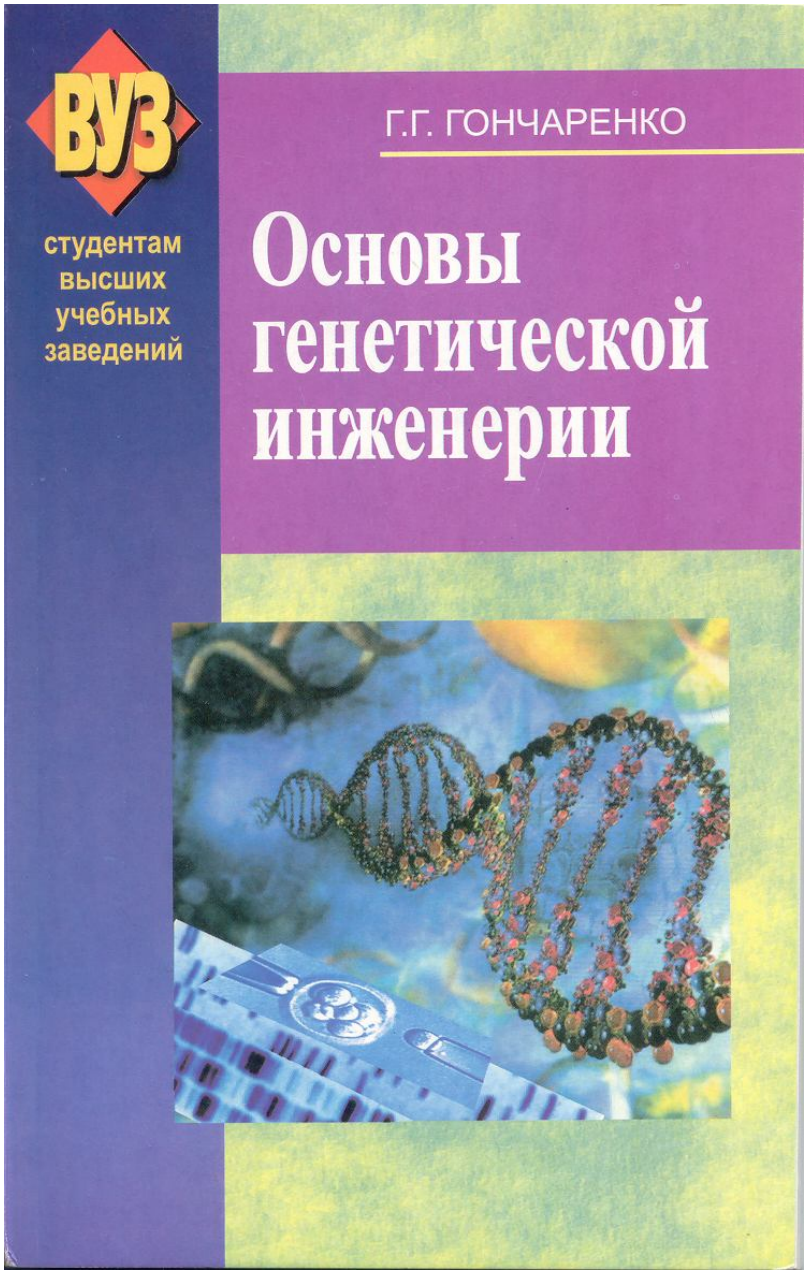


Г.Г. ГОНЧАРЕНКО

Основы генетической инженерии

Допущено
Министерством образования Республики Беларусь
в качестве учебного пособия для студентов
биологических специальностей учреждений,
обеспечивающих получение высшего образования

Минск
"Вышэйшая школа"
2005

УДК 575(075.8)
ББК 28.04я73
Г65

Научный редактор – академик НАН Беларуси *Л.В. Хотылева*

Рецензенты: кафедра молекулярной биологии БГУ, Минск; кафедра биотехнологии и экологии БГСХА, Горки; член-корреспондент РАН, профессор *Л.И. Корочкин*; академик НАН Беларуси *Н.А. Картель*

Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или любой ее части не может быть осуществлено без разрешения издательства.

Гончаренко, Г.Г.

Г65 Основы генетической инженерии: учеб. пособие / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.
ISBN 985-06-1154-5.

Пособие включает семь тем. Каждая тема состоит из теоретического блока и практической части. В теоретической части излагаются методы и технологии современных генно-инженерных экспериментов, приводятся ключевые слова и понятия.

Практическая часть состоит из примеров решения задач, задач для самоконтроля и задач повышенной сложности. Каждая тема содержит литературные источники. В конце пособия имеются тесты для самопроверки, ответы на задачи повышенной сложности, приложение, в которое входит глоссарий терминов и молекулярно-генетическая характеристика наследственных заболеваний.

Предназначено студентам специальностей биология, генетика, молекулярная биология и биотехнология, аспирантам, преподавателям, а также тем, кто интересуется вопросами генетики.

УДК 575(075.8)
ББК 28.04я73

ISBN 985-06-1154-5

© Гончаренко Г.Г., 2005
© Издательство «Вышэйшая школа», 2005

Учебное издание

Гончаренко Григорий Григорьевич

ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Учебное пособие

Редактор *Н.А. Гришакова*
Художественный редактор *В.А. Ярошевич*
Технический редактор *Н.А. Лебедевич*
Корректор *Е.З. Липень*
Компьютерная верстка *Н.В. Шабуни, М.В. Бригер*

Подписано в печать 18.10. 2005. Формат 84×108/32. Бумага офсетная. Гарнитура "Школьная". Офсетная печать. Усл. печ. л. 9,66. Уч.-изд. л. 8,67. Тираж 2000 экз. Заказ 3020.

Республиканское унитарное предприятие «Издательство "Вышэйшая школа"». ЛИ № 02330/0056829 от 02.03.2004. 220048, Минск, проспект Победителей, 11.

Республиканское унитарное предприятие «Типография "Победа"». 222310, Молодечно, ул. Тавлая, 11.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие …….…….…….…

Друзьям по университету,
посвятившим свою жизнь генетике

ПРЕДИСЛОВИЕ

Предлагаемое учебное пособие к общему курсу «Основы генетической инженерии и биотехнологии», который преподается студентам биологических факультетов, ставит своей целью облегчить студентам усвоение современного материала по этому, интенсивно развивающемуся предмету. Данное пособие предназначено как для использования во время проведения лекционных и практических занятий, так и для самостоятельной подготовки студентов.

Учебное пособие включает 7 четырехчасовых занятий. В начале каждого занятия развернуто ставится цель. Занятие начинается с соответствующей теоретической части, в которой последовательно, по мере усложнения, излагается материал, включающий знакомство с методами и технологиями, использующимися для проведения современных генно-инженерных экспериментов, даются определения современных молекулярно-генетических терминов, которые способствуют усвоению данной темы. Для более глубокого усвоения материала приводятся задачи с подробными решениями. Практическая часть каждого занятия состоит из специализированных задач разного уровня сложности. Отдельным блоком даются задачи повышенной сложности. В конце занятия приводятся литературные источники, из которых студенты могут почерпнуть дополнительные сведения по изучаемой теме. В заключительную часть пособия включены разработанные тесты для самопроверки усвоенных знаний и подробный глоссарий.

При подготовке учебного пособия автор использовал соответствующие издания по генной инженерии, молекулярной биологии и биотехнологии: Баев А.А. Генетическая инженерия. Москва. Знание, 1986; Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды: М.: Мир, 1987; Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986; Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. – М.: Мир, 1988; Льюин Б. Гены: – Пер. с англ. – М.: Мир, 1987; Картель Н.А. Биоинженерия: методы и возможности. Мн.: Ураджай, 1989; Картель Н.А. и др. Генетика. Энциклопедический словарь. Мн.: Тэхналогія, 1999; Кочергин Б.Н., Кочергина Н.А. Задачи по молекулярной биологии и генетике. Мн.: Народная асвета, 1982; Методы молекулярной генетики и генной инженерии/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука, 1990; Соколовская Б.Х. Сто задач по генетике и молекулярной биологии. – Новосибирск: Наука, 1971; Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика: Учебное пособие. – Новосибирск: Издат. Новосиб. универ., 2002; Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г. Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002; Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии: Учебное пособие. – Мн.: Выш. шк., 1986; Щелкунов С.Н. Конструирование гибридных молекул ДНК. – Новосибирск: Наука, 1987; Modern genetic analysis/ Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999; Principles of genetics/ Snustad P., Simmons M. Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999; An introduction to genetic analysis/ Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. Следует отметить, что литература по генетической инженерии и биотехнологии в настоящее время издается малыми тиражами и труднодоступна.

Данное учебное пособие формировалось постепенно в процессе проведения занятий по соответствующим генетическим курсам для студентов биофака ГГУ с 1999 по 2003г. Работе над пособием также способствовали благоприятные и многолетние контакты с коллегами молекулярными генетиками Беларуси и России. Существенным стимулом для издания учебного пособия послужил интерес, проявленный студентами для которых читались эти курсы. Их ответы на экзаменах, конструктивные вопросы и замечания в ходе практических занятий позволили постоянно улучшать учебный материал по таким бурно развивающимся современным дисциплинам как генетическая инженерия и биотехнология.

В заключении следует сказать, что учебному пособию была дана благосклонная оценка рядом ведущих отечественных и зарубежных генетиков. В связи с этим автор считает своим приятным долгом выразить признательность Л.В. Хотылевой, Н.А. Картелю, О.Г. Давыденко, И.Д. Волотовскому, В.Н. Решетникову и А.В. Кильчевскому (Беларусь), Н.П. Дубинину, Л.И. Корочкину (Россия), а также В.Х. Викслеру (Германия), Ю.И. Лобкову, В.Х. Рошке, М.З. Людвигу, В.В. Кокозе (США) и В. Наглю (Австрия) за поддержку и ряд полезных советов и предложений, направленных на улучшение данного учебного пособия. Особая благодарность аспирантам гомельского университета Александру Суркову и Сергею Никоновичу, которые оказывали плодотворное содействие на многих этапах работы над учебным пособием.

Член-корр. НАН Б, профессор Г.Г. Гончаренко

ВВЕДЕНИЕ

В 40-е и особенно 50-е годы прошлого столетия в биологию пришли методы точных наук: химии, физики, математики, Стало возможным исследовать жизнь на молекулярном уровне, результатом чего стали замечательные открытия. Самое яркое из них – установление факта, что материальным носителем генетической информации в клетке является ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота). Это открытие стало основой зарождения и бурного развития в начале 50-х годов **молекулярной биологии** и **молекулярной генетики**. Успехи этих наук предопределили возникновение и развитие **генетической инженерии**. Благодаря достижениям **генетической инженерии** и биотехнологии стали успешно решаться вопросы производства продуктов питания за счет создания высокопродуктивных трансгенных штаммов, сортов растений и пород сельскохозяйственных животных, начато успешное лечение наследственных заболеваний на генном уровне, а также конструктивно разрабатываются вопросы управления генофондами популяций наиболее ценных животных и растений.

Что же такое **генетическая инженерия**? Когда и как она возникла и что из себя представляет?

Генетическая инженерия – это конструирование искусственным путем функционально активных генетических структур и наследственно измененных организмов. Другими словами, сущность генетической инженерии состоит в ***целенаправленном конструировании особых гибридных молекул вне организма*** (как принято говорить *in vitro*, "в пробирке") ***с последующим их введением в живой организм.*** При этом гибридные молекулы (рекомбинантные ДНК) становятся составной частью генетического аппарата данного организма. В результате наследственная программа организма изменяется, ему сообщаются новые генетические, а следовательно, биохимические и физиологические свойства. Таким образом, **цель генетической инженерии** – создание рекомбинантных ДНК, которые придали бы организму новые, полезные для человека свойства.

Генетическая инженерия впитала в себя достижения целого ряда биологических дисциплин. Ее корни: биохимия, генетика, цитология, эмбриология, вирусология, молекулярная биология и молекулярная генетика.

Термин "генетическая инженерия" появился в научной литературе где-то **около 1970 г**., а генетическая инженерия как **самостоятельная дисциплина** возникла в **декабре 1972** г., когда ученые Джексон, Симонс и Берг из Стенфордского университета (США) опубликовали работу о создании искусственным путем первой рекомбинантной (гибридной) молекулы ДНК. Эта молекула состояла из фрагментов ДНК, взятых у вируса sv-40, бактериофага λ, бактерии кишечная палочка *E. coli*.

Ключевые слова и понятия

молекулярная биология **молекулярная генетика** **генетическая инженерия** **искусственные** **генетические структуры** **наследственно** **измененные организмы** **конструирование** **гибридных молекул**	***in vitro*, "в пробирке"** **создание рекомбинантных ДНК** **первая рекомбинантная (гибридная)** **молекула ДНК** **вирус sv-40** **бактериофаг λ** **кишечная палочка** ***E. coli***

Литература

1. **Баев А.А.** Генетическая инженерия. Москва. Знание. 1986. – 82 с.
2. **Сассон А.** Биотехнология: свершения и надежды: М.: Мир, 1987 – 411 с.
3. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
4. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности. Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с.
5. **Льюин Б.** Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
6. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986.- 186 с.: ил.
7. **Modern genetic analysis/** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
8. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
9. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

ТЕМА 1
Основы молекулярной генетики

<u>ЦЕЛЬ:</u> Ознакомиться с составом ДНК и РНК, процессами репликации, транскрипции, трансляции и на примере решения типовых задач закрепить усвоенный материал

1.1. Теоретическая часть

Молекулярная генетика исследует процессы, связанные с наследственностью на молекулярном уровне. Единицей генетической или наследственной информации является ген. **Ген** – это участок молекулы **дезоксирибонуклеиновой кислоты** (**ДНК**), несущей информацию об одной полипептидной цепи.

Особенности того или иного организма определяются специфичностью его белков. Именно они влияют на обмен веществ, жизнедеятельность и отдельные функции организма, такие, как развитие, восприятие внешних сигналов, движение и т.п. С молекулярной точки зрения белки реализуют все разнообразие генетической информации, именно они и наследуются. Белки состоят из **аминокислот**, которые соединены между собой **пептидной связью**. В **состав белков** входит **20 различных аминокислот**. Информация о структуре каждого белка записана и хранится в молекуле ДНК.

Молекула ДНК – полимер, состоящий из двух цепочек **нуклеотидов**. Каждый нуклеотид состоит из **азотистого основания**, моносахарида **дезоксиорибозы** и **остатка фосфорной кислоты**. Азотистые основания в ДНК бывают четырёх типов: **аденин (А), тимин (Т), гуанин (Г) и цитозин (Ц).** Вдоль нити ДНК азотистые основания прочно связаны между собой через моносахарид и остаток фосфорной кислоты (рис. 1.1.), между цепочками – через водородные связи. В общей схеме ДНК напоминает лестницу.

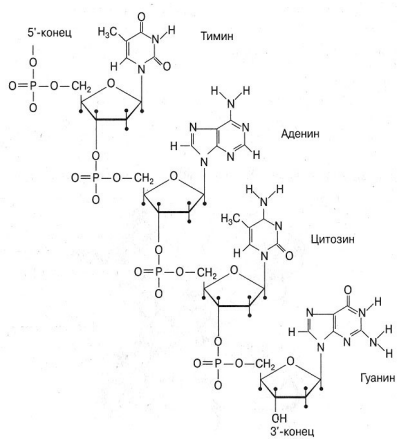


Рис. 1.1. Строение одной цепочки ДНК

Вся «лестница» ДНК закручена в спираль (рис. 1.2.). Между двумя цепочками азотистые основания располагаются закономерно: аденин всегда против тимина, гуанин – против цитозина. Иными словами, аденин **комплементарен** тимину, цитозину.

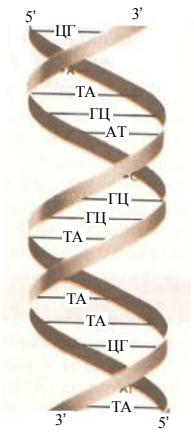


Рис. 1.2. Модель двухцепочечной структуры ДНК по Уотсону и Крику

Молекулы ДНК обладают способностью к удвоению (**репликации**). В основе процесса удвоения лежит **принцип комплементарности**. Количественное соотношение нуклеотидов в молекуле ДНК известны в виде **правил Чаргаффа**:

1. ΣА = ΣТ или ΣА / ΣТ = 1
2. ΣГ = ΣЦ или ΣГ / ΣЦ = 1
3. Σ(А + Г) = Σ(Т + Ц) или Σ(А + Г) / Σ(Т + Ц) = 1
4. Количество комплементарных оснований А + Т и Г + Ц у разных видов живых организмов различно. Отношение Σ(Г + Ц) / Σ(А + Т) является важнейшей характеристикой ДНК, как показатель спецефичности её нуклеотидного состава.

Коэффициент специфичности у **ДНК** варьирует от 0,45 до 2,57 у микроорганизмов, от 0,58 до 0,94 у высших растений и от 0,54 до 0,81 у животных.

Информация о расположении аминокислот в молекуле белка записана и хранится в ДНК в виде определённой последовательности нуклеотидов. Считывание информации с ДНК осуществляется с помощью **рибонуклеиновых кислот** (**РНК**). Процесс расшифровки начинается с синтеза **информационной РНК** (**и-РНК**). Информационная РНК – полимер, состоящий из одной цепочки нуклеотидов. В состав нуклеотидов также входят азотистые основания, моносахарид рибоза и остаток фосфорной кислоты. Азотистых оснований в РНК также четыре: аденин, **урацил (У)**, гуанин, цитозин.

