНК.

Литература

1. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. – М.: Мир, 1988., ил.
2. **Жимулев И.Ф.** Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
3. **Картель Н.А.** Биоинженерия: методы и возможности. Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
4. **Методы молекулярной генетики и геной инженерии/ Мазин А.В. и др.** – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
5. **Гончаренко Г.Г.** Основы генетической инженерии. Гомель: ГГУ, 2003. – 118с.
6. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
7. **Льюин Б.** Гены: – Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 544 с., ил.
8. **Modern genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
9. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
10. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

ЗАНЯТИЕ 3

ТЕМА: Амплификация

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться с методами амплификации участка ДНК на примере инсерционно-делеционного полиморфизма в 16 интроне гена ACE человека и внутреннего спейсера 2 кошачьей двуустки.

1. Теоретическая часть

Для амплификации участка ДНК используют: выделенную ДНК, праймеры (прямой (F) и обратный (R)), реакционную стандартную ПЦР-смесь (PCR-Mix) и амплификатор (“Терцик”).

Амплификация гена ACE *H. sapiens* проводится с использованием праймеров: прямой (F) – 5'-CTGGAGACCACTCCCATCSTTTCT-3', обратный (R) – 5'-ATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'. Реакционная стандартная ПЦР-смесь (PCR-Mix):

10x буфер	2,5 мкл
смесь нуклеотидтрифосфатов (dNTP)	2,5 мкл
Prime Taq-ДНК полимеразы	1 мкл
праймер 1	1 мкл
праймер 2	1 мкл
Вода деионизированная (milliQ)	16 мкл

Общий объем реакционной ПЦР-смеси должен составить 24 мкл.

Далее в пронумерованные реакционные пробирки для амплификации объемом 0,6 мл (Axugen) вносят по 24 мкл смеси. В пробирку с отрицательным контролем добавляют 1 мкл деионизированной воды. Во все остальные пробирки вносят по 1 мкл образца ДНК. Тщательно перемешивают пипетированием, затем наслаивают по одной капле (20-25 мкл) минерального масла для ПЦР и закрывают пробирки. После чего, центрифугируют 5 сек при 3 тыс. об/мин и помещают в амплификатор (“Терцик”). Температурные режимы ПЦР для гена ACE:

1 цикл	94 ⁰ С5 мин
30 циклов	94 ⁰ С60 сек
	62 ⁰ С60 сек
	72 ⁰ С60 сек
1 цикл	72 ⁰ С5 мин

Амплификация внутреннего спейсера ITS₂ *Opisthorchis felineus* проводится с использованием праймеров: прямой (F) – 5'-GAACATCGACATCTTGAACG-3', обратный (R) – 5'-TGGTGTTCAGGTCGT-TCC-3', реакционной стандартной ПЦР-смеси (PCR-Mix). Общий объем реакционной ПЦР-смеси должен составить 24мкл.

Далее в пронумерованные реакционные пробирки для амплификации объемом 0,6 мл (Ахуген) вносят по 24 мкл смеси. В пробирку с отрицательным контролем добавляют 1 мкл деионизированной воды. Во все остальные пробирки вносят по 1 мкл образца ДНК. Тщательно перемешивают пипетированием, затем центрифугируют 1 мин. при 5тыс. об./мин. После, наслаивают по одной капле (20-25 мкл) минерального масла для ПЦР и закрывают пробирки. После чего, центрифугируют 5 сек при 3 тыс. об./мин и помещают в амплификатор (“Терцик”). Температурные режимы ПЦР для внутреннего спейсера 2:

1 цикл	94 ⁰ С3 мин
30 циклов	94 ⁰ С45 сек
	60 ⁰ С30 сек
	72 ⁰ С60 сек
1 цикл	72 ⁰ С5 мин

После амплификации полученный раствор с множественными копиями выделенного гена сохраняют в морозильной камере ($t \approx -20^{\circ}\text{C}$).

2. Ключевые слова и понятия

амплификация полимеразная цепная реакция (ПЦР) “Терцик” инсерционно-делеционный полиморфизм	16 интрон ген ACE человека внутренний спейсер 2 кошачья двуустка
--	---

3. Лабораторная работа

Задание 1. Из криопробирок взять раствор, содержащий выделенную ДНК.

Задание 2. Провести амплификацию: а) гена ACE, б) внутреннего спейсера 2 (ITS₂).

Задание 3. Задачи 3.1- 3.6:

3.1. У эукариотических организмов рибосомальные гены представлены в виде **кластеров**, расположенных группами на разных хромосомах. В каждый кластер входит три – 18S, 5,8S и 28S **рибосомальных** гена, разделенных участками – так называемыми **спейсерами** (рис.3). Весь кластер

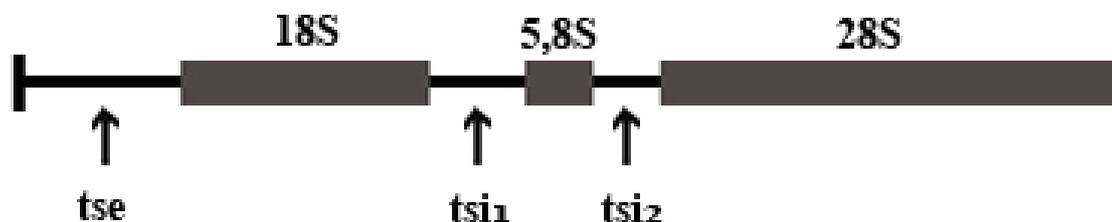


рис. 3 -Схема строения рибосомального кластера: tse – внешний спейсер и tsi – внутренние спейсеры.

содержит около 13000 нуклеотидных пар. Имеется два внутренних спейсера tsi₁ и tsi₂, а также один внешний – tse. Ученые с успехом используют рибосомальные гены для видовой диагностики, поскольку спейсерные участки очень изменчивы по длине и нуклеотидному составу.

При диагностике описторхоза - заболевания человека и животных, вызываемых кошачьей двуусткой (*Opisthorchis felineus*) в качестве маркера часто используется второй внутренний спейсер (tsi₂), размером около 300 н.п.

Последовательность нуклеотидов ДНК спейсерного участка tsi₂ (выделен черным) и 38 нуклеотидов прилегающих 5,8 и 28S рибосомальных генов у *O. felineus* представлена ниже (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank ID: EF688132.1).

```

1 5' ccacgcctgt ccgagggctcg gcttataaac tatcacgacg ccaaaaaagt cgtggccttg
61  gtcttgccag ctggcatgat ttccccacgc atttgtgtgg ggtgcccgat ctatggcttt
121  tccccaatgt gccggacgca accatgtctg ggctgactgc ctggatgagg gggtgccggc
181  ggagtcgtgg ctcaattggt gttgttattg ttgtgaatgt gcgcgctccg ttgttggtcc
241  tttgtctttg gttgaggctc cagtgggtgc aatgcattcg atgcaaatct gttttgcact
301  tcggtgctta acttttctga cctcggatc 3'

```

Постройте комплементарную цепочку 3'-5' и найдите в ней участок которому будет комплементарен прямой праймер (F) следующего состава: 5'-CGAGGGTCGGCTTATAAAC-3'.

3.2. Используя из предыдущей задачи 3.1 приведенную последовательность 5'-3' спейсерного участка tsi₂ и нуклеотидов прилегающих районов у *O. felineus* найдите в ней участок, которому будет ком-

плементарен обратный праймер (R) из 20 нуклеотидов следующего состава: 5'-AGCCTC-ААССАААGАСАААG-3'.

3.3. Последовательность нуклеотидов участка tsi_2 (выделен черным) и 38 нуклеотидов прилегающих 5,8 и 28S генов у *O. felineus* представлена ниже.

```

1 5' ccaagcctgt ccgagggtcg gcttataaac tatcaagacg cccaaaaagt cgtggcttgg
61  gtcttgccag ctggcatgat ttccccacgc atttgtgtgg ggtgocggat ctatggcttt
121  tccccaatgt gccggacgca accatgtctg ggctgactgc ctggatgagg ggggtggcggc
181  ggagtcgtgg ctcaattgtt gttgttattg ttgtgaatgt gcgcgctccg ttgttggtcc
241  tttgtctttg gttgagggtc cagtgggtggc aatgcattcg atgcaaatct gttttgcact
301  tcggtgctta acttttctga cctcggatc 3'

```

Какова будет длина амплифицированного фрагмента ДНК, если используемые праймеры для амплификации (по Muller *et al.*, 2007), имеют следующий состав: прямой (F) 5'-CGAGGGTCGGCTTATAAAC-3' и обратный (R) 5'-AGCCTCAACSSAAAGACAAAG-3'.