Информационная РНК по принципу комплементарности снимает информацию с ДНК. Этот процесс называется **транскрипцией**. Важно подчеркнуть, что и-РНК транскрибируется всегда только с одной цепочки ДНК в направлении от 3' к 5' концу (рис 1.3.).

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

направление транскрипции

и-РНК 5'– У – Г – Г – У –А – У –3'

Рис. 1.3. Схема строения ДНК и транскрипции и-РНК.

Следующий этап расшифровки генетической информации происходит на **рибосомах (полисомах)**, где осуществляется синтез полипептидной цепи белков по матрице и-РНК. Этот процесс называется **трансляцией**. В нем кроме и-РНК также участвуют **транспортные РНК** (**т-РНК**), функция которых состоит в том, чтобы доставить аминокислоты к рибосомам и найти им своё место в полипептидной цепи, предусмотренное кодом.

Следует отметить, что в ходе трансляции считывание генетической информации осуществляется с молекулы и-РНК в направлении от 5' к 3' концу цепочки.

Генетический код в настоящее время расшифрован для всех 20 аминокислот и составлен по и-РНК в виде таблицы 1.1.

Таблица 1.1. Соответствие кодонов и-РНК аминокислотам

Основания кодонов					
перв ое	втор ое	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

Примечание: Сокращенные названия аминокислот даны по международной терминологии. 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.

Генетический код триплетен, т.е. каждую аминокислоту кодируют три рядом стоящие нуклеотида (**кодон**). Триплеты УАА, УАГ и УГА являются **стоп-кодонами**.

Гентический **код вырожден**, т.е. 18 из 20 аминокислот кодируются более чем одним кодоном. Например, каждая из 5 аминокислот - пролин, треонин, валин, аланин и глицин, кодируются четырьмя различными кодонами, а лейцин, аргинин и серин – шестью (табл. 1.1.).

В данной части пособия рассматриваются задачи на знание принципа комплементарности при репликации ДНК и транскрипции и-РНК, на расшифровку структуры белка по известным данным о строении ДНК и РНК а также на расшифровку последовательности нуклеотидов в ДНК и РНК с помощью таблицы кодирования аминокислот (табл. 1.1.). При решении задач по молекулярной генетике необходимо помнить, что в таблице 1.1. приведены кодоны для и-РНК.

1.2. Ключевые слова и понятия

молекулярная генетика	**информационная РНК (и-РНК)**
ген	**транскрипция**
дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)	**рибосома**
	трансляция
молекула ДНК	**транспортная РНК (т-РНК)**
нуклеотид	**генетический код**
репликация	**триплет**
принцип комплементарности	**кодон**
правила Чаргаффа	**стоп-кодон**
рибонуклеиновая кислота (РНК)	**вырожденность кода**

1.3. Примеры решения задач

1.3.1. Участок одной из цепей ДНК имеет следующую последовательность нуклеотидов: 5'–ГААГЦАТАЦ–3' Определите последовательность нуклеотидов во второй цепи.

Решение:

Согласно принципу комплементарности (А–Т, Г–Ц) последовательность нуклеотидов во второй цепи ДНК будет следующей:

5'–Г А А Г Ц А Т А Ц–3' первая цепочка ДНК

3'–Ц Т Т Ц Г Т А Т Г–5' вторая цепочка ДНК.

1.3.2. Укажите последовательность нуклеотидов участка молекулы и-РНК, которая образовалась на участке гена с последовательностью нуклеотидов: 3'–ЦТГГЦТТАГЦЦГ–5'…

Решение:

Образование информационной РНК идет по тому же механизму, что и самокопирование ДНК: к цитозину присоединяется гуанин, к гуанину – цитозин, к тимину – аденин, однако к аденину ДНК присоединяется не тимин, а урацил РНК. Таким образом, для решения задачи достаточно произвести замену нуклеотидов по схеме:

Ц → Г, Г → Ц, А → У, Т → А.

В результате получим:

3'–Ц Т Г Г Ц Т Т А Г Ц Ц Г–5' цепочка ДНК
5'–Г А Ц Ц Г А А У Ц Г Г Ц–3' молекула и-РНК

1.3.3. Фрагмент молекулы ДНК, кодирующий часть полипептида, имеет следующее строение: 3'–АТАГТЦЦААГГА–5'.

Определите последовательность аминокислот в полипептиде.

Решение:

Известна одна цепь ДНК, с которой снимается и-РНК. Строим и-РНК по условиям задачи: 5'–УАУЦАГГУУЦЦУ–3'. Разбиваем ее на триплеты: УАУ, ЦАГ, ГУУ, ЦЦУ. По таблице генетического кода (см. табл. 1.1.) последовательно находим для каждого триплета соответствующую аминокислоту и строим участок искомого полипептида: – тирозин – глутамин – валин – пролин –. Итак:

3'–АТА ГТЦ ЦАА ГГА–5' цепочка ДНК
5'–УАУ ЦАГ ГУУ ЦЦУ–3' триплеты и-РНК
Тир - Глн - Вал - Про - полипептид.

1.3.4. Часть молекулы белка имеет такую последовательность аминокислот: – аланин – тирозин – лейцин – аспарагин –. Какие т-РНК (с какими антикодонами) участвуют в синтезе этого белка?

Решение:

По таблице генетического кода находим кодоны и-РНК: ГЦУ, УАУ, ЦУУ и ААУ. Антикодоны т-РНК будут комплементарны кодонам и-РНК: ЦГА, АУА, ГАА и УУА. Таким образом:

ГЦУ УАУ ЦУУ ААУ кодоны и-РНК
ЦГА, АУА, ГАА, УУА антикодоны т-РНК.

1.3.5. Как изменится структура белка, если из участка гена – АЦАТТТАААГТЦ удалить второй и 10-й слева нуклеотиды?

Решение:

Первоначально строим и-РНК 5'–УГУАААУУУЦАГ–3', а затем, разбив ее на триплеты, строим участок искомого белка в норме: цистеин – лизин – фенилаланин – глутамин. По условиям задачи из цепи ДНК удаляется второй и десятый (слева) нуклеотиды. Остается 3'–ААТТТАААТЦ–5'. По полученному участку строим цепь и-РНК 5'–УУААААУУУАГ–3', вновь разбив ее на триплеты, находим строение участка белка после произошедших изменений в ДНК: лейцин – аспарагин – лейцин.

До замены: 3'–АЦА ТТТ ААА ГТЦ–5' ДНК
5'–УГУ ААА УУУ ЦАГ–3' и-РНК
Цис - Лиз - Фен - Глн - белок

После замены: 3'–ААТ ТТА ААТ Ц–5' ДНК
5'–УУА ААУ УУА Г–3' и-РНК
Лей - Асн - Лей белок

Сравнивая строение участка белка до и после изменений в ДНК, видим, что произошла замена всех аминокислот, а длина цепи сократилась на одну аминокислоту.

1.3.6. Полипептид состоит из следующих аминокислот: лизин – валин – серин – глутаминовая кислота.

Определите структуру участка ДНК, кодирующего указанный полипептид.

Решение:

Дана последовательность аминокислот в полипептиде. По этим сведениям нетрудно установить строение и-РНК, которая управляла синтезом данного полипептида. По таблице генетического кода находим структуру триплета для лизина (ААА), валина (ГУУ), серина (УЦУ) и глутаминовой кислоты (ГАА). Подобрав кодирующие триплеты, составляем и-РНК для данного полипептида: 5'–ААААГУУУЦУГАА–3'. По цепочке и-РНК можно восстановить участок цепи ДНК, с которой она снималась. Урацил вставал против

аденина ДНК, гуанин – против цитозина и т.д. Следовательно, участок интересующей нас цепи ДНК будет иметь следующее строение:

3'–ТТТЦАААГАЦТТ–5'

Но ДНК состоит из двух цепочек. Зная строение одной цепи, по принципу комплементарности достраиваем вторую. Целиком участок двухцепочечной ДНК, кодирующий данный полипептид, будет иметь следующее строение:

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

1.4. Задачи для самоконтроля

1.4.1. Фрагмент одной цепи ДНК имеет следующий состав:

5'–ААТТЦЦГГГ–3'. Достройте вторую цепь.

1.4.2. Одна из цепочек молекулы ДНК имеет такую последовательность нуклеотидов: 5'–ТЦГАТТТАЦГ–3'

Какую последовательность нуклеотидов имеет вторая цепочка той же молекулы?

1.4.3. Укажите порядок нуклеотидов в цепочке ДНК, образующейся путем самокопирования цепочки: 5'–ААТЦГЦТГАТ–3'

1.4.4. Напишите последовательность нуклеотидов ДНК дополнительно к следующей: 5'–ТАГГЦТААТАГЦ–3'.

1.4.5. Участок цепи молекулы ДНК имеет такую последовательность нуклеотидов: 5'–АТЦАТАГЦЦГ–3'. Какое строение будет иметь двухцепочечный участок молекулы ДНК?

1.4.6. Одна из цепей ДНК с последовательностью нуклеотидов 3'–АТТГЦТЦАА–5' используется в качестве матрицы для синтеза и-РНК. Какую последовательность нуклеотидов будет иметь и-РНК?

1.4.7. Выпишите последовательность оснований в и-РНК, образованной на цепи ДНК с такой последовательностью: 3'–ТТЦГАГТАЦЦАТ–5'

1.4.8. Определите последовательность нуклеотидов участка молекулы и-РНК, которая образовалась на участке гена с последовательностью нуклеотидов: 3'–ЦАЦГАТЦЦТТЦТ–5'.

1.4.9. Фрагмент одной из цепей ДНК имеет следующую последовательность нуклеотидов 3'–ААААГАТЦАЦТАТТЦТГТТАЦТА–5'. Напишите строение молекулы и-РНК, образующейся в процессе транскрипции на этом участке молекулы ДНК.

1.4.10. Образовавшийся участок молекулы и-РНК имеет следующий состав кодонов: 5'–ГЦГ-АЦА-УУУ-УЦГ-ЦГУ-АГУ-АГА-АУУ–3'. Определите, какие коды ДНК будут кодировать эту и-РНК и в какой последовательности они будут располагаться?

1.4.11. Определите аминокислотный состав полипептида, который кодируется и-РНК следующего состава: 5'-ЦЦУЦЦЦЦЦАЦЦГ–3'.

1.4.12. Участок молекулы и-РНК имеет следующее строение:

5'–АГУАГАУУЦУУУ–3'

В каком порядке расположатся аминокислоты в соответствующем участке белка, синтезируемого на этой РНК как на матрице?

1.4.13. Участок гена, кодирующего белок, состоит из последовательно расположенных нуклеотидов:3'–ААЦГАЦТАТЦАЦТАТАЦЦААЦГ-АА–5'. Определите состав и последовательность аминокислот в полипептидной цепи, закодированной в этом участке гена.

1.4.14. Участок гена, кодирующего одну из полипептидных цепей гемоглобина состоит из кодов следующего состава: 3'–ГАЦЦАТ- ГАА-5'. Определите состав и последовательность аминокислот в полипептидной цепи.

1.4.15. В систему для искусственного синтеза белка ввели т-РНК, имеющие антикодоны: ЦГА, УУА, АЦА, ЦЦА. Определите, какие аминокислоты смогут участвовать в биосинтезе белка?

1.4.16. Фрагмент молекулы адренокортикотропного гормона человека, вырабатываемого передней долей гипофиза, имеет структуру: – серин – тирозин – серин – метионин –. Определите перечень антикодонов в т-РНК, участвующих в биосинтезе фрагмента АКТГ.

1.4.17. Часть молекулы белка имеет такую последовательность аминокислот: – лизин – треонин – глицин – валин – аргинин –. Какие т-РНК (с какими антикодонами) участвуют в синтезе этого белка?

1.4.18. Участок гена имеет следующее строение: 3'–ЦГЦТЦААА- АТЦГ–5'

Укажите строение соответствующего участка того белка, информация о котором содержится в данном гене. Как отразится на строении белка удаление из гена первого нуклеотида?

1.4.19. Определите порядок следования друг за другом аминокислот в участке молекулы белка, если известно, что он кодируется такой последовательностью нуклеотидов ДНК: 3'–ТГЦГТТТАТГЦГ–5'.

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

1.4.20. Назовите последовательные мономеры участка молекулы белка, который синтезируется на основе информации, "записанной" в молекуле ДНК таким порядком нуклеотидов: 3'–ЦЦЦАААААГАТА–5'.

Как отразится на строении белка удаление из молекулы ДНК второго нуклеотида?

1.4.21. Какая последовательность аминокислот кодируется такой последовательностью нуклеотидов ДНК: 3'–АГТГТГААЦЦАГ–5' и какой станет последовательность аминокислот, если между третьим и четвертым нуклеотидами вставить тимин?

1.4.22. С какой последовательности аминокислот начинается белок, если он закодирован такой последовательностью нуклеотидов:

3'–ЦЦЦАТГГЦЦГГТ–5'.

А каким станет начало цепочки аминокислот синтезируемого белка, если под влиянием облучения четвертый нуклеотид окажется выбитым из молекулы ДНК?

1.4.23. Участок цепи белка вируса табачной мозаики состоит из следующих аминокислот: – серин – глицин – серин – изолейцин – треонин – пролин – серин –. В результате воздействия на и-РНК азотистой кислотой цитозин РНК превращается в гуанин.

Определите изменения в строении белка вируса после воздействия на и-РНК азотистой кислотой.

1.4.24. Какими последовательностями нуклеотидов информационной РНК кодируется следующая последовательность аминокислот белка: – треонин – триптофан – тирозин – валин –?

1.4.25. Используя таблицу генетического кода (см. табл. 1.1.), напишите участок ДНК, в котором закодирована информация о следующей последовательности аминокислот в белке: – аргинин – триптофан – тирозин – гистидин – фенилаланин –.

1.4.26. Начало цепи одного гистона имеет следующую аминокислотную последовательность: – аланин – аргинин – треонин – лизин –. Какова возможная структура начальных фрагментов и-РНК и двухцепочечной ДНК?

1.4.27. Первые 10 аминокислот в цепи В инсулина: фенилаланин – валин – аспарагиновая кислота – глутамин – гистидин – лейцин – цистеин – глицин – серин – гистидин –.

Определите структуру участка ДНК, кодирующего эту часть цепи инсулина.

1.4.28. Начальный участок цепи А инсулина представлен следующими пятью аминокислотами: – глицин – изолейцин – валин – глутамин – глутамин –. Определите структуру участка ДНК, кодирующего эту часть цепи инсулина.

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

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. **Соколовская Б.Х.** Сто задач по генетике и молекулярной биологии. – Новосибирск: Наука, 1971.
4. **Жимулев И.Ф**. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
5. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности. Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
6. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии**/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
7. **Гончаренко Г.Г.** Основы генетической инженерии. Гомель: ГГУ, 2003. – 118с.
8. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
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.

ТЕМА 2

Ферменты рестрикции и получение гибридной ДНК

<u>ЦЕЛЬ</u>: Ознакомиться с ферментами рестрикции и способами получения гибридной ДНК от различных организмов, освоить методы гибридизации ДНК и на примере решения типовых задач закрепить усвоенный материал

2.1. Теоретическая часть

Для того чтобы искусственным путем наделить какой-либо организм новыми наследственными свойствами, нужно ввести в него хотя бы один чужеродный ген. Причем, необходимо приготовить (сконструировать) фрагмент чужеродной ДНК содержащий этот нужный ген.

Осуществляется эта процедура с помощью двух операций "разрезания" и "сшивания". Роль портняжных инструментов играют **ферменты рестриктазы** и **лигазы**.

Рестриктазы (своеобразные молекулярные ножницы), действуя на двухцепочечную ДНК, "узнают" в ней определенную последовательность нуклеотидов. Причем, каждая рестриктаза узнает только свою последовательность ДНК, прикрепляется к ней и разрезает ее в месте прикрепления. Рестриктазам безразлично, чью ДНК разрезать – человека или растения, бактерии или вируса, лишь бы в ней были **распознаваемые участки**. Это значит, что две совершенно несхожих между собой последовательности ДНК (допустим из клеток слона и лягушки) при обработке одной и той же рестриктазой легко можно сшить (слепить) друг с другом.

Обычно рестриктазы распознают в молекулах ДНК очень короткие, но строго специфичные для каждого фермента участки длиной в 4 – 6 пар нуклеотидов и разрезают обе цепи ДНК посередине этих участков или с некоторым смещением. В первом случае образуются обрывки с **ровными (тупыми) концами** (рис. 2.1.), а во втором – стороны разрезаемых цепочек ДНК заходят одна за другую. Такие одноцепочечные концы называются "липкими", поскольку они могут как бы слипаться между собой в силу комплементарности.

Ярким примером рестриктазы второго типа является **EcoRI**, которая узнает фрагмент ДНК из шести нуклеотидов ГААТТЦ, и режет эту последовательность ДНК ассиметрично, «ступенькой» между нуклеотидами Г и А (рис. 2.2.). В результате место разреза в одной цепи смещено по отношению к другой на 4 пары оснований. При таком разрезе образуется два выступающих конца. Эти концы притягиваются друг к другу, желая восстановить свои старые связи и скрепиться, как им и положено, водородными мостиками.

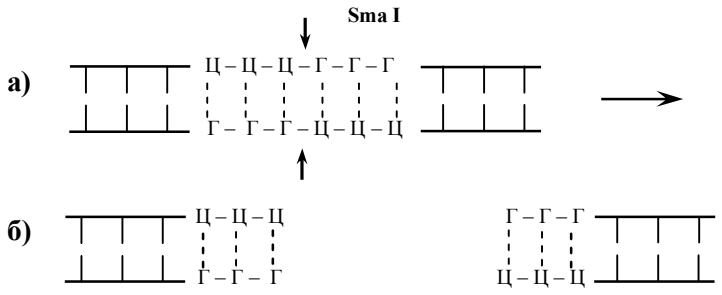


Рис. 2.1. **а)** схема действия фермента рестриктазы Sma I на двухцепочечную молекулу ДНК, с указанием участка распознавания и места разреза; **б)** фрагменты ДНК с тупыми концами после разрезания ферментом SmaI.

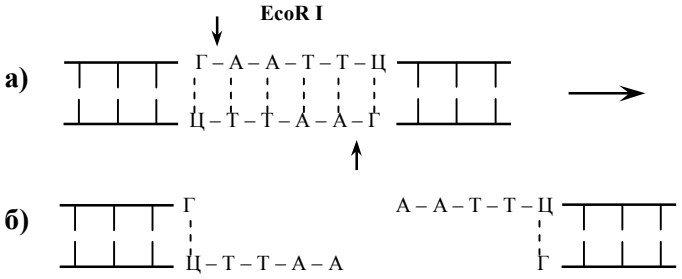


Рис. 2.2. **а)** схема действия фермента рестриктазы EcoR I на двухцепочечную молекулу ДНК, с указанием участка распознавания и места разреза; **б)** фрагменты ДНК с липкими концами после разрезания ферментом EcoR I.

Если с той же EcoR1 получить фрагменты ДНК из различных организмов, то все они будут иметь одинаковые, подходящие друг к другу “**липкие концы**”. Скрепить выступающие липкие концы двух молекул ДНК помогает другой фермент - **ДНК-лигаза**. Он лигирует, то есть “сшивает“ между собой сахарофосфатные остовы двух фрагментов с образованием полной структуры двойной спирали ДНК. Внешне она ничем не отличается от обычной ДНК. Сейчас в арсенале генных инженеров имеется более 500 различных рестриктаз, способных разрезать ДНК примерно в 120 различных местах. Несколько рестриктаз и участки ДНК, которые они могут разрезать, представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1. Некоторые рестриктазы и расщепляемые ими последовательности.

Рестриктазы	Участки распознования и места разреза ДНК
Bam I	5`-Г-Г-А-Т-Ц-Ц-3` 3`-Ц-Ц-Т-А-Г-Г-5`
EcoR I	5`-Г-А-А-Т-Т-Ц-3` 3`-Ц-Т-Т-А-А-Г-5`
Hind III	5`-А-А-Г-Ц-Т-Т-3` 3`-Т-Т-Ц-Г-А-А-5`
Hae III	5`-Г-Г-Ц-Ц-3` 3`-Ц-Ц-Г-Г-5`
Hpa II	5`-Ц-Ц-Г-Г-3` 3`-Г-Г-Ц-Ц-5`
Sma I	5`-Ц-Ц-Ц-Г-Г-Г-3` 3`-Г-Г-Г-Ц-Ц-Ц-5`

С помощью этих и некоторых других ферментов многие исследова-тели начали конструировать и конструируют в настоящее время разнооб-разные по своим составным частям **гибридные (рекомбинантные) ДНК**.

2.2. Ключевые слова и понятия

ферменты рестрикции **рестриктазы** **распознаваемые участки** **сайты рестрикции** **липкие концы** **ровные (тупые) концы**	**EcoRI** **Sma I** **Hind III** **ДНК-лигаза** **гибридные (рекомбинантные) ДНК** **конструирование ДНК**

2.3. Примеры решения задач

2.3.1. Имеется последовательность из 39 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5`-ЦЦТТАГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦАТГ-3`
3`-ГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТАЦ-5`

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

Решение:

В данной последовательности ДНК имеется два участка распознавания: ГААТТЦ для рестриктазы EcoR I и ГГЦЦ для Hae III (см. таблицу 2.1.). Поэтому искомая ДНК может быть разрезана в двух местах с образованием трёх различных фрагментов следующих последовательностей:

1) 5`-ЦЦТТАГГ-
3`-ГГААТЦЦ-

2) -ЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГ-
-ГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТАА-

3) -ААТТЦАЦАТГ-3`
-ГТГТАЦ-5`

2.3.2. Рестрикционный фермент Hind III разрезает ДНК по последовательности ААГЦТТ. Насколько часто этот фермент будет разрезать двухцепочечную ДНК? (Иными словами, какова средняя длина фрагментов разрезанной ДНК?).

Решение:

Нам необходимо рассмотреть только одну цепочку ДНК, поскольку обе цепочки имеют одинаковые, симметричные последовательности, хотя и разнонаправленные. Частота встречаемости фрагмента из 6 нуклеотидных пар для Hind III составит $(1/4)^6 = 1/4096$, так как вероятность для одного нуклеотида (допустим А) занять конкретное место в цепочке ДНК составляет ¼, а таких мест имеется 6. Следовательно, среднее расстояние между участками разрезания рестриктазой Hind III составит около 4 тысяч нуклеотидных пар (4 тысячи баз или 4 килобазы).

2.3.3. Гаплоидный геном человека содержит около 3×10^9 нуклеотидных пар (н.п.) ДНК. Если вы порежете человеческую ДНК рестикционным ферментом EcoRI, узнающим гексамерную последовательность ГААТТЦ, то сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

Решение:

Исходя из предположения, что четыре нуклеотида А, Т, Г, Ц находятся в равных количествах и распределяются в ДНК случайным образом, вероятность для любого из четырех нуклеотидов занять конкретное место в цепочке составляет ¼. Вероятность для двух нуклеотидов (например, АГ) занять конкретное место составит $¼ \times ¼ = (1/4)^2$, а

вероятность для специфической гексамерной последовательности будет равна $(1/4)^6$ = 1/4096. Следовательно, EcoRI будет разрезать молекулу человеческой ДНК в среднем один раз на 4096 нуклеотидных пар. Если молекула ДНК разрежется n раз, то в результате получается n+1 фрагмент. Гаплоидный геном из 3×10^9 нуклеотидных пар содержит около 732 422 ($3 \times 10^9/4096$) мест разреза для рестриктазы EcoRI. Если бы полный геном человеческой ДНК состоял из одной молекулы, то EcoRI могла бы разрезать его на 732 422 + 1 фрагмент. Но поскольку места разрезания распределены по 23 хромосомам, то в результате полного расщепления человеческой ДНК рестриктазой EcoRI должно получится 732422 + 23 рестрикционных фрагмента.

2.3.4. Ниже приведены последовательности двух фрагментов ДНК, выделенных из организмов разных видов.

1) 5`-АГЦАТАЦТГТГААТТЦАЦА-3` 2) 5`-АТГААТТЦТТАГЦАТАЦ-3`
3`-ТЦГТАТГАЦАЦТТААГТГТ-5` 3`-ТАЦТТААГААТЦГТАТГ-5`

С помощью каких ферментов можно получить гибридную молекулу ДНК из этих фрагментов? Опишите последовательные этапы получения гибридной молекулы.

Решение:

На первом этапе необходимо разрезать представленные фрагменты ДНК разных видов с помощью подходящих рестрикционных ферментов. В данном случае можно использовать рестриктазу EcoRI, которая расщепит ДНК двух видов на четыре новых фрагмента 1а, 1б и 2а, 2б с липкими концами ААТТ и ТТАА:

1а) 5`-АГЦАТАЦТГТГ  1б) ААТТЦАЦА-3`
3`-ТЦГТАТГАЦАЦТТАА  ГТГТ-5`

2а) 5`-АТГ  2б) ААТТЦТТАГЦАТАЦ-3`
3`-ТАЦТТАА  ГААТЦГТАТГ-5`

В ходе второго этапа необходимо смешать нужные нам фрагменты 1а и 2б. В результате выступающие липкие концы скрепятся между собой, как им и положено, водородными связями в силу комплементарности.

5`-АГЦАТАЦТГТГ А-А-Т-Т-ЦТТАГЦАТАЦ-3`
3`-ТЦГТАТГАЦАЦ-Т-Т-А-А ГААТЦГТАТГ-5`

Окончательное скрепление фрагментов 1а и 2б двух молекул ДНК производит специализированный фермент ДНК-лигаза, которая “сшивает“ между собой сахарофосфатные остовы обоих фрагментов с образованием полной структуры двойной спирали ДНК.

2.4. Задачи для самоконтроля

2.4.1. Имеется последовательность из 27 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5`- ЦТГААТТАГГАТЦЦАГГЦААТАГТГТГ -3`
3`-ГАЦТТААТЦЦТАГГТЦЦГТТАТЦАЦАЦ-5`

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

2.4.2. Имеется последовательность из 24 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5`-ТЦАГААТГЦТГГЦЦААГТАЦТТАГ-3`
3`-АГТЦТТАЦГАЦЦГГТТЦАТГААТЦ-5`

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

2.4.3. Ниже приведены две последовательности одноцепочечных молекул ДНК. Какую из них в двухцепочечной форме могут разрезать известные вам рестриктазы?

а) 5`-АЦТЦЦАГААТТЦАЦТЦЦГ-3`

б) 5`-ГЦЦТЦАТТЦГААГЦЦТГА-3`

2.4.4. Ниже приведены три последовательности одноцепочечных молекул ДНК. Какую из них в двухцепочечной форме могут разрезать известные вам рестриктазы?

а) 5`-ТАГГЦТААГЦТТАЦЦГАТ-3`

б) 5`-ЦГААТАТТТЦЦГГАТГАА-3`

в) 5`-АГГТЦЦТТАТЦЦГАТААТТ-3`

2.4.5. Рестрикционный фермент Hpa II разрезает ДНК по последовательности ЦЦГГ. Какова средняя длина фрагментов разрезанной ДНК?

2.4.6. Рестрикционный фермент EcoRI разрезает ДНК по последовательности ГААТТЦ. Насколько часто этот фермент будет разрезать двухцепочечную ДНК?

2.4.7. Если последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК распределяется случайным образом, то какова будет средняя длина фрагмента при разрезании ДНК рестриктазами, узнающими последовательность из восьми нуклеотидов?

2.4.8. Гаплоидный геном человека содержит около 3×10^9 нуклеотидных пар ДНК. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено при разрезании человеческой ДНК рестрикционным ферментом Not I, узнающим октамерную последовательность ГЦГГЦЦГЦ?

2.4.9. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено при разрезании человеческой ДНК рестикционным ферментом SmaI?

2.4.10. Гаплоидный геном дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae,* состоящий из одной хромосомы, содержит около $13,5\times10^6$ нуклеотидных пар ДНК. Если вы порежете эту ДНК ферментом EcoRI, то сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

2.4.11. Гаплоидный геном *Saccharomyces cerevisiae* ($13,5\times10^6$ н. п.) разрезали ферментом HaeIII. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

2.4.12. Геном кишечной палочки *Escherichia coli*, представляющий собой одну кольцевую хромосому, содержит около $4,7\times10^6$ н. п. Его разрезали ферментом HaeIII. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

2.4.13. Геном *Drosophila melanogaster,* состоящий из четырёх хромосом, содержит около 10^8 нуклеотидных пар ДНК. Если вы порежете эту ДНК ферментом EcoRI, то сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

2.4.14. Ниже приведены последовательности двух фрагментов ДНК, выделенных из организмов разных видов.

5`-АААГЦТТЦТГААТЦЦГАТЦГ-3`
3`-ТТТЦГААГАЦТТАГГЦТАГЦ-5`

5`-ГТАЦТЦАГАТЦЦТАГГАТААГЦТТА-3`
3`-ЦАТГАГТЦТАГГАТЦЦТАТТЦГААТ-5`

С помощью каких ферментов можно получить гибридную молекулу ДНК из этих фрагментов? Опишите последовательные этапы получения гибридной молекулы.

2.4.15. Опишите последовательные этапы получения гибридной ДНК из представленных ниже фрагментов.

5`-ТАЦТАТЦЦГГАГТАГГАТЦЦТ-3`
3`-АТГАТАГГЦЦТЦАТЦЦТАГГА-5`

5`-ЦГГАТЦЦТАГАТТЦЦАТА-3`
3`-ГЦЦТАГГАТЦТААГГТАТ-5`

2.5. Задачи повышенной сложности

2.5.1. Представленный ниже фрагмент ДНК, содержащий ген человеческого пептидного гормона соматостатина (состоящего из 9 аминокислот) на флангах имеет сайты рестрикции для EcoRI.

5`-ГЦЦГААТТЦЦЦТАТЦААЦАЦГААГТГАААГТЦТТАЦААЦЦЦАТГААТТЦГАТ-3`
3`-ЦГГЦТТААГГГАТАГТТГТГЦТТЦАЦТТТЦАГААТГТТГГГТАЦТТААГЦТА -5`

В каком направлении будет происходить транскрипция этого гена?

2.5.2. Отразится ли на результатах трансляции гена соматостатина обработка фрагмента ДНК приведенного в предыдущей задаче рестрикционным ферментом EcoRI?

2.5.3. Исходя из данных, представленных в задаче 5.1 определите, какова последовательность аминокислот человеческого пептидного гормона соматостатина?

2.6. 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.
13. **Desmond Nicholl** An introduction to genetic engineering. / Second edition – Cambridge University press. 2002. – 292 p.
14. **Genetics: from genes to genomes.** Hartwell L. et al. – McGraw Hill: Higher education. New York. 2004. – 880 p.

ТЕМА 3

Анализ и использование фрагментов ДНК (ДНКовых последовательностей)

<u>ЦЕЛЬ</u>: Ознакомиться с методами электрофоретического анализа ДНК в агарозном геле и методом блот-гибриди-зации ДНК по Саузерну и на примере решения типовых задач закрепить усвоенный материал

3.1. 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. 3.1.). В камере создается электрическое поле, под действием которого фрагменты ДНК начинают перемещаться 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.

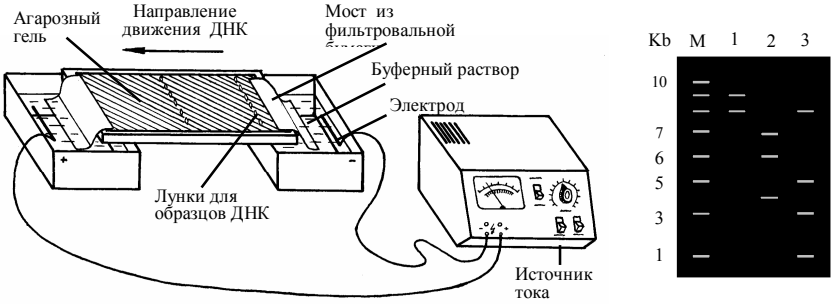


Рис. 3.1. Схематическое изображение камеры для электрофореза ДНК в агарозном геле. Справа представлена электрофореграмма фрагментов ДНК, окрашенная этидиум бромидом и помещенная под УФ свет. (М – маркеры, 1,2,3 – образцы одной и той же ДНК, разрезанные различными рестриктазами).

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. 3.1. 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. Первую полную физическую карту расположения участков 14 рестриктаз составил Д. Натанс для ДНК вируса SV-40.

В 1975 году был разработан метод, который позволяет **идентифицировать** конкретные **гены и** другие **рестрикционные фрагменты ДНК** после их электрофоретического разделения. Суть метода заключается в том, что сначала

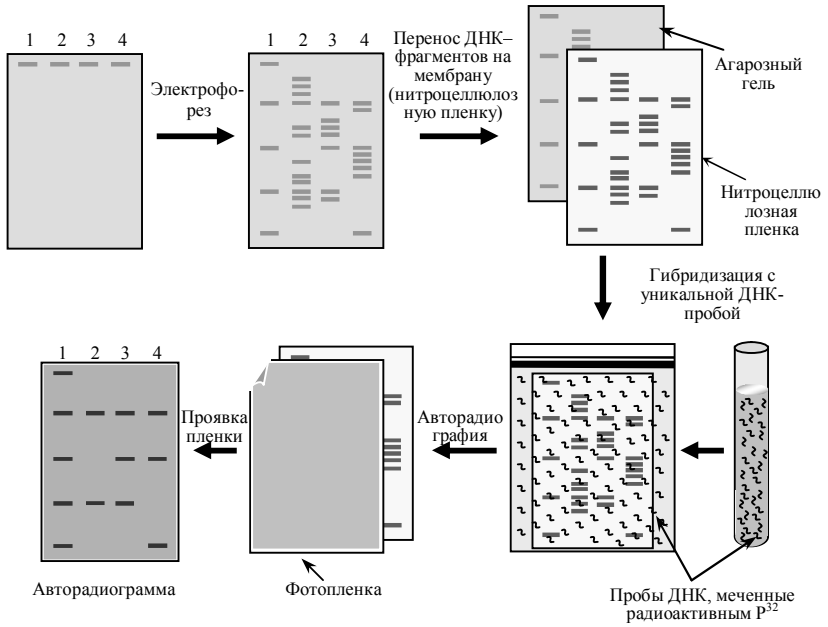


Рис. 3.2. Схематическое изображение основных этапов Саузерн-блот гибридизации.