3.4. Молекулярные генетики в Новосибирском Академгородке используют для амплификации спейсерного участка tsi_2 у *O. felineus* праймеры другого состава.

Ниже приведена последовательность спейсерного участка tsi_2 (выделен черным) и 89 нуклеотидов прилегающих 5,8 и 28S рибосомальных генов у *O. felineus*.

```

1 5' atattgcggc catggggttg cctgtggcca cgctgtccg agggtcggct tataaactat
61  cacgacgccc aaaaagtcgt ggcttgggtc ttgccagctg gcatgatttc cccacgcatt
121  tgtgtggggg gccggatcta tggcttttcc ccaatgtgcc ggacgcaacc atgtctgggc
181  tgactgcctg gatgaggggg tggcggcgga gtcgtggctc aattgttgtt gttattgttg
241  tgaatgtgcg cgctccgttg ttggtccttt gtctttgggt gaggetccag tggtggaat
301  gcattcgatg caaatctgtt ttgcacttcg gtgcttaact ttctgacct cggatcagac
361  gtgattaccc gctgaattt 3'

```

Постройте комплементарную цепочку 3'-5' и найдите в ней участок которому будет комплементарен прямой праймер (F) следующего состава: 5'-CATGGGTTTGCCTGTGG-3'.

3.5. Используя из предыдущей задачи 3.4 приведенную последовательность 5'-3' спейсерного участка tsi_2 и нуклеотидов прилегающих районов ДНК у *O. felineus* найдите в ней участок, которому будет комплементарен обратный праймер (R) следующего состава: 5'-TCAGCGGG-ТААТCАСGTCT-3'.

3.6. Новосибирские генетики используют для амплификации спейсерного участка tsi_2 у *O. felineus* праймеры следующего состава: (F) прямой 5'-CATGGGTTTGCCTGTGG-3' и (R) обратный 5'-TCAGCGGGTAAT-CACGTCT-3' (по Катохину и др., 2008).

Последовательность спейсерного участка tsi_2 (выделен черным) и 89 нуклеотидов прилегающих 5,8 и 28S рибосомальных генов у *O. felineus* приведена ниже.

```

1 5' atattgcggc catgggtttg cctgtggcca cgctgtccg agggtcggct tataaactat
61  cacgacgccc aaaaagtcgt ggcttgggtc ttgccagctg gcatgatttc cccacgcatt
121 tgtgtggggg gccggatcta tggtttttcc ccaatgtgcc ggacgcaacc atgtctgggc
181 tgactgectg gatgaggggg tggcggcgga gtcgtggctc aattgttggt gttattgttg
241 tgaatgtgcg cgctccgttg ttggtccttt gtctttgggt gaggctccag tgggtggcaat
301 gcattcgatg caaatctggt ttgcacttcg gtgcttaact ttctgacct cggatcagac
361 gtgattaccg gctgaattt 3'

```

Какой длины будет амплифицированный фрагмент ДНК в этом случае?

Литература

1. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. – М.: Мир, 1988., ил.
2. **Кочергин Б.Н., Кочергина Н.А.** Задачи по молекулярной биологии и генетике. Мн.: Народная асвета, 1982. – 80 с.
3. **Жимулев И.Ф.** Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
4. **Картель Н.А.** Биоинженерия: методы и возможности. Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
5. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии/ Мазин А.В. и др.** – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
6. **Гончаренко Г.Г.** Основы генетической инженерии. Гомель: ГГУ, 2003. – 118с.
7. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
8. **Льюин Б.** Гены: – Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 544 с., ил.
9. **Modern genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
10. Principles of genetics. Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
11. An introduction to genetic analysis. Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

ЗАНЯТИЕ 4

ТЕМА: Молекулярно-генетическое генотипирование человека по аллелям гена ACE

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться с методами электрофоретического анализа ДНК в агарозном геле на примере инсерционно-делеционного полиморфизма в 16 интроне гена ACE человека

1. Теоретическая часть

При помощи набора ферментов рестрикции исследователи научились получать фрагменты ДНК разных размеров практически из любых видов. В ходе манипуляций с различными фрагментами ДНК часто необходимо определить размер или выделить конкретный участок ДНК из смеси. Оказалось, что фрагменты ДНК легче всего разделять с помощью метода электрофореза в агарозном геле. ДНК, обработанную одной или несколькими рестриктазами, помещают в лунки застывшего агарозного геля, который помещается в специальную камеру для электрофореза (рис. 1). В камере создается электрическое поле, под действием которого фрагменты ДНК начинают пе-

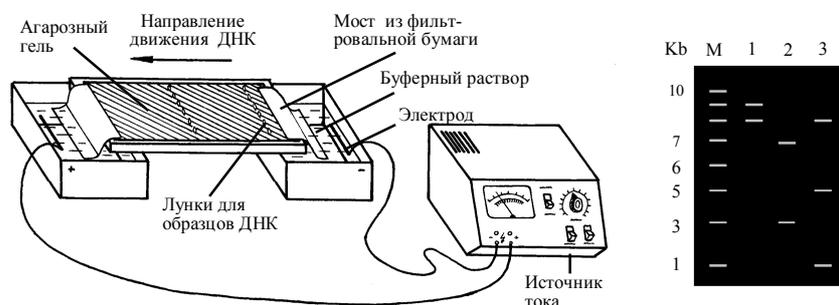


Рис. 1. Схематическое изображение камеры для электрофореза ДНК в агарозном геле. Справа представлена электрофореграмма фрагментов ДНК, окрашенная этидиум бромидом и помещенная под УФ свет. (M – маркеры, 1,2,3 – образцы одной и той же ДНК, разрезанные различными рестриктазами).

ремещаться в пористом, похожем на мармелад геле. **Скорость продвижения** фрагментов ДНК в геле зависит от их длины. Короткие фрагменты движутся быстрее, чем длинные. Это позволяет цепочкам ДНК разной длины отделиться друг от друга. При этом фрагменты ДНК не повреждаются и их можно **выделить из геля** без всяких повреждений и потери биологических свойств.

Если после электрофореза окрасить гель специальным **красителем этидиум бромидом**, связывающимся с ДНК и поместить гель под ультрафиолетовый свет, то на нем будут хорошо видны окрашенные в

красный цвет, расположенные на различном расстоянии друг от друга **светящиеся фракции ДНК**. Каждая такая фракция соответствует одному фрагменту ДНК. Следует подчеркнуть, что разные рестриктазы дают разную картину расщепления одной и той же ДНК (электрофореграмма на рис. 1 справа). Таким образом, электрофорез в агарозном геле позволяет **разделить**, а затем **легко извлечь** любые рестрикционные фрагменты ДНК в чистом виде, для последующего использования. Кроме того, анализируя электрофоретические **спектры ДНК на геле**, наблюдая за исчезновением одних и появлением других фракций под действием разных рестриктаз, исследователи начали составлять **генетические рестрикционные карты** расположения участков ДНК для разных видов.

Электрофорез в агарозном геле используют для визуальной детекции ПЦР.

Приготовление агарозного геля: 2 г агарозы на 100 мл электрофорезного буфера. Состав электрофорезного буфера - Трис-ацетат (ТАЕ) 0,04 М трис-ацетат (50х) : 0,002 М ЭДТА.

Взвесь нагреть на водяной бане или в микроволновке, до тех пор, пока агароза не растворится.

Остудить раствор до 50⁰С и залить в кювету электрофоретической установки, затем вставить гребенку, для образования лунок. После того, как гель полностью затвердеет осторожно удалить гребенку.

Добавить достаточное количество электрофорезного буфера, так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1 мм.