фрагменты ДНК, разделенные в агарозном геле, **денатурируются до одноцепочечных** молекул, а затем весь электрофоретический спектр ДНК **отпечатывается (blotting)** за счет капиллярных сил на приложенной к гелю **нитроцеллюлозной мембране (пленке**), после чего фиксируется при помощи высокой температуры (рис. 3.2.). Далее мембрана помещается в гибридизационный буфер, содержащий **специальный радиоактивно меченый ДНКовый зонд** – короткую специфическую последовательность ДНК. **Зонд** способен гибридизоваться с определенным комплементарным фрагментом ДНК и свяжется только с одной или несколькими конкретными фракциями из всего электрофоретического спектра полученных рестрикционных фрагментов ДНК. На последнем этапе к нитроцеллюлозной мембране, содержащей весь спектр полученных фрагментов ДНК, включая **фракции, гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом,** прикладывают рентгеновскую пленку. На пленке (**авторадиограмме)** после экспозиции выявляются засвеченные места, соответствующие расположению меченых фракций ДНК. Это метод получил название **Саузерн-блот гибридизации** в честь разработавшего его Эдварда Саузерна.

К настоящему времени удалось практически полностью расшифровать (прочитать) абсолютное большинство генов даже у таких сложных видов как человек и дрозофила. Для этих и многих других видов получено огромное количество различных **ДНКовых зондов (проб),** которые успешно используются в **Саузерн-блот анализе**.

3.2. Ключевые слова и понятия

ферменты рестрикции **фрагменты ДНК** **манипуляции с фрагментами ДНК** **электрофорез в агарозном геле** **электрофоретическая камера** **скорость продвижения фрагментов** **краситель этидиум бромид** **разделение рестрикционных фрагментов ДНК** **выделение рестрикционных фрагментов ДНК из геля** **светящиеся фракции ДНК** **рестрикционные карты**	**идентификация генов и рестрикционных фрагментов ДНК** **денатурация ДНК** **blotting** **нитроцеллюлозная мембрана** **радиоактивно меченый ДНКовый зонд** **Саузерн-блот гибридизация** **ДНК пробы** **фракции гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом** **авторадиограмма** **Саузерн-блот анализ**.

3. Примеры решения задач

3.3.1. Фрагмент человеческой ДНК длиной 4 тысячи нуклеотидных пар имеет два сайта рестрикции для фермента EcoRI. Как будет выглядеть электрофореграмма, окрашенная этидиум бромидом, после электрофореза в агарозном геле образца данной ДНК, разрезанной этой рестриктазой на неровные части?

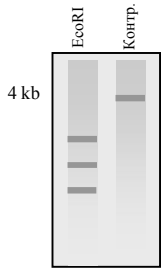


Рис. 3.3. Электрофореграмма фрагментов ДНК

Решение:

После электрофореза в агарозном геле образец данной ДНК, разрезанный рестриктазой EcoRI по двум сайтам рестрикции на электрофореграмме, окрашенной этидиум бромидом, будет представлен тремя фракциями различной подвижности. Схематическое изображение электрофореграммы одного из возможных вариантов спектра показано на рисунке 3.3. справа. Поскольку исходный фрагмент был размером 4 кб, то естественно, все три фрагмента будут меньшей величины.

3.3.2. Молекула ДНК величиной 17 кб была разрезана на фрагменты двумя рестриктазами. Результаты электрофоретического анализа в агарозном геле, полученных фрагментов ДНК после окраски этидиум бромидом представлены на фореграмме рис. 3.4. При разрезании рестриктазой № 1 ДНК разрезается на три фракции величиной 8, 6 и 3 кб, а при разрезании рестриктазой № 2 на две фракции – 10 и 7 кб. ДНК, разрезанная сразу двумя рестриктазами № 1 и № 2, состоит из четырёх фракций величиной 8, 6, 2 и 1 кб.

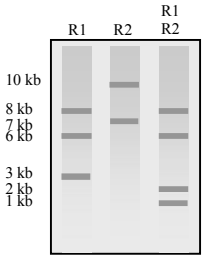


Рис. 3.4. Электрофореграмма ДНК-фрагмен-тов (R1 и R2 - рестриктазы)

В каком порядке полученные рестрикционные фрагменты расположены в исходной молекуле ДНК величиной 17 кб? Иными словами, необходимо построить рестрикционную карту ДНК 17кб.

Решение:

В этом упрощённом примере исходная молекула ДНК величиной 17 кб разрезается на три фракции ферментом № 1 в двух местах, т.е. имеется два сайта рестрикции для рестриктазы № 1. Однако неясно, в середине или с краю исходной ДНК расположен фрагмент величиной 3 кб. Совместное разрезание ферментами № 1 и № 2 оставляет нетронутыми фракции длиной 8 и 6 кб, но разрезает фрагмент 3 кб на две части длиной 2 и 1 кб, что указывает на наличие сайта рестрикции для рестриктазы № 2 в пределах фрагмента рестриктазы № 1. Если бы фрагмент 3 кб был на краю исходной молекулы 17 кб, использование только фермента № 2 позволило бы получить фрагменты 2 кб и 1 кб. Но так как этого не произошло, то из трёх рестрикционных фрагментов, полученных при помощи фермента №1, фрагмент длиной 3 кб должен быть расположен в середине.

Таким образом, рестрикционная карта исходной ДНК для рестриктазы № 1 (R1) и рестриктазы № 2 (R2) будет иметь вид, представленный на рис. 3.5.

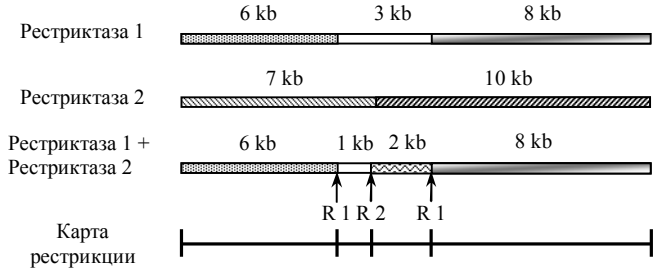


Рис. 3.5. Рестрикционная карта, построенная на основе анализа электрофоретического фракционирования фрагментов ДНК, полученных в результате действия двух различных рестриктаз и их смеси на нативную ДНК.

Тот факт, что сайт R2 расположен ближе к участку длиной 6 кб, следует из величины участков в 7 и 10 кб, полученных при разрезании исходной ДНК только рестриктазой № 2.

3.3.3. Исследователям удалось выделить специальный зонд, способный гибридизоваться с участком хлоропластной ДНК (хлДНК) у любых видов хвойных. Авторадиограмма образцов хлоропластной ДНК родительских видов пихт европейской (E) и сибирской (C), обработанных рестрикционным ферментом и результаты последующей Саузерн-блот гибридизации с использованием радиоактивного зонда представлены на рисунке 3.6. справа. Каковы будут рестрикционные карты у родительских видов пихт?

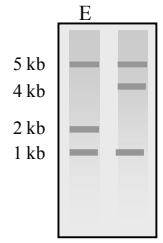
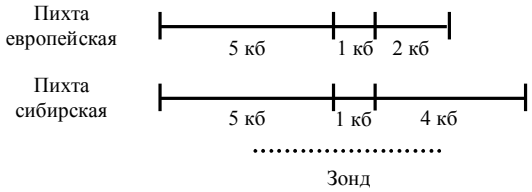


Рис. 3.6. Авторадиограмма фрагментов хлДНК у пихт европейской (E) и сибирской (C)

Решение:

Исходя из данных, представленных на авторадиограмме, величина одного из фрагментов ДНК, которые гибридизуются со специальным зондом у деревьев пихты сибирской будет длиннее на 2 кб. Рестрикционные карты двух видов пихт будут иметь следующий вид:



3.3.4. При скрещивании между деревьями пихты европейской и пихты сибирской было получено 20 потомков. Каковы будут их рестрикционные спектры на авторадиограмме после Саузерн-блот гибридизации с хлоропластным зондом в случае, когда материнскими деревьями служила пихта европейская, а пыльца бралась от пихты сибирской и наоборот?

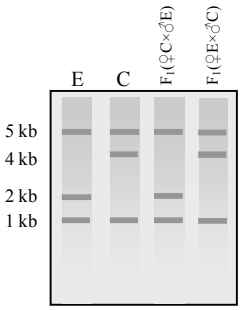


Рис. 3.7. Авторадиограмма рестрикционных фрагментов хлДНК у двух пихт и их гибридов

Решение:

Так как хлоропласты у голосеменных всегда наследуются по отцовской линии, то у гибридов F_1(♀C×♂E) спектр на авторадиограмме будет аналогичный спектру пихты европейской (рис. 3.7.). При реципрокном скрещивании у гибридов F_1(♀E×♂C) на авторадиограмме спектр рестрикционных фрагментов будет аналогичный таковому у пихты сибирской (рис. 3.7.).

3.3.5. Анализ ДНК был проведен в большой семье, среди членов которой наблюдалось доминантное аутосомное заболевание, проявляющееся в 40 лет и позже. Образцы ДНК каждого члена семьи обработали рестрикционным ферментом TagI и полученные фрагменты ДНК разделили при помощи электрофореза в агарозном геле. Затем провели Саузерн-блот гибридизацию с использованием радиоактивной пробы, состоящей из фрагмента клонированной ДНК человека. Родословная исследованной семьи и полученная авторадиограмма электрофорезированной ДНК представлены на рисунке 3.8. ниже. Черным отмечены члены семьи, имеющие заболевание.

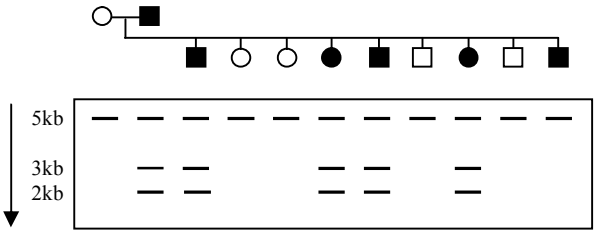


Рис. 3.8. Родословная семьи в которой распространено доминантное аутосомное заболевание и электрофореграмма образцов ДНК каждого члена семьи, обработанных рестрикционным ферментом TagI.

Проанализируйте полные взаимоотношения между полученными с помощью радиоактивной пробы спектрами ДНК членов семьи и геном болезни. Нарисуйте соответствующие

хромосомные участки родителей.

Решение:

Использованные радиоактивные ДНК-пробы позволили выявить на авторадиограмме три фракции ДНК размером 5, 3 и 2 кб. Все члены семьи имеют 5-кб фрагмент. У пяти из шести членов семьи, имеющих заболевание, присутствуют 3 и 2-кб ДНК-фрагменты, тогда как у здоровых они отсутствуют. Следовательно, эти два фрагмента, вероятно, сцеплены в цисположении с аллелем, несущим заболевание. Поскольку фрагменты 3 и 2 добавляются к 5-кб фрагменту, вероятное построение отцовских хромосом является

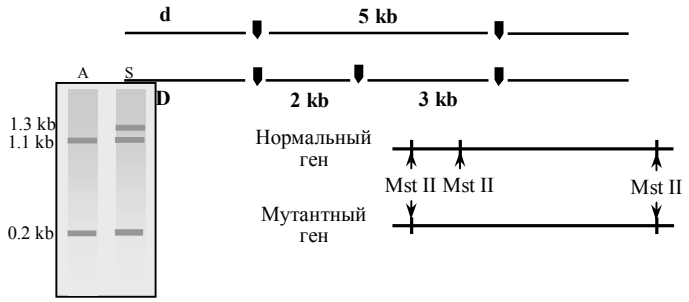
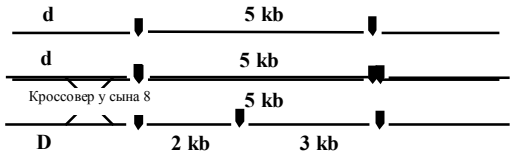


Рис. 3.9. Авторадиограмма и рестрикционные карты, построенные на основе анализа электрофоретического фракционирования фрагментов ДНК β-глобинового гена, полученных в результате действия рестриктазы Mst II.

следующим:

где D – аллель, определяющий заболевание, а стрелками отмечены сайты для рестрикционного фермента TagI.

Соответственно строение материнских хромосом будет иметь следующий вид:



3.3.6. Используя схему авторадиограммы из предыдущей задачи, ответьте каким образом можно объяснить спектр последнего сына?

Решение:

Последний сын наиболее вероятно представляет кроссовер между локусом несущим заболевание и маркерным локусом, произошедшим в результате кроссинговера в хромосоме с D и 5-кб фрагментами.

3.3.7. Мутация, вызывающая болезнь – серповидно-клеточная анемия (СКА), обусловлена заменой всего одного нуклеотида в ДНК β-глобинового гена. Причем, в результате этой мутации пропадает сайт рестрикции для фермента MstII, который присутствует в нормальном гене. Как можно использовать эту информацию для консультации семей, проживающих в районах высокой концентрации этой мутации, на предмет **выявления носителей** данного наследственного заболевания? Какие молекулярно-генетические эксперименты для этого необходимо провести?

Решение:

Мутацию β-глобинового гена, приводящую к заболеванию можно достаточно легко выявлять, используя молекулярно-генетические методы. Для этого необходимо индивидуальные образцы ДНК обработать рестриктазой MstII. Затем, полученные рестрикционные фрагменты подверг-нуть электрофоретическому фракционированию в агарозном геле с последующей Саузерн-блот гибридизацией, используя в качестве зонда меченый фрагмент β-глобиновой ДНК.

Поскольку в результате мутационной замены нуклеотида в ДНК β-глобинового гена происходит потеря сайта рестрикции для MstII, который присутствует в нормальном гене, то на авторадиограмме (рис. 3.9.) образцов, взятых у здоровых людей будут

присутствовать две фракции (размером 1.1 и 0.2 кб), тогда как в образцах, взятых у людей страдающих серповидно-клеточной анемией, будет присутствовать дополнительная «тяжелая» (неразрезанная) фракция ДНК (величиной 1.3 кб).

Таким образом, для консультации семей, проживающих в районах высокой концентрации мутации, вызывающей серповидно-клеточную анемию, наиболее целесообразно использовать молекулярно-генетические методы, включающие рестрикционный и Саузерн-блот анализ, которые дают возможность достаточно легко выявлять носителей данного заболевания.

3.4. Задачи для самоконтроля

3.4.1. Фрагмент человеческой ДНК длинной 2 тысячи нуклеотидных пар (2 килобазы) имеет один сайт рестрикции для фермента EcoRI.

Сколько фракций ДНК будет присутствовать на фореграмме, окрашенной этидиум бромидом, после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК, обработанной EcoRI?

3.4.2. Фрагмент мышиной ДНК длиной 8 тысяч нуклеотидных пар имеет два сайта рестрикции для фермента BamI.

Как будет выглядеть электрофореграмма, окрашенная этидиум бромидом, после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК, разрезанной этой рестриктазой на неровные части?

3.4.3. Кольцевая молекула митохондриальной ДНК (мтДНК) имеет один сайт рестрикции для рестриктазы EcoRI.

Сколько фракций ДНК будет присутствовать на фореграмме после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК, обработанной EcoRI?

3.4.4. Фрагмент бактериальной ДНК длиной 5 килобаз имеет один сайт рестрикции для фермента EcoRI и два сайта для BamI.

Как будет выглядеть электрофореграмма после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК обработанной только EcoRI, только BamI, а также смесью этих двух рестриктаз?

3.4.5. Линейный фрагмент ДНК разрезается ферментами HindIII и SmaI, а затем двумя ферментами вместе. В результате проведенного электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием этидиум бромидом на электрофорегарамме получена картина, представленная на рис. 3.10.

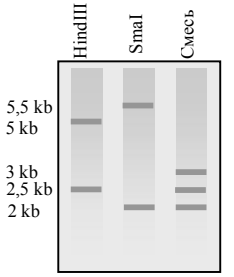


Рис. 3.10. Электрофореграмма фрагментов ДНК.

Необходимо построить рестрикционную карту для исходной молекулы ДНК.

3.4.6. Полученную выше смесь рестрикционных фрагментов ДНК обработали еще одним ферментом – EcoR I, при этом в спектре исчезла фракция 3 кб, но появилась новая – величиной 1.5 кб. Какой вид будет иметь рестрикционная карта в этом случае?

3.4.7. Кольцевая молекула митохондриальной ДНК (мтДНК) разрезана двумя рестрикционными ферментами А и Б. Электрофореграмма полученных ферментов, окрашенных этидиум бромидом, представлена на рис. 3.11.

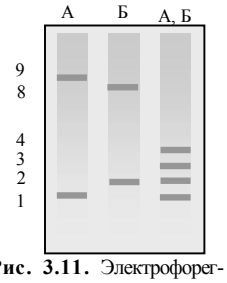


Рис. 3.11. Электрофореграмма фрагментов мтДНК.

Построить схематичную рестрикционную карту этих фрагментов.

3.4.8. Имеется последовательность очищенной молекулы ДНК. После обработки этой ДНК ферментом EcoRI получены фрагменты 1, 2, 3 и 4. Каждый из четырёх фрагментов был разрезан HidIII. В результате фрагмент 3 разрезался на два субфрагмента 3_1 и 3_2, а фрагмент 2 распался на 2_1, 2_2 и 2_3.

После обработки исходной целой ДНК ферментом HindIII получено четыре фрагмента А, Б, В и Г. Когда каждый из этих фрагментов обработали EcoRI, то фрагмент Г разрезался на фрагменты 1 и 3_1, А расщепился на 3_2 и 2_1 и Б разрезался на 2_3 и 4. Фрагмент В оказался идентичным с 2_2. Нарисовать рестрикционную карту исходной ДНК.