На планшете в отдельные ячейки, по количеству электрофоретических дорожек, добавить 1-2 мкл буфера для нанесения проб с красителем (Blue/Orange 6x Loading Dye). 10 мкл амплифицированной пробы (после ПЦР) перемешиваем с буфером в ячейке планшета пипетированием. Маркер с участками ДНК определенного размера 1 мкл, таким же образом смешиваем с буфером для нанесения проб.

Далее электрофоретическая камера подключается к универсальному источнику питания и проводится электрофорез в течении 80 минут, параметры электрического тока в УИП «Эльф»: 110 В, 80 Вт, 400 мА.

Окраска ДНК. Флюоресцирующий краситель этидиум бромид 50 мкл растворяется в 500 мл воды. В полученный раствор поместить гель и окрашивать в течении 30 минут.

После окраски подсветить гель в УФ-свете с длиной волны 360 нм. Полученный результат сфотографировать.

2. Ключевые слова и понятия

<p>фрагменты ДНК манипуляции с фрагментами ДНК электрофорез в агарозном геле электрофоретическая камера скорость продвижения фрагментов краситель этидиум бромид</p>	<p>светящиеся фракции ДНК идентификация генов и рестрикционных фрагментов ДНК денатурация ДНК ДНК пробы</p>
---	--

3. Лабораторная работа

Задание 1. Провести электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле на примере инсерционно-делеционного полиморфизма в 16 интроне гена ACE человека.

Задание 2. Задачи 4.1- 4.6:

4.1. В 17-й хромосоме человека находится **ген (ACE)**, кодирующий важный белок, который называется **ангиотензин-превращающий фермент** (angiotensin converting enzyme, ACE). Молекулярные генетики проанализировали этот ген и установили полную его нуклеотидную последовательность. Ген ACE имеет величину более 23 тыс. нуклеотидных пар и состоит из 26 экзонов и 25 интронов (рис. 1).

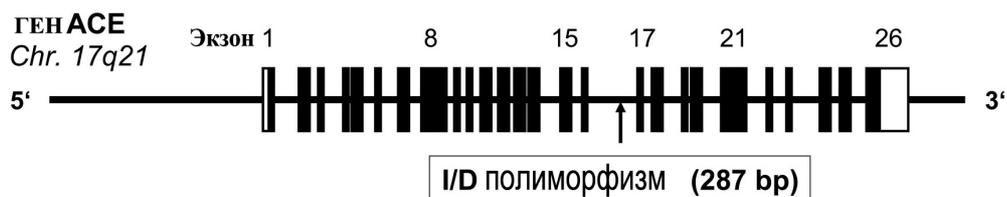


Рис. 1 – Структура гена ангиотензин-конвертирующего фермента (ACE) человека.

Оказалось, что в 16-м интроне гена ACE, который насчитывает более 1800 н.п. встречается делеция (выпадение) фрагмента ДНК величиной 287 н.п. Иными словами, в популяциях человека имеется полиморфизм по гену ACE, который заключается в наличии (I - insertion) или отсутствии (D – deletion) фрагмента длиной 287 пар нуклеотидов в интроне 16.

Ученые, с помощью метода ПЦР-анализа научились амплифицировать фрагмент ДНК из 16-го интрона величиной около 0,5 кб, в котором локализована делеция. При электрофорезе в агарозном геле фрагменты ДНК в которых не произошло делеции (I) и с делецией (D) легко отделяются друг от друга. Ниже представлен электрофоретический спектр фрагментов ДНК этого участка у 6 человек (рис. 2). Определите генотипы этих людей по двум аллелям I и D гена ACE.