3.4.9. Исследователям удалось выделить специальный зонд, способный гибридизоваться с участком митохондриальной ДНК (мтДНК) у любых видов хвойных. Авторадиограмма образцов мтДНК родительских видов пихт европейской (Е) и сибирской (С), обработанных рестрикционным ферментом и результаты последующей Саузерн-блот гибридизации с использованием радиоактивного зонда представлены на рисунке 3.12. справа**.** При скрещивании между деревьями пихты европейской и пихты сибирской было получено 20 потомков.

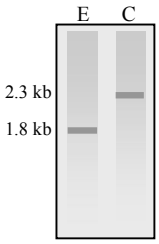
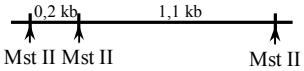


Рис. 3.12. Электрофореграмма образцов мтДНК пихт европейской (Е) и сибирской (С) блот гибридизации с митохондриальным зондом в случае, когда материнскими деревьями служила пихта европейская, а пыльца бралась от пихты сибирской и при обратном скрещивании?

3.4.10. Мутация, вызывающая болезнь – серповидно-клеточная анемия обусловлена заменой всего одного нуклеотида в ДНК β-глобинового гена. В результате этой мутационной замены одного нуклеотида в ДНК β-глобинового гена происходит потеря центрального сайта рестрикции для MstII, который присутствует в нормальном гене. Рестрикционная карта нормального β-глобинового гена с указанием месторасположения сайтов рестрикции представлена ниже.



Как будут выглядеть на электрофореграмме после Саузерн-блот анализа электрофоретические спектры ДНК β-глобинового гена у здоровых людей (А) и у гетерозиготных носителей заболевания серповидно-клеточ-ная анемия (S)?

3.4.11. Одна из мутаций, вызывающая болезнь кистозный фиброз (КФ), обусловлена заменой всего одного нуклеотида. Причем, в результате этой мутации пропадает сайт рестрикции для EcoRI, который присутствует в норме. Как можно использовать эту информацию для консультации семьи на предмет того являются ли они носителями данного наследственного заболевания? Какие молекулярно-генетические эксперименты для этого необходимо провести?

3.4.12. В ходе проведенного молекулярно-генетического анализа с использованием специального ДНК-зонда на кистозный фиброз и Саузерн-блот гибридизации было установлено, что женщина в семье из задачи 3.4.11 является носителем этого заболевания. Она вышла замуж за неродственного мужчину, являющегося также гетерозиготной по КФ, но он является носителем другой мутации в этом же гене.

Оцените риск рождения у этой семейной пары детей, страдающих кистозным фиброзом.

3.4.13. Супружеская пара имеет 3х детей больных кистозным фиброзом (КФ). Их старший сын женился на своей троюродной сестре. Он провел молекулярное тестирование с целью установить вероятность заболевания кистозным фиброзом своих детей. Три специальных ДНКовых зонда тесно сцепленных с геном, определяющим заболевание фиброзом, были использованы для молекулярного анализа генотипов у членов его семьи. Полученная авторадиограмма электрофорезированной ДНК у членов исследованной семьи представлена на рисунке 3.13.

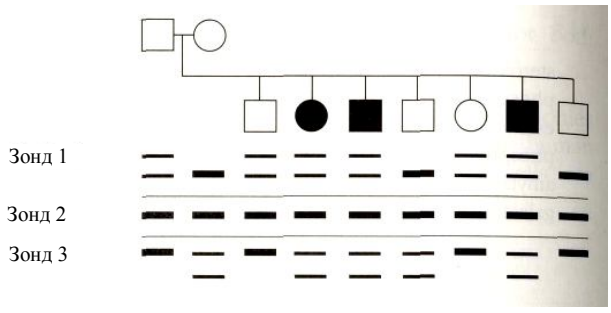
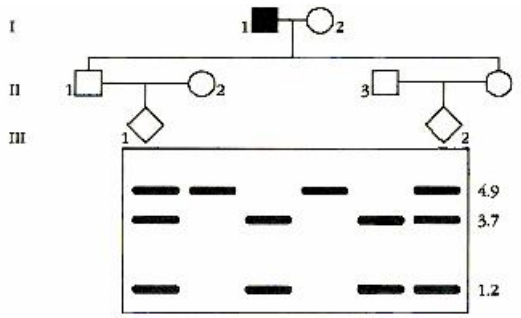


Рис. 3.13. Электрофореграмма образцов ДНК с пользованием трех зондов сцепленных с геном, определяющим заболевание кистозный фиброз у родительской пары и 7 их детей. Черным отмечены дети, имеющие данное заболевание.



Является ли старший сын в этой семье нормальной гомозиготой или носителем заболевания?

3.4.14. Исходя из представленной авторадиограммы электрофорези-рованной ДНК у членов исследованной семьи из предыдущей задачи, определите являются ли нормальными гомозиготами или носителями два его нормальных брата и сестра.

3.4.15. Используя представленную в задаче 3.4.13 авторадиограмму укажите, кто из родителей в этой семье является носителем аллеля несущего заболевание кистозный фиброз?

3.4.16. Мужчина, страдающий доминантным наследственным заболеванием, болезнью Хантингтона имеет двоих взрослых детей. Его дети опасаясь, что могут оказаться носителями наследственного заболевания, решили провести молекулярно-генетическую диагностику родителей, а также супругов и эмбрионов своих будущих детей. В то же время, сами от такой диагностики отказались. Саузерн-блот анализ выявил двухаллельную систему (с аллельными фрагментами в 4.9 кб или 3.7 и 1.2 кб) по ДНК-маркеру, который показывает 4 процента рекомбинантов с болезнью Хантингтона. Родословная этой семьи с результатами проведенного Саузерн-блот анализа представлена на рисунке 3.14. Для каждого из двух проанализированных эмбриональных образцов, вычислите шанс, что зародыши унаследуют аллель, сцепленный с болезнью Хантингтона.

Рис. 3.14. Родословная семьи трех поколений, в которой распространено заболевание хорея Хантингтона и электрофореграмма спектров ДНК исследованных членов семьи после Саузерн-блот анализа

3.4.17. Одна из мутаций, вызывающая сцепленное с полом рецессивное заболевание гемофилия А, характеризующееся несвертываемостью крови из-за дефицита белкового фактора коагуляции VIII, обусловлена заменой всего одного нуклеотида. В результате этой мутации во фрагменте гена, величиной 1165 н п, включающем экзоны 17 и 18 появляется сайт рестрикции для рестриктазы BclI, который отсутствует в норме. Эта рестриктаза разрезает фрагмент на две части, равные 879 н п и 286 н п, соответственно. Как будут выглядеть на электрофореграмме после Саузерн-блот анализа спектры фрагмента ДНК, включающего экзоны 17 и 18 в гене фактора VIII у здоровых людей, гетерозиготных носителей и больных гемофилией А?

3.4.18. На рисунке 3.15. представлена родословная семьи трех поколений в которой распространена наследственная болезнь гемофилия А, характеризующееся несвертываемостью крови из-за дефицита белкового фактора коагуляции VIII. Молекулярные генетики у всех членов данной семьи провели Саузерн-блот анализ фрагмента гена фактора VIII, величиной 1165 н п, включающий экзоны 17 и 18, обработанный рестриктазой BclI. Эта рестриктаза разрезает мутантный фрагмент на две части, равные 879 н п и 286 н п. Как будут выглядеть на электрофореграмме после Саузерн-блот анализа спектры данного фрагмента ДНК, в гене фактора VIII

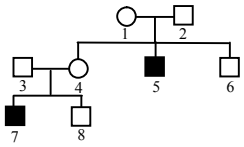


Рис.3. 15. Родословная семьи трех поколений в которой распространена наследственная болезнь гемофилия А. Черным цветом показаны члены семьи, страдающие данным заболеванием.

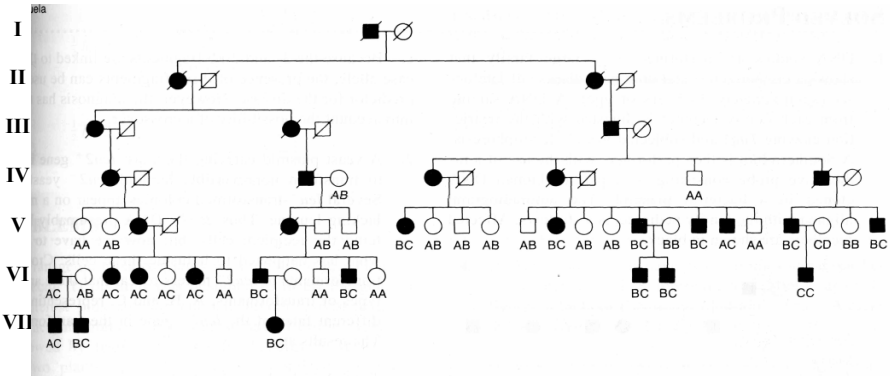


Рис. 3.17. Родословная венесуэльской семьи с болезнью Хантингтона. Черным цветом показаны члены семьи, страдающие БХ, значки членов семьи, не доживших до обследования, зачеркнуты.

у всех членов семьи из родословной, представленной на рисунке 3.15.?

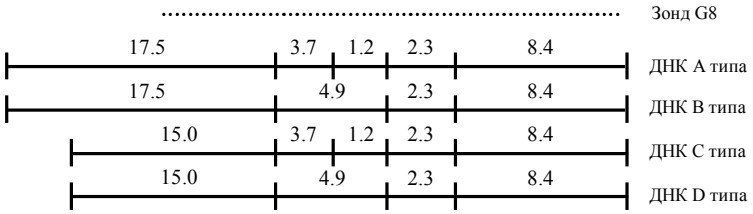


Рис. 3.16. Рестрикционные карты (для HindIII) четырех типов ДНК, способных гибридизоваться с зондом G8.

3.5. Задачи повышенной сложности

3.5.1. Болезнь Хантингтона (БХ) является аутосомно-доминантным заболеванием, при котором происходит нейродегенеративное расстройст-во, приводящее к летальному исходу. Поскольку четкие симптомы этой болезни начинают проявляться только в возрасте около 40 лет, потенциальные больные к этому сроку обычно уже имеют детей, часть из которых наследует это заболевание. Установить диагноз болезни Хантингтона в возрасте до 40 лет раньше не представлялось возможным. Однако в последние годы ученые сумели найти и сконструировать специальный ДНК-зонд (G8), позволяющий выявлять полиморфизм (тетраморфизм) ДНК, связанный с болезнью Хантингтона. Зонд G8 и четыре типа фрагментов ДНК, которые он позволяет определить посредством Саузерн-блот гибридизации, представлены на рисунке 3.16.

Каковыми будут электрофоретические спектры рестрикционных фрагментов ДНК, обработанных HindIII, после Саузерн-блот гибридизации у людей, имеющих гомозиготные AA, BB, CC, DD и гетерозиготные AB, AC, AD, BC, BD и CD генотипы? Все ли они будут различаться между собой?

3.5.2. На рисунке 3.17. представлена родословная семи поколений членов венесуэльской семьи, в которой распространена болезнь Хантингтона. Члены семьи были обследованы на предмет выявления генотипов (см. задачу 3.5.1) четырехаллельной системы фрагментов ДНК, гибридизующихся с зондом G8. Результаты обследования показаны на родословной, где черным цветом показаны члены семьи, страдающие БХ, а значки членов семьи, не доживших до обследования, зачеркнуты.

Какие выводы можно сделать, анализируя эту родословную на предмет связи типов ДНК, гибридизующихся с G8 и болезнью Хантингтона. Иными словами, с какими генотипами и аллелями ДНК-маркера связана болезнь Хантингтона в этой семье?

3.5.3. Каким образом можно объяснить наличие генотипа AC у здоровой женщины в шестом поколении (VI-5) венесуэльской семьи, представленной на рисунке 3.17.?

3.5.4. Исходя из приведенных выше данных по венесуэльской семье (рис. 3.10), что можно сказать о степени сцепления ДНК-маркера с геном, обуславливающим болезнь

Хантингтона.

3.5.5. Как могут приведенные в предыдущих задачах данные помочь в выявлении механизмов, обуславливающих первопричины болезни Хантингтона?

3.5.6. Среди членов одной семьи в нескольких поколениях наблюдается заболевание под названием наследственная оптическая нейропатия Лебера, при которой у человека нарушается центральное зрение с сохранением периферического. Ниже на рисунке 3.18. представлена родословная трех поколений и электрофореграмма результатов анализа коротких фрагментов мт-ДНК длиной 212 нуклеотидных пар, обработанная рестриктазой Sfa1 у каждого из 19 членов данной семьи.

Каков характер наследования и где расположен ген, ответственный за данное наследственное заболевание?

3.5.7. Исходя из молекулярно генетических данных анализа фрагментов митохондриальной ДНК можно ли сказать, каким образом рестрикционные спектры, представленные на рисунке 3.18, связаны с заболеванием оптическая нейропатия Лебера и каков механизм возникновения дефектного (мутантного) аллеля?

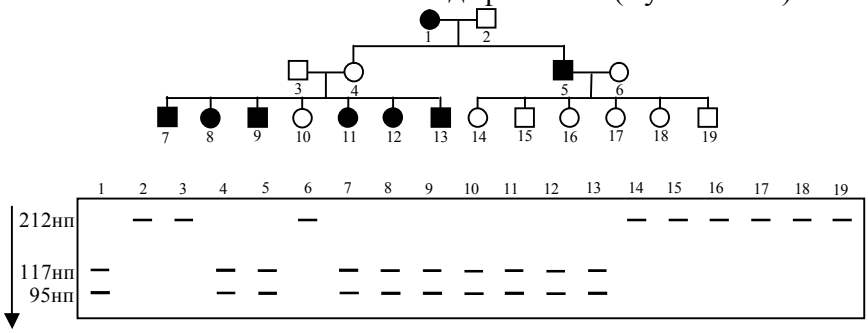


Рис. 3.18. Родословная семьи трех поколений в которой распространена болезнь наследственная оптическая нейропатия Лебера и электрофореграмма результатов анализа коротких фрагментов мт-ДНК Черным цветом показаны члены семьи, страдающие данным заболеванием.

3.5.8. Каким образом можно объяснить тот факт, что четвертый и десятый представители из родословной на рисунке 3.18 являются здоровыми, хотя имеют электрофоретический спектр фрагмента мт-ДНК состоящий из двух фракций характерных только для представителей несущих наследственное заболевание.

Литература

15. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. - М.: Мир, 1988. , ил.
16. **Жимулев И.Ф**. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
17. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности.- Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
18. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии**/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
19. **Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г.** Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002. – 114с.
20. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986.- 186 с.: ил.
21. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
22. **Щелкунов С.Н.** Конструирование гибридных молекул ДНК.- Новосибирск: Наука, 1987- 168 с.
23. **Льюин Б.** Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
24. **Modern genetic analysis/** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
25. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
26. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.
27. **Desmond Nicholl** An introduction to genetic engineering. / Second edition – Cambridge University press. 2002. – 292 p.
28. **Genetics: from genes to genomes.** Hartwell L. et al. – McGraw Hill: Higher education. New York. 2004. – 880 p.

ЗАНЯТИЕ 4

ТЕМА: плазмидные вектора – специальные устройства для доставки и клонирования чужеродных генов

<u>ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:</u> Ознакомиться с простейшими векторами, сконструированными на основе плазмид, освоить методы введения и клонирования чужеродных ДНК с помощью плазмидных векторов на примере решения типовых задач

1. Теоретическая часть

С помощью ферментов **рестриктаз** и **лигаз** исследователи научились конструировать разнообразные по своим составным частям **гибридные (рекомбинантные) ДНК,** путём сшивки фрагментов разных видов *in vitro*.

Но как полученным гибридным генам попасть в клетку и начать там “работать” – производить белки?

Для доставки чужеродных генов в различные организмы учёные стали применять специальные устройства, так называемые вектора. **Вектор** – это молекула ДНК, способная **самостоятельно реплицироваться** в клетках различных организмов и **обеспечивать размножение** (**клонирование**) и работу (**экспрессию**) встроенного в неё искусственно какого-либо гена. В английской литературе вектор часто обозначается словом vehicle – повозка.

Идеальными векторными молекулами, созданными самой природой, оказались **плазмиды**, представляющие собой небольшие **кольцевые молекулы ДНК**, самостоятельно живущие в цитоплазме бактерий. Плазмиды способны к автономной репликации, обладают **генами устойчивости** к различным антибиотикам, что позволяет легко обнаружить их присутствие в клетках, плазмиды могут внедряться в хромосому клетки хозяина, а также имеют участки ДНК (**сайты рестрикции**) для действия ряда рестриктаз. Это означает, что каждая такая рестриктаза может разрезать кольцо плазмидной ДНК и переводить её в линейное состояние. После чего линейную плазмиду можно легко соединить с фрагментом ДНК другого вида с подходящими липкими концами.

Первым успешным **вектором-повозкой**, который начали использовать в генной инженерии, стала кольцевая плазмида **pSC101**. Она несет только один **участок расщепления** (**сайт рестрикции**) рестриктазой EcoR1 и превращается под действием этого фермента из кольцевой в линейную молекулу, концы которой могут «слипаться» между собой или с любыми фрагментами другой ДНК, полученными под действием той же рестриктазы. Кроме того, она несет ген устойчивости к антибиотику тетрациклину, а значит легко обнаруживается в бактериях, если их растить на среде с этим антибиотиком. Все эти свойства pSC101 и были использованы для создания и **клонирования** первых **гибридных (рекомбинантных) ДНК**, которые были бы функционально активными, то есть могли бы стабильно существовать в клетке и наделять (**трансформировать**) ее новыми признаками. Этапы введения фрагмента **чужеродной ДНК** в плазмидный вектор pSC101 с помощью рестриктазы EcoR1 схематически показаны на рис. 1.

По мере развития методов генной инженерии совершенствовались и плазмидные вектора. Широкое распространение получила **плазмида pBR322**. У нее больше участков, разрезаемых различными рестриктазами, следовательно, с ней можно «сшивать» самые разные фрагменты ДНК. Более того, у pBR322 не один, а два **маркера для селекции** на бактериальных средах: помимо тетрациклина эта плазмида кодирует еще устойчивость к ампициллину (рис. 2). Если один из этих генов (например, ген устойчивости к тетрациклину) разрезать определенной рестриктазой, то при встраивании в это место фрагмента **чужеродной ДНК** целостность гена нарушается и определяемый им признак исчезает. Это позволяет легко отбирать гибридные плазмиды, **специальным образом введённые** в бактериальные клетки кишечной палочки *E. coli* при помещении их на твёрдую питательную среду с антибиотиками ампицилином и тетрациклином и на среду только с ампициллином. **Трансформированные** бактерии *E. coli,* т.е. содержащие гибридные плазмиды, растут на среде с ампицилином, но не растут на среде с двумя антибиотиками, потому что ген тетрациклиновой устойчивости в плазмиде повреждён вставкой. Селективный рост позволяет отбирать и выращивать только клетки, содержащие гибридные молекулы ДНК.

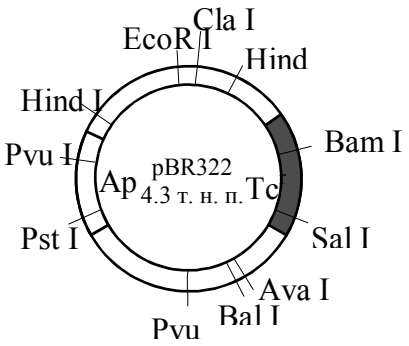


Рис. 2. Вектор pBR322, схема расположения сайтов рестрикции. Ap^r и Tc^r – гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину

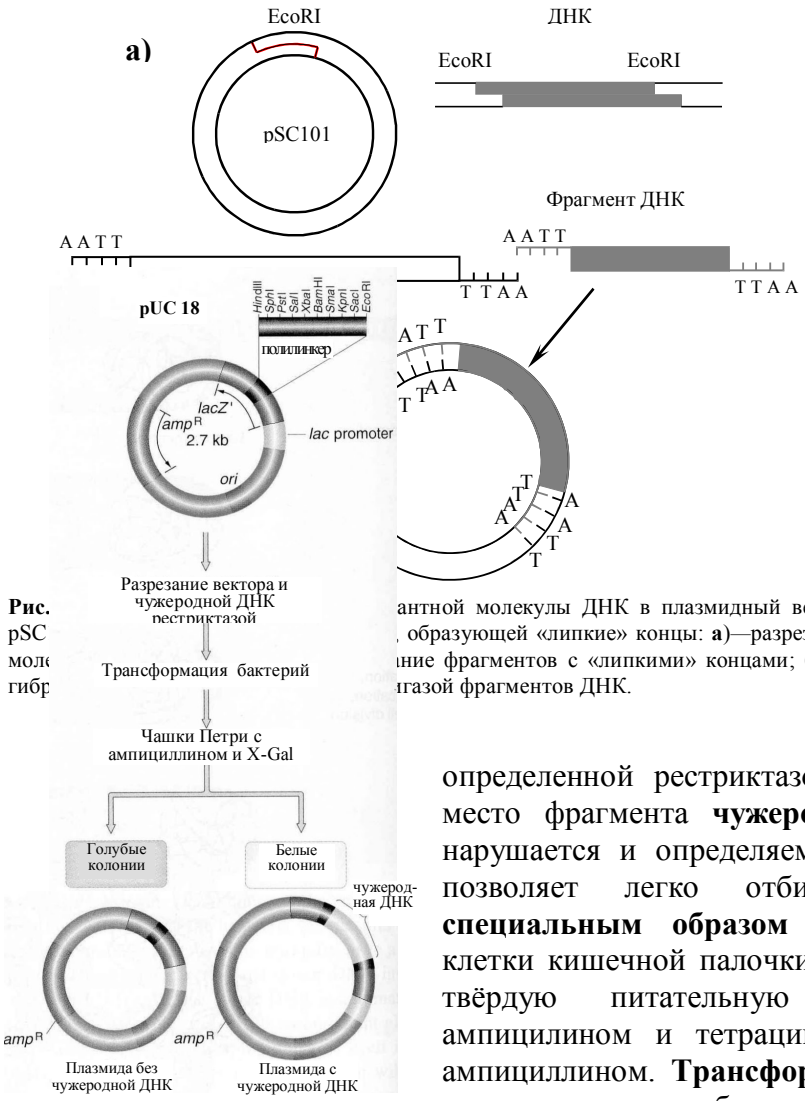


Рис. ...антной молекулы ДНК в плазмидный вектор pSC..., образующей «липкие» концы: **а**)—разрезание мол...ние фрагментов с «липкими» концами; **б)** — гибр...азой фрагментов ДНК.

Многие годы успешно применяется еще один класс плазмидных векторов, относящихся к типу **pUC**. На рисунке слева представлена схема использования плазмиды **pUC18**. У этой плазмиды величиной 2,7 кб селекционным маркёром является ген резистентности к ампициллину (amp^r). Кроме того, имеется крайне интересный **ген lacZ**, в котором расположен **полилинкер** или **участок множественного клонирования** длиной около 200 н.п., содержащий 10 сайтов рестрикции. В результате **инсерции (вставки)** чужеродной ДНК в полилинкер нарушается работа гена lacZ в плазмиде. Колонии бактерий содержащие нормальный и повреждённый вставкой гены легко различаются если поместить клетки в чашки Петри на среду содержащую **субстрат X-Gal**, который расщепляется ферментом **β-галак-тозидазой** (продукт гена lacZ), с образованием нерастворимого осадка сине-голубого цвета. Если образовались **колонии, окрашенные в синий цвет**, значит, в этих бактериальных клетках плазмиды не содержат вставки чужеродной ДНК. В тоже время бактериальные клетки, которые содержат плазмиды со

встроенной ДНК, образуют неокрашенные колонии. Следовательно, достаточно лишь взглянуть на трансформированные бактериальные клетки и можно с уверенностью сказать успешно ли прошло клонирование вставленной в плазмиду pUC18 чужеродной ДНК или нет. Поэтому **гены подобные lacZ** получили название **репортерных.**

Помимо плазмид в качестве векторов стали успешно использовать **фаги** и **вирусы**. Позже были созданы **космиды** – особый тип векторов, сочетающих свойства плазмиды и фага.

Таким образом, последовательна была создана основная триада элементов техники генной инженерии: выделение генов, «сшивание» их с вектором, доставка гибридной структуры в конкретный **(реципиентный) организм**, где она сможет размножаться и наследоваться в потомстве.

2. Ключевые слова и понятия

рестриктазы и лигазы **вектор** **плазмиды** **кольцевые молекулы ДНК** **чужеродная ДНК** **самостоятельная репликация** **клонирование** **экспрессия** **гены устойчивости** **трансформация** **участок расщепления** **сайт рестрикции** **pSC101** **pBR322**	**маркер для селекции** **pUC18** **lacZ** **полилинкер** **участок множественного клонирования** **X-Gal** **β-галактозидаза** **фаги** **вирусы** **космиды** **реципиентный организм** **трансформированные организмы** **репортерные гены**

3. Примеры решения задач

3.1. Кольцевая плазмида pSC101 несет только один участок расщепления рестриктазой EcoR1. Какой из приведённых ниже фрагментов ДНК можно встроить в данную плазмиду?

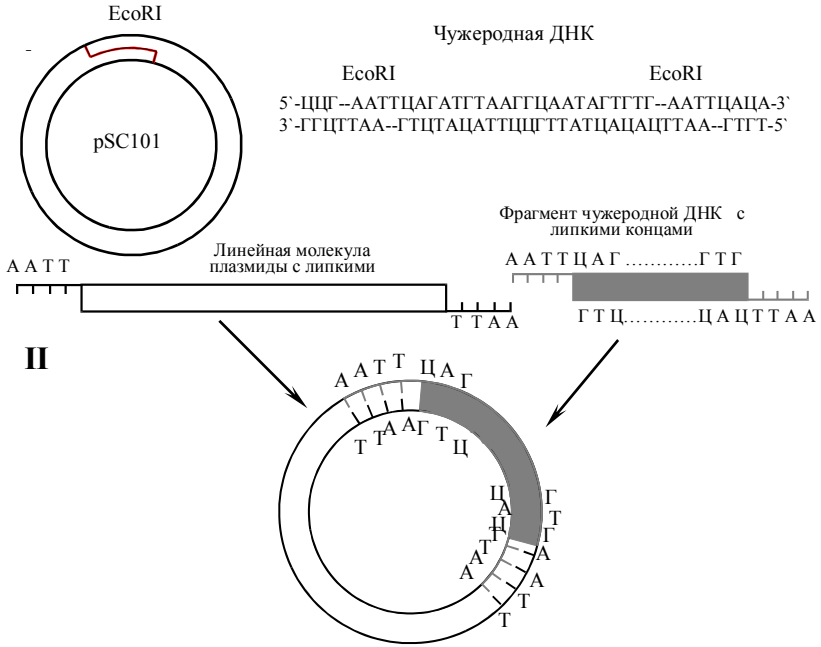
5`-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТАГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦАЦАТГ-3`
3`-ГГААТЦЦГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТАГТГТАЦ-5`

Решение:

Поскольку плазмида pSC101 несет один участок расщепления рестриктазой EcoR1, то в неё можно встроить только тот фрагмент ДНК, который также может быть разрезан рестриктазой EcoR1. Поэтому из двух фрагментов двухцепочечной ДНК, приведённых выше, в плазмиду pSC101 можно встроить лишь первый, так как только он содержит участки разрезания для EcoR1. Схематически этапы встраивания участка чужеродной ДНК изображены на рисунке:

На первом этапе EcoR I разрезает по сайтам рестрикции плазмиду и первую молекулу ДНК с



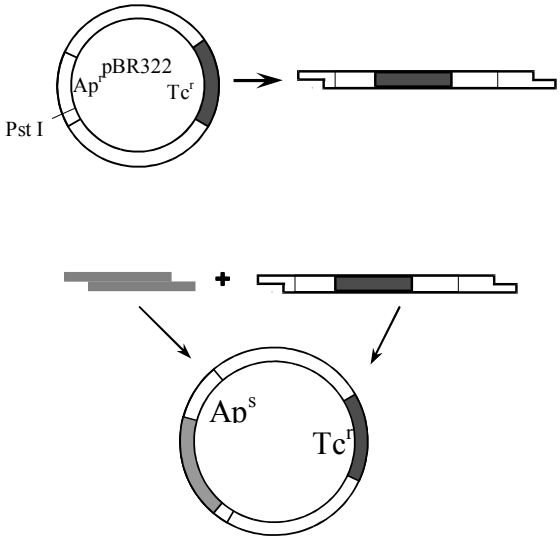
образованием фрагментов ДНК с липкими концами. На втором этапе происходит гибридизация линейной молекулы плазмиды и фрагмента чужеродной ДНК с последующим образованием кольцевой молекулы вектора со встроенным участком чужеродной ДНК и сшивание их при помощи фермента лигазы.

3.2. При помощи рестриктазы Pst I получен фрагмент двухцепочечной ДНК с липкими концами. Можно ли встроить данный фрагмент в плазмиду pBR322? Как подтвердить, что фрагмент чужеродной ДНК встроен в плазмиду pBR322?

Решение:

Данный фрагмент ДНК можно встроить в плазмиду pBR322, поскольку она несет участок расщепления рестриктазой Pst I. Процесс вставки фрагмента в плазмиду аналогичен таковому в предыдущей задаче.

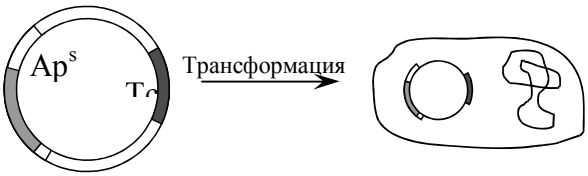
На первом этапе под действием рестриктазы Pst I, узнающей последовательность ЦТГЦАГ, получают линейную молекулу плазмиды с липкими концами:



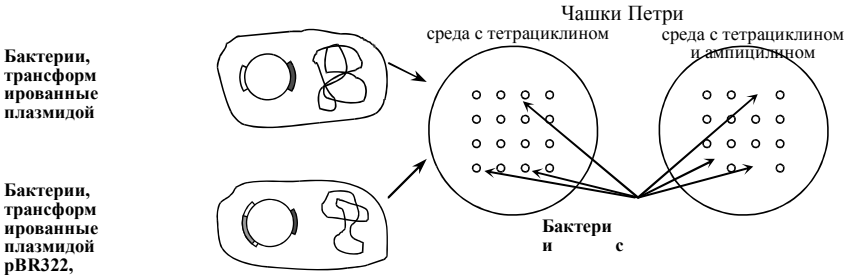
На втором этапе происходит гибридизация линейной молекулы плаз-миды с

фрагментом ДНК с последующим сшиванием ферментом лигазой:

Так как сайт рестрикции для Pst I находится в гене устойчивости (резистентности) к ампициллину, то при вставке чужеродной ДНК по месту разреза будет нарушена целостность гена Ap. Соответственно исчезнет признак устойчивости к ампициллину, кодируемый данным геном. Для того, чтобы подтвердить наличие чужеродной ДНК, гибридную плазмиду вводят в бактерию.



Трансформированные плазмидой бактерии помещают на среду в чашку Петри, содержащую только тетрациклин. Затем переносят реплику (отпечаток) колоний на среду,



содержащую и тетрациклин, и ампициллин.

Если бактериальные колонии растут на среде содержащей тетрациклин, но не растут на среде с двумя антибиотиками, то это означает, что данные бактерии несут плазмиды с чужеродной ДНК, встроенной в ген устойчивости к ампициллину. Иными словами, встроить данный фрагмент в плазмиду pBR322 при помощи рестриктазы Pst I удалось.

4. Задачи для самоконтроля

4.1. Ниже приведён фрагмент ДНК, можно ли встроить его в плазмиду pSC101?

5`-АГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦА-3`
3`-ТЦЦГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТАГТ-5`

4.2. Ниже приведены два одноцепочечных фрагмента ДНК. Какой из них в двухцепочечном варианте можно использовать для встраивания в плазмиду pSC101?

а) 5`-ГГЦЦТГААТТЦААГЦАТАГТГТГААТТЦАА-3`

б) 5`-ТЦЦГГАЦТТААТТГТТАТЦАЦАЦТТАГТ-3`

4.3. Кольцевая плазмида pBR322 имеет участки расщепления различными рестриктазами. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в данную плазмиду?

5`-ЦЦГАТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГАТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3`
3`-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦТТЦГАААГТТАЦ-5`

4.4. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в плазмиду pBR322?

5`-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦАЦАТГ-3`
3`-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦ ТТЦГААГТГТАЦ-5`

4.5. В плазмиде pUC18 имеется полилинкерный участок, который содержит сайты рестрикции для 10 различных рестриктаз. Можно ли встроить в эту плазмиду приведённые ниже фрагменты двухцепочечной ДНК?

5`-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3`
3`-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦТТЦГАААГТТАЦ-5`

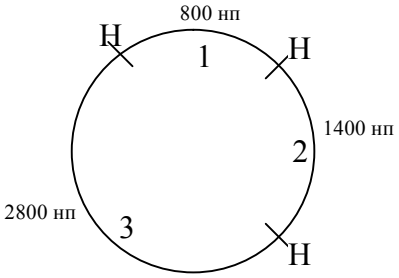
4.6. Имеется фрагмент двухцепочечной ДНК следующего состава:

5`- ТАГГАТЦЦАТТАААТАГТГГАТЦЦГТ -3`
3`-АТЦЦТАГГТААТТТАТЦАЦЦТАГГЦА-5`

Можно ли встроить данный фрагмент в плазмиду pBR322? Как подтвердить, что фрагмент чужеродной ДНК встроен в плазмиду pBR322?

4.7. В плазмиду pBR322 вставлен фрагмент чужеродной ДНК. Трансформированные такой плазмидой бактерии растут на питательной среде с ампициллином, но не растут на питательной среде, содержащей тетрациклин. Какой известной вам рестриктазой можно вырезать чужеродную ДНК из плазмиды?

4.8. Ген *Ms* находится в кольцевой плазмиде величиной 5 000 нуклеотидных пар (5 000 нп). Разрезание плазмиды рестрикционным ферментом Hind III дает фрагменты 1, 2 и 3, как показано на рисунке (H - Hind III рестрикционные сайты):



Тандемная копия гена *Ms* содержится только в одном Hind III фрагменте. Если ген *Ms* кодирует регуляторный белок MSS4, состоящий из 300 аминокислот, то укажите в каком фрагменте плазмиды расположены копии гена *Ms*?