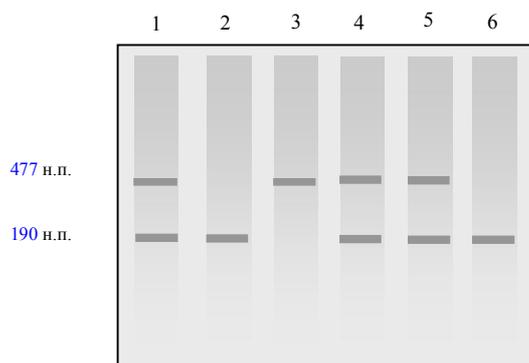
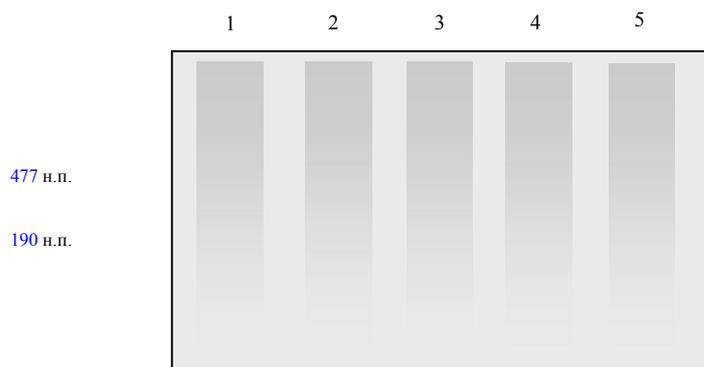
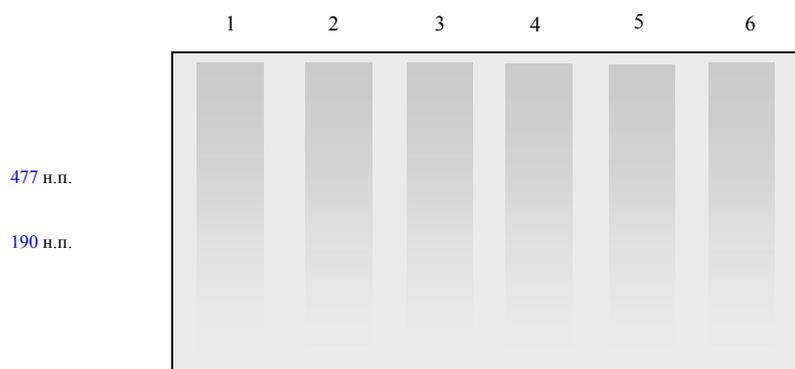


Рис. 2 – Электрофореграмма спектра ДНК-фрагментов из 16-го интрона у 6 представителей европейской расы.

4.2. При анализе полиморфизма по аллелям I и D гена ACE у спортсменов-ребцов высокого класса были обнаружены следующие генотипы: 1-3 – I/D, 4 – I/I, 5 – I/D. Изобразите схематически на электрофореграмме спектры фрагментов ДНК у этих спортсменов.



4.3. У спортсменов штангистов уровня мастеров спорта и выше был проанализирован полиморфизм по гену ACE. Изобразите схематически на электрофореграмме спектры фрагментов ДНК у шести спортсменов, если их генотипы по аллелям I и D были следующими: 1,2 – D/D, 3,4 – I/D, 5,6 – D/D.



4.4. В 16-м интроне гена ACE человека содержится 1857 нуклеотидных пар. Участок делеции состоящий из 287 н.п. находится во фрагменте от 1451 до 1738 нуклеотида. Ниже приведена последовательность нуклеотидов ДНК 16-го интрона от 1321 до 1857 нуклеотида. Участок делеции выделен черным (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank ID:X62855.1, NG_011648.1).

```

1321 5'tcaagcacgc cctcacagg actgctgagg cctgcaggt gtctgcagca tgtgccagg
1381 cgggggactc tgtaagccac tgctggagac cactcccatc ctttctcca tttctctaga
1441 cctgctgcct atacagtcac tttttttttt tttttgagac ggagtctcgc tctgtcgccc
1501 aggctggagt gcagtggcgg gatctcggct cactgcaacg tccgcctccc gggttcacgc
1561 cattctcctg cctcagcctc ccaagtagct gggaccacag cgcccgccac tacgcccggc
1621 taattttttg tatttttagt agagacgggg tttcaccggt ttagccggga tggctcgcgat
1681 ctcctgacct cgtgatccgc ccgcctcggc ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgat
1741 acagtcactt ttatgtggtt tcgccaattt tattccagct ctgaaattct ctgagctccc
1801 cttacaagca gaggtgagct aagggctgga gctcaagcca ttcaaccccc taccag3'

```

Какой будет состав **прямого праймера** (F-forward), размером в 24 нуклеотида (комплементарного цепочке 3'–5'), если мы хотим, чтобы вместе с участком делеции был амплифицирован и предшествующий фрагмент интрона, величиной 48 нуклеотидов.