4.9. Фрагмент ДНК мыши величиной 4 кб, имеющий на концах сайты рестрикции для EcoRI, содержит ген *M*. Этот фрагмент был встроен в плазмиду pBR322 по EcoRI сайту. Полученная рекомбинантная плазмида была разрезана двумя рестриктазами, электрофоретический спектр полученных рестрикционных фрагментов, окрашенных этидиум бромидом, представлен на рисунке 3. Для фракций на геле, полученных после разрезания сразу двумя ферментами, была проведена Саузерн-блот гибридизация с использованием в качестве зонда меченого фрагмента плазмиды pBR322.

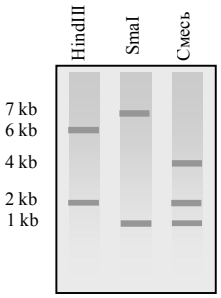
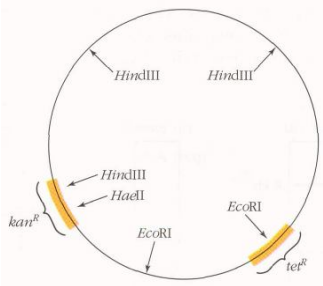


Рис. 3. Электрофореграмма фрагментов ДНК.

С какими фракциями ДНК произойдет гибридизация меченого зонда?

4.10. Ген для белка β-тубулина *Neurospora*, вставлен в кольцевую бактерии *E.coli*. Опишите шаг за действий, необходимых для того, ген от родственного грибка качестве вектора кольцевую представленную на рисунке справа, устойчивости к антибиотикам тетрациклину (tet).



был получен из грибка плазмиду и клонирован в шагом последовательность чтобы клонировать этот *Podospora*, используя в плазмиду pBR, которая несет два гена канамицину (kan) и

4.11. Фрагмент человеческой ДНК величиной 6 кб был встроен в плазмиду pBR 322 по EcoRI сайту. После этого, рекомбинантная плазмида была разрезана двумя рестриктазами, а полученные образцы подвергнуты электрофорезу в агарозном геле, как и в задаче 4.9. Электрофоретический спектр полученных фрагментов представлен на рис. 4. Для фракций, полученных после разрезания сразу двумя ферментами, была проведена Саузерн-блот гибридизация с меченым зондом из плазмиды pBR322.

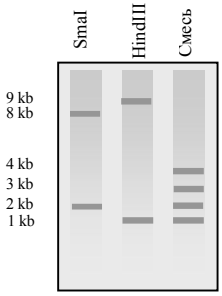


Рис. 4. Электрофореграмма фрагментов ДНК.

С какими фракциями ДНК в этом случае произойдет гибридизация меченого зонда?

4.12. Исследователи для клонирования важного фрагмента человеческой ДНК величиной 1кб использовали плазмиду pUC18. Трансформированные гибридной плазмидой клетки *E. coli* были помещены на питательную среду, содержащую X-Gal. После культивирования в чашках Петри появились колонии синего и белого цвета. Удалось ли встроить нужный фрагмент человеческой ДНК в плазмиду pUC18?

4.13. Интересный фрагмента человеческой ДНК величиной 1 кб был встроен в плазмиду pUC18 по Hind III сайту и клонирован в *E. coli.* Если выделить гибридную плазмиду и разрезать рестриктазой Hind III то как будет выглядеть спектр фрагментов после электрофореза в агарозном геле в случае когда человеческая ДНК успешно встроилась в pUC18 и когда этого не произошло?

4.14. Изменится ли электрофоретический спектр фрагментов после электрофореза в агарозном геле, если, выделенную по условиям задачи 4.13 гибридную плазмиду pUC18 разрезать сразу двумя рестриктазами Hind III и EcoR1?

5. Задачи повышенной сложности

5.1. Исследователи получили трансгенные растения табака, в которые, используя в качестве вектора специализированную Ti-плазмиду, был введен нужный ген вместе с подсоединенным к нему канамицинустойчивым геном предварительно встроенные во фрагмент Т-ДНК плазмиды. Наследование вставленного нужного гена тестировалось у потомков по устойчивости к канамицину. Для проверки было взято два трансгенных растения. Было проведено возвратное скрещивание трансгенного растения №1 с табаком дикого типа, при этом 50% потомков оказались канамицин устойчивыми, а 50% – чувствительными. Когда возвратное скрещивание при помощи линии табака дикого типа было проведено с трансгенным растением №2, то 75% потомков были канамицин устойчивыми, и только 25% – чувствительными.

Какова разница между трансгенными растениями №1 и №2?

5.2. С помощью Ti-плазмиды, содержащей ген устойчивости к канамицину, исследователи провели трансформацию растения *Arabidopsis thaliana*. Были выделены два клона (А и Б), устойчивые к канамицину. После самоопыления растений получили следующие результаты:

Растение А → 3/4 потомков устойчивы к канамицину,
1/4 потомков чувствительны к канамицину;
Растение Б → 15/16 потомков устойчивы к канамицину,
1/16 потомков чувствительны к канамицину.

Схематически изобразить соответствующие хромосомы у растения А и растения Б и объяснить полученное соотношение фенотипов в F_1 у потомства растений А и Б после самоопыления.

5.3. Структурный ген величиной 0,5 кб, выделенный из генома человека имеет на одном конце сайт рестрикции для фермента рестриктазы EcoR1, а на другом для Hind III. Можно ли клонировать этот ген в *E. coli* при помощи плазмиды pUC18?

5.4. Представленный ниже фрагмент ДНК человека, в центральной части содержит ген, кодирующий небольшой пептидный гормон сотоящий из 9 аминокислот.

5`-ГЦЦГААТТЦЦЦТАТЦААЦАЦГААГТГААТТЦЦТТАЦААЦЦЦАТГААТТЦГАТ-3`
3`-ЦГГЦТТААГГГАТАГТТГТГЦТТЦАЦТТААГГААТГТТГГГТАЦТТААГЦТА -5`

Можно ли клонировать этот ген в *E. coli* при помощи плазмиды pBR322, используя рестрикционный фермент EcoRI?

5.5. Молекулярные генетики получили два интересных фрагмента ДНК мыши, которые представлены ниже.

5`-АЦГ**ААГЦТТ**ЦЦТАТЦААЦАЦГААГТ**ААГЦТТ**ЦТТАЦАА**ГГАТЦЦ**ТЦГА-3`
3`-ТГЦ**ТТЦГАА**ГГАТАГТТГТГЦТТЦА**ТТЦГАА**ГААТГТТ**ЦЦТАГГ**АГЦТ-5`

5`-ГЦГ**ААГЦТТ**ЦТАТЦААЦАЦГААГТГАТТЦЦТТАЦААЦЦЦАТ**ГААТТЦ**ГА-3`
3`-ЦГЦ**ТТЦГАА**ГАТАГТТГТГЦТТЦАЦТААГГААТГТТГГГТА**ЦТТААГ**ЦТ-5`

Можно ли клонировать эти фрагменты не нарушая их целостности, при помощи плазмид pBR 322 или pUC18?

5.6. Ниже представлена рестрикционная карта фрагмента ДНК, в котором заштрихованная область является структурной частью важного гена.

Можно ли клонировать этот ген, не нарушая целостности его структуры?

5.7. На рисунке ниже приведена рестрикционная карта фрагмента ДНК, заштрихованная часть которого является структурной областью важного гена.

Предложите вариант, позволяющий клонировать этот фрагмент ДНК в плазмиде pUC18, не нарушая целостности структурной части важного гена.

6. Литература

29. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. - М.: Мир, 1988. , ил.
30. **Жимулев И.Ф**. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
31. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности.- Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
32. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии**/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
33. **Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г.** Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002. – 114с.
34. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986.- 186 с.: ил.
35. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
36. **Щелкунов С.Н.** Конструирование гибридных молекул ДНК.- Новосибирск: Наука, 1987- 168 с.
37. **Льюин Б.** Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
38. **Modern genetic analysis/** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
39. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
40. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.
41. **Desmond Nicholl** An introduction to genetic engineering. / Second edition – Cambridge University press. 2002. – 292 p.
42. **Genetics: from genes to genomes.** Hartwell L. et al. – McGraw Hill: Higher education. New York. 2004. – 880 p.

ЗАНЯТИЕ 5

ТЕМА: фаговые и космидные вектора и создание геномных библиотек

<u>ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:</u> Ознакомиться с векторами, созданными на основе фага λ и космидами и получить представление о геномных библиотеках, освоить методы клонирования ДНК в фагах и космидах и способы создание геномных библиотек на примере решения типовых задач

1. Теоретическая часть

В принципе не составляет труда получить тысячи **химерных плазмид,** каждая из которых содержит специфический фрагмент, например ДНК человека, мыши или дрозофилы и посредством **скрининга** большого числа таких плазмид исследовать **весь геном** любого из этих организмов. Однако, как оказалось плазмиды, содержащие **большие вставки хромосомной ДНК** не стабильны и при репликации постепенно уменьшаются в размерах. Это связано с тем, что генетический материал ненужный для размножения плазмиды неизбежно утрачивается.

Большие фрагменты хромосомной ДНК (размером около 15 кб) нестабильные в составе плазмид становятся весьма стабильными при встраивании их в специально сконструированные **штаммы фага λ.** ДНК этого фага сравнительно невелика, гены его хорошо изучены и размножается он в бактериальных клетках очень интенсивно.

При получении **λ векторов** используется то обстоятельство, что вся **центральная часть** молекулы **ДНК фага λ** не нужна для репликации в *E. coli*, а функционирует только при интеграции фаговой ДНК в бактериальную хромосому (в состоянии **лизогении**). Были сконструированы специальные штаммы λ, в ДНК которых сайты для EcoR1 расположены таким образом, что правый и левый **концевые фрагменты фаговой ДНК**, необходимые для репликации остаются нетронутыми. После расщепления с помощью EcoR1 эти концевые фрагменты благодаря их сравнительно большим размерам легко отделить от всех остальных EcoR1-фрагментов и использовать затем для получения новых λ-подобных фагов, каждый из которых содержит **левый и правый концевые фрагменты,** а также **вставку чужеродной ДНК** размером **около 15 кб.** Удобным оказалось то обстоятельство, что для **созревания фага λ** его ДНК должна иметь длину около 45 кб, благодаря чему при конструировании химерных ДНК *in vitro* для последующего размножения отбираются только те из них, которые содержат оба конца фаговой ДНК и вставку чужеродной ДНК подходящего размера, т.е. около 15 кб. Этапы клонирования фрагмента ДНК мыши длиной 15 кб в бактериофаге λ, с использованием рестриктазы EcoR1 и соответствующих сайтов рестрикции в **геномах фага и мыши** представлены на рис. 1.

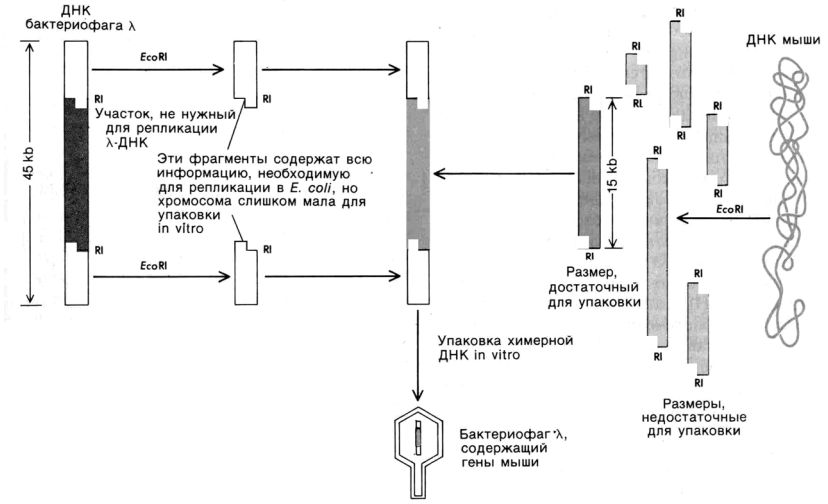


Рис. 1. Клонирование генов ДНК мыши в бактериофаге λ, с использованием рестриктазы EcoR1 и соответствующих сайтов рестрикции в геномах фага и мыши.

Многие гены эукариот оказались длиннее 15 кб, а некоторые достигают 35-40 кб. Кроме того, **клонирование в фаге λ** обычно не позволяет выделить два соседних гена в виде единой молекулы рекомбинантной ДНК. Поэтому клонирование значительно более длинных фрагментов ДНК в *E. coli* проводится в **космидах**.

Космиды - это искусственные конструкции, созданные на основе плазмид и фага λ. Космида имеет **последовательность *ori***, позволяющую ей реплицироваться в *E. coli*, **селекционный маркёр *amp*^{r}**, **полилинкер** (сайт множественного клонирования) и так называемые ***cos*-сайты** встроенные из фага λ. *Cos*-сайты представляют из себя расположенные на обоих концах молекулы ДНК фага λ комплементарные одноцепочечные участки величиной 12 нуклеотидов, благодаря которым линейная форма фага соединяясь со своим соседом через *cos*-сайт образует длинную цепь из сотен фаговых ДНК или **конкатамер**. Ферменты, катализирующие упаковку фаговой ДНК узнают в конкатемере два *cos*-сайта находящихся на расстоянии 35-45 кб выщепляют расположенную между ними ДНК и упаковывают её в **головку фага**. Поэтому, когда в относительно небольшую космиду, несущую *cos*-сайты, встраивается чужеродная ДНК размером 35-45 кб, молекула достигает необходимой длины что бы упаковаться в фаговую частицу. Затем полученные фаги, несущие вставленную чужеродную ДНК вводятся в клетки *E. coli* для последующего размножения (клонирования).

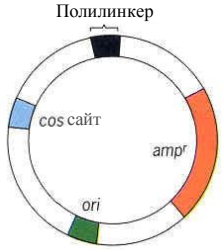


Рис. 2. Структура типичного космидного вектора, объединяющего свойства фага λ и плазмиды.

На следующем этапе развития генной инженерии учёные начали включать в векторы все гены различных организмов. Иными словами они начали создавать **генные банки** или **генные библиотеки**.

Генные инженера, **раздробив** с помощью **определённой рестриктазы (техника «дробовика») суммарную ДНК конкретного организма** на фрагменты, добавляют к ним вектор, обработанный той же рестриктазой, и всю эту смесь используют для **трансформации бактерий**. Обычно в каждую рекомбинантную клетку имеет шанс попасть одна молекула ДНК, представляющая собой гибрид вектора и какого-нибудь одного из многих фрагментов присутствовавших в смеси. Клетка, получившая гибридную ДНК, размножившись, образует клон. **Набор клонов** бактерий содержащих различные рекомбинантные молекулы, включившие все возможные фрагменты ДНК определённого организма и составляют **геномную библиотеку (банк генов)**. Техника «дробовика» позволила получить **набор клонов бактерий** или **гибридных фагов** различающихся по включённым фрагментам ДНК. Уже в 1974 г. Д. Хогнес с сотрудниками создали **геномную библиотеку дрозофилы** в клетках *E. coli*. Через два года американцы Л. Кларк и Д. Карбон стали владельцами **библиотеки всех генов** самой

бактерии ***E. coli***. Вслед за этим были получены **геномные библиотеки** ряда других **организмов**, включая **человека**.

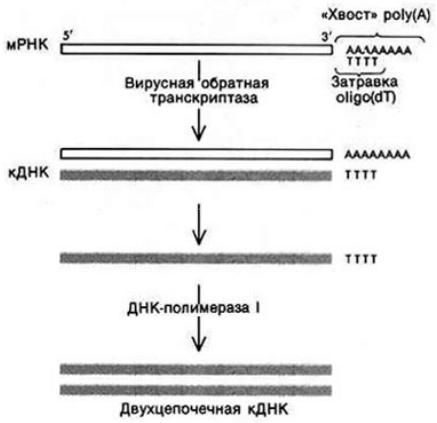


Рис. 3. Синтез двухцепочечной кДНК на мРНК. С poly(A) «хвостом» мРНК гибридизуют короткий фрагмент oligo(dT). Этот - фрагмент служит затравкой для обратной транскриптазы, которая использует мРНК в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК. Оставшуюся мРНК разрушают обработкой NaOH, и с помощью ДНК-полимеразы I завершают синтез второй цепи ДНК, в результате чего получается двухцепочечная

Допустим, что у нас уже есть геномная библиотека какого-то животного, скажем морской свинки. Мы получили эту библиотеку выделив из клеток свинки ДНК, расщепив её подходящей рестриктазой на фрагменты, встроив эти фрагменты в вектор и введя полученную рекомбинантную ДНК, например в *E. coli.* Но в какую из тысяч трансформированных клеток *E. coli* попал интересующий нас ген? Для решения этой задачи поиска иголки в стоге сена, в настоящее время применяются так называемые **кДНКовые зонды,** которые представляют собой радиактивно меченную ДНК характерную для конкретного гена.

Но сначала учёные научились выделять в достаточных количествах мРНК отдельных генов. Дело в том, что практически все мРНК эукариот на своих 3' концах содержат **последовательность poly(A)**. Эта поли(А) последовательность предоставляет прекрасную возможность для синтеза ДНК комплементарной мРНК. Если смешать с мРНК **короткие oligo(dT),** они будут гибридизоваться с poly (A) и послужат затравками для работы фермента **обратная транскриптаза** (рис. 3). Этот интересный фермент открытый Тёминым и Балтимором использует РНК как матрицу для синтеза **комплементарной цепи ДНК или кДНК (cDNA).** Необходимо отметить, что она соответствует только **структурной части гена,** которая кодирует его белковый продукт, а **регуляторные части гена** в кДНК не представлены.

Полученная с помощью обратной транскриптазы **двухцепочечная молекула кДНК** встраивается затем в плазмиду либо с помощью «хвостов» достроенных **концевой трансферазой**, либо путём пришивания к **концам кДНК** искусственных сайтов рестрикции. Эти сайты, так называемые **линкеры** представляют собой последовательности, состоящие из 8-10 нуклеотидных пар химически синтезированных олигонуклеотидов. Линкеры пришивают к двухцепочечной кДНК с помощью ДНК-лигазы, а затем расщепляют их рестриктазой, и кДНК, содержащую теперь липкие концы встраивают в плазмиду разрезанную той же рестриктазой. Затем, полученную рекомбинантную плазмиду, содержащую кДНК вводят в клетки соответствующего штамма *E. coli*, где она размножается.

В настоящее время разработаны специальные **методы скрининга** (поиска), позволяющие с помощью кДНК используемых в качестве зондов обнаруживать нужные гены, хранящиеся в геномных библиотеках. Чаще всего геномная библиотека хранится в *E. coli* в виде набора бактериальных колоний, каждая из которых содержит различный фрагмент геномной ДНК. Если в чашках Петри к поверхности плотной среды, на которой посеяны различные колонии *E. coli*, хранящие геномную библиотеку приложить **фильтр из нитроцеллюлозы** каждая колония разделится – часть останется на чашке, а часть отпечатается на фильтре (рис. 4). Под действием раствора щелочи бактерии на фильтре **лизируются**, а ДНК распадается на однонитчатые цепочки. После того как фильтр прогреют при высокой температуре в вакуумной печи, цепи ДНК прочно свяжутся с нитроцеллюлозой. Затем на фильтр наносят радиоактивно меченную кДНК

Рис. 4. Идентификация бактериальных колоний, содержащих плазмиду со вставкой фрагмента геномной ДНК. Конструируют библиотеку геномной ДНК, например в pBR322 и трансформируют ею *E. coli,* после чего получают «реплику» образовавшихся колоний на нитроцеллюлозном фильтре. Бактерии с рекомбинантной плазмидой, содержащей последовательности, гомологичные последовательности меченого зонда, гибридизуются и выявляются радиоавтографически. Затем на исходной чашке отыскивают колонию, локализованную там же, где и соответствующая колония на фильтре-реплике.

интересующего гена. **Меченный кДНК-зонд** будет комплементарно гибридизоваться только с фрагментом геномной ДНК содержащим искомый ген. Если на нитроцеллюлозный фильтр положить рентгеновскую плёнку, то местоположение метки можно определить по участкам затемнения. Этот метод называемый **ДНК-ДНК гибридизацией** даёт возможность узнать в какой колонии бактерий находится наш ген. Колонии отбирают, выделяют из неё ДНК и анализируют. Убедившись, что нужный ген «пойман», решают, как изучать его строение, определить функции, как заставить его работать в новых хозяевах и нельзя ли улучшить его свойства.

2. Ключевые слова и понятия

химерные плазмиды	**трансформация бактерий**
большие вставки хромосомной ДНК	**набор клонов бактерий**
штаммы фага λ	**набор клонов гибридных фагов**
λ вектор	**геномная библиотека дрозофилы**
центральная часть ДНК фага λ	**библиотеки всех генов *E. coli***
лизогения	**кДНКовые зонды**
концевые фрагменты фаговой ДНК	**последовательность poly(A)**
созревание фага λ	**короткие oligo(dT)**
геном фага λ	**обратная транскриптаза**
геном мыши	**ДНК полимераза 1**
клонирование в фаге λ	**комплементарная цепь ДНК**
космиды	**кДНК (cDNA)**
последовательность *ori*	**структурная часть гена**
селекционный маркёр *amp*^{r}	**регуляторная часть гена**
полилинкер	**линкеры**
***cos*-сайты**	**двухцепочечная молекула кДНК**
конкатамер	**концевая трансфераза**
головка фага	**методы скрининга**
генные банки	**фильтр из нитроцеллюлозы**
геномные библиотеки	**лизирование**
техника «дробовика»	**меченный кДНК-зонд**
суммарная ДНК организма	**ДНК-ДНК гибридизация**

3. Примеры решения задач

3.1. Из семнадцатой хромосомы мыши удалось выделить интересный ген, расположенный во фрагменте ДНК величиной около 9 кб. Причем по обоим краям этого фрагмента имеются сайты рестрикции для фермента EcoR1. Можно ли успешно клонировать этот фрагмент ДНК мыши в бактериофаге λ?

Решение:

Успешно клонировать фрагмент ДНК мыши величиной 9 кб в бактериофаге λ не удастся. Даже если этот фрагмент мыши на краях имеет сайты рестрикции для фермента EcoR1 и успешно встроится в ДНК бактериофага λ, все равно ДНК фага не достигнет размера 45 кб, т.е. окажется слишком мала для того, чтобы упаковаться в белковую оболочку (головку фага) и соответственно не сможет успешно размножаться (клонироваться).

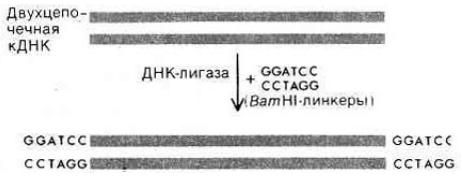
3.2. Исследователям в ходе трудоёмких экспериментов по мРНК, используя фермент обратную транскриптазу удалось получить кДНК гена Adh крысы. Для дальнейших экспериментов потребовалось большое количество кДНК этого гена.

Каким оптимальным способом исследователям можно клонировать кДНК гена Adh крысы для наработки его достаточного количества?

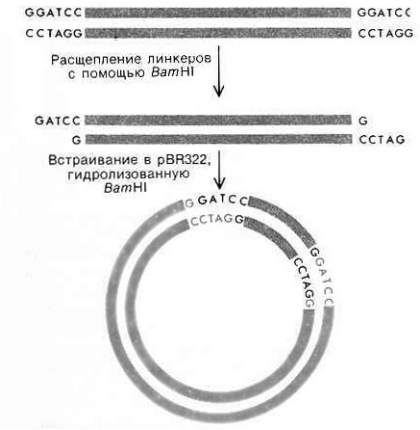
Решение:

Полученную кДНК гена Adh крысы можно успешно клонировать в плазмиде pBR322, трансформировав ею *E. coli*.

На первом этапе к концам двухцепочечной кДНК гена Adh нужно с помощью фермента ДНК-лигазы пришить Bam 1 линкеры.



Затем с помощью рестриктазы Bam 1 необходимо расщепить линкерные участки и кДНК, содержащую теперь липкие концы встроить в плазмиду pBR322 разрезанную той же растриктазой.



И наконец полученную рекомбинантную плазмиду, содержащую нашу кДНК нужно ввести в клетки штамма *E. coli*, где она будет клонироваться (размножаться). Причём трансформированные нашей рекомбинантной плазмидой штаммы *E. coli* будут успешно размножаться в чашках Петри только на культуральных средах не содержащих тетрациклин, поскольку введённая кДНК по рестрикционному сайту Bam1 нарушит целостность гена Tc^r в плазмиде pBR322.

4. Задачи для самоконтроля

4.1. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно клонировать в бактериофаге λ?

5`-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТЦАЦАТГ-3`
3`-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦ ТТЦГААГТГТАЦ-5`

4.2. Из семнадцатой хромосомы человека удалось выделить интересный ген, расположенный во фрагменте ДНК величиной около 8 кб. На флангах этого фрагмента имеются сайты рестрикции для фермента EcoR1. Можно ли успешно клонировать этот фрагмент человеческой ДНК в бактериофаге λ?

4.3. Четвертичная структура человеческого белка – гемоглобина состоит из двух α- и двух β-глобиновых полипептидных цепочек. В состав одной полипептидной цепочки β-глобина входит 154 аминокислот.

Какова будет величина соответствующей β-глобиновой кДНК, выраженной в

нуклеотидных парах?

4.4. В геноме эукариотического организма имеется сложный тандемно дуплецированный ген. Величина ДНК одной копии этого гена составляет чуть больше 20 кб.

Сумеют ли генные инженера в своём арсенале найти подходящий вектор для клонирования тандемной копии данного гена?

4.5. Получен интересный фрагмент двухцепочечной человеческой ДНК с тупыми концами величиной около 200 нуклеотидных пар. Причем, в этом фрагменте не оказалось сайтов рестрикции для удобных рестриктаз, расщепляющих ДНК с образованием липких концов.

Удастся ли успешно клонировать этот фрагмент человеческой ДНК в известных вам плазмидах?

4.6. Исследователям в ходе трудоёмких экспериментов по мРНК, используя фермент обратную транскриптазу, удалось получить кДНК гена Pgm дрозофилы. Для дальнейших экспериментов потребовалось большое количество кДНК этого гена.

Каким способом исследователям можно клонировать кДНК гена Pgm дрозофилы для наработки его достаточного количества?

4.7. В лаборатории, используя обратную транскриптазу, удалось получить кДНК важного гена человека. Возникла естественная необходимость в получении большое количество кДНК этого гена.

Какая последовательность должна быть у линкера для этой кДНК что бы можно было её клонировать в плазмиде pBR322 по маркёру устойчивости к ампиницилину?

4.8. Как уже отмечалось, гаплоидный геном дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae,* состоящий из одной хромосомы, содержит около 13,5 $\times 10^6$ нуклеотидных пар ДНК. При создании геномной библиотеки дрожжевого грибка использовали рестрикционный фермент EcoRI. Полученные фрагменты были встроены в вектор и клонированы в *E. coli.*

Сколько различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК *Saccharomyces cerevisiae* составляют геномную библиотеку этого вида?

4.9. Поскольку рестриктаза EcoRI узнаёт последовательность ДНК, состоящую из шести нуклеотидов то она будет разрезать молекулу двухцепочечной ДНК в среднем один раз на 4096 нуклеотидных пар.

Можно ли клонировать какие либо фрагменты ДНК дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae* в фаге λ если они были разрезаны ферментом EcoRI?

4.10. Геном *Drosophila melanogaster,* состоящий из четырёх хромосом, содержит около 10^8 нуклеотидных пар ДНК. При создании геномной библиотеки дрозофилы меланогастер также использовали рестрикционный фермент EcoRI, а полученные фрагменты были встроены в вектор и клонированы в *E. coli.*

Сколько различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК *Drosophila melanogaster* составляют геномную библиотеку вида в данном случае?

4.11. В ходе создания геномной библиотеки человека использовали рестрикционный фермент Not I, узнающий октамерную последовательность ГЦГГЦЦГЦ, а полученные фрагменты были встроены в вектор и клонированы в *E. coli.*

Каково в этом случае будет минимальное число различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК в составе геномной библиотеке человека?

4.12. Исследователи получили кДНК для белка морской свинки. Используя эту кДНК в качестве радиоактивно меченного зонда было проведено скринирование геномной библиотеки и найден клон содержащий структурный ген для данного белка.

Будут ли отличаться электрофоретические спектры этой кДНК и образца ДНК найденного структурного гена после электрофореза в агарозном геле?

4.13. С помощью полученной радиоактивно меченной кДНК для белка человека был проведён скрининг геномной библиотеки и найден клон, содержащий структурный ген для данного белка.

Как будет выглядеть электрофореграмма после электрофореза в агарозном геле образца этой кДНК и образца ДНК найденного структурного гена?

4.14. Была получена кДНК для важного белка морской свинки. У этой кДНК отсутствует сайт рестрикции для фермента EcoRI. Когда эта кДНК была использована как радиоактивный зонд для блот-гибридизационного анализа с фрагментами геномной ДНК свинки, порезанной EcoRI, то на радиограмме после Саузерн-блот анализа в образце ДНК свинки присутствовали три фракции (рис. 5).

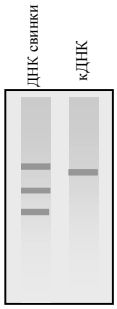


Рис. 5. Авторадиограмма фрагментов ДНК после Саузерн-блот анализа.

Могут ли полученные три фракции на радиограмме свидетельствовать о том, что в геноме морской свинки имеется три копии гена для этого важ-ного белка?

5. Задачи повышенной сложности

5.1. Каким образом можно выделить из геномной библиотеки человека насчитывающий много тысяч различных клонов *E. coli* структурный ген кодирующий молекулу β-глобина?

5.2. Была получена кДНК для важного белка зеленой мартышки. Эта кДНК была использована как радиоактивный зонд для Саузерн-блот гибридизационного анализа с фрагментами геномной ДНК мартышки, порезанной рестрикционным ферментом Hind III. Авторадиограмма фрагментов геномной ДНК и кДНК этого гена, расщепленных ферментом HindIII представлена на рисунке справа (рис. 6).

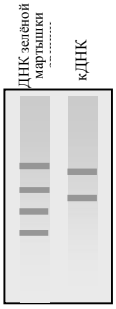


Рис. 6. Авторадиограмма фрагментов ДНК зеленой мартышки после Саузерн-блот анализа.

Почему, в результате обработки рестрикционным ферментом HindIII, после Саузерн-блот гибридизации электрофоретический спектр образцов геномной ДНК для этого важного белка мартышки состоит из четырех фракций, тогда как кДНК только из двух?

6. Литература

43. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. – М.: Мир, 1988., ил.
44. **Жимулев И.Ф**. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
45. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности. Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
46. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии**/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
47. **Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г.** Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002. – 114 с.
48. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986. – 186 с.: ил.
49. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – 288 с., ил.
50. **Щелкунов С.Н.** Конструирование гибридных молекул ДНК. – Новосибирск: Наука, 1987. – 168 с.
51. **Льюин Б.** Гены: – Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 544 с., ил.
52. **Modern genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
53. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.

54. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

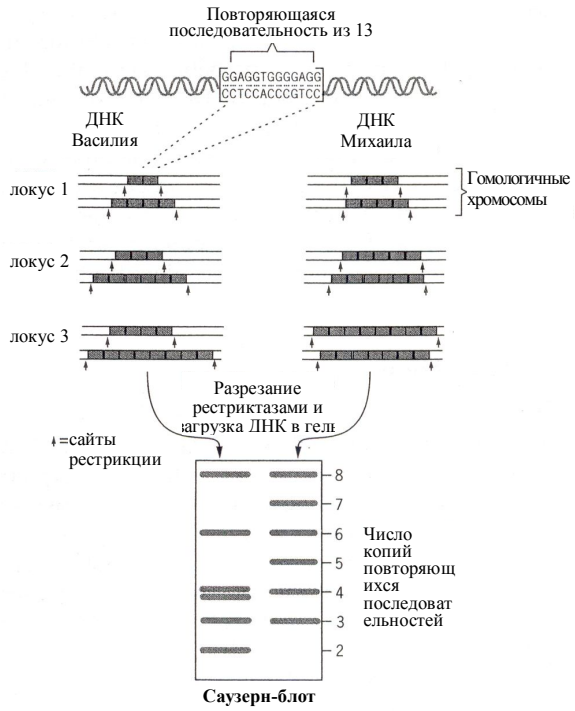


Рис. 1. Упрощенная схема использования вариабельного числа тандемно повторяющихся последовательностей в проведении фингерпринта ДНК

ЗАНЯТИЕ 6

ТЕМА: Генная дактилоскопия и полный сиквенс (прочтение) нуклеотидных последовательностей ДНК

<u>ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:</u> Ознакомиться с методом генной дактилоскопии (фингерпринта ДНК) у человека и методами прочтения (секвенирования) ДНК у разных видов на примере решения типовых задач

1. Теоретическая часть

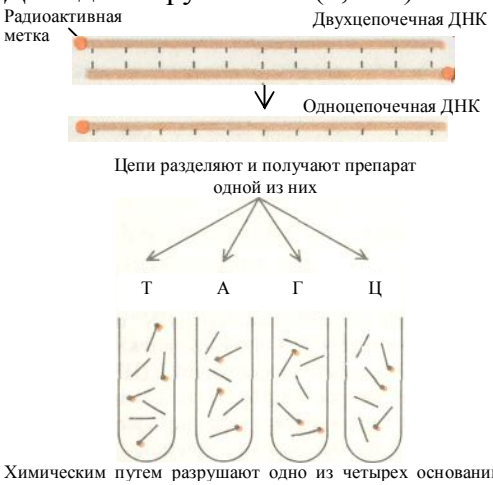
В геноме каждого человека имеется так называемая **минисателлитная ДНК.** В основе её строения лежит **строгая последовательность** состоящая **из 13 нуклеотидов**. Цепочка одной **минисателлитной ДНК** может насчитывать таких повторяющихся последовательностей от одной до нескольких тысяч. У людей имеется два и более десятков **минисателлитных цепочек** расположенных на разных хромосомах. В совокупности они образуют набор минисателлитных ДНК различающихся по длине. Было обнаружено, что **для каждого человека характерен** свой, присущий только ему **вариант набора** таких **тандемно повторяющихся последовательностей отличающихся по длине**, то есть по числу отдельных звеньев. Иными словами ситуация оказалась сходной с отпечатками пальцев человека у каждого имеется собственная минисателлитная ДНК. Поэтому и метод анализа фрагментов минисателлитной ДНК получил название **генной дактилоскопии (фингерпринт ДНК).**

Технология генной дактилоскопии включает ряд хорошо разработанных и уже рассмотренных нами методов. Сначала из каких либо клеток выделяют ДНК и с помощью рестриктаз разрезают её на фрагменты разной длины. Среди фрагментов естественно будут