4.5. Прямой праймер (F) для амплификации интрона 16, содержащего делецию размером 287 н.п. имеет следующую последовательность: 5'-СТGGAGАССАСТСССАТССТТТСТ-3'.

Какой будет состав **обратного праймера** (R-reverse), содержащего 24 нуклеотида (комплементарного цепочке 5'–3'), если мы хотим амплифицировать участок ДНК, размером 477 н.п., содержащий делецию, остаток 16-го интрона и 24 нуклеотида начальной части прилегающего экзона 17. Последовательность нуклеотидов ДНК 16-го интрона от 1381 до 1857 нуклеотида, а также первые 113 нуклеотидов экзона 17 приведены ниже.

```

1381 5'ccgggggactc tgtaagccac tgctggagac cactcccatc ctttctcca tttctctaga
1441 cctgctgcct atacagtcac tttttttttt tttttgagac ggagtctcgc tctgtcgccc
1501 aggctggagt gcagtggcgg gatctcggct cactgcaacg tccgcctccc gggttcacgc

```

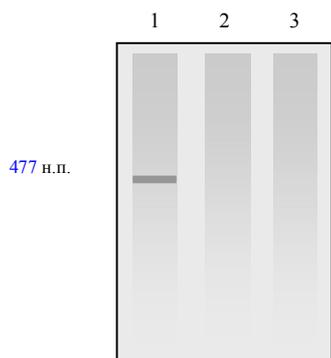
```

1561 cattctcctg cctcagcctc ccaagtagct gggaccacag cgcccgccac tacgcccggc
1621 taatTTTTTg tatttttagt agagacgggg tttcaccggt ttagccggga tggctcggat
1681 ctctgacct cgtgatecgc ccgcctcggc ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgat
1741 acagtcactt ttatgtgggt tcgccaattt tattccagct ctgaaattct ctgagctccc
1801 cttacaagca gaggtgagct aagggctgga gctcaagcca ttcaaccccc taccag3'
17 экзон
1      5'atc tgacgaatgt gatggccacg tcccggaaat atgaagacct gttatgggca
61     tgggagggct ggcgagacaa ggcgggggaga gccatcctcc agttttaccc gaaatacgtg3'

```

4.6. Приведите последовательность нуклеотидов в цепочке ДНК 16-го интрона гена ACE, величиной 190 н.п. (без участка делеции) после амплификации участка с праймерами следующего состава: прямой (F) – 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCCTTTCT-3', обратный (R) – 5'-ATGTGGCCATCACATTC-GTCAGAT-3'.

4.7. Делеция D в 16-м интроне гена ACE относится к классу Alu-повторов – фрагментов ДНК величиной около 300 н.п., которые могут повторяться в геноме более 100 раз. В каждом повторе есть сайт AGCT, который может разрезаться рестриктазой AluI. Если провести амплификацию фрагмента ДНК 16-го интрона (с участком делеции) используя праймеры следующего состава: прямой (F) – 5'-CTGGAGACCACTCCCATCC-ТТТСТ-3', обратный (R) – 5'-ATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3' и разрезать полученный фрагмент рестриктазой AluI, то какой величины будут разрезанные фрагменты и, как будет выглядеть их электрофоретический спектр в агарозном геле на дорожках 2 и 3? На дорожке 1 приведен спектр неразрезанного фрагмента полученного после амплификации.



Литература

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. - М.: Мир, 1988. , ил.

2. **Жимулев И.Ф.** Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
3. **Картель Н.А.** Биоинженерия: методы и возможности.- Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
4. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии/** Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
5. **Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г.** Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002. – 114с.
6. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986.- 186 с.: ил.
7. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
8. **Щелкунов С.Н.** Конструирование гибридных молекул ДНК.- Новосибирск: Наука, 1987.- 168 с.
9. **Льюин Б.** Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
10. **Modern genetic analysis/** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
11. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
12. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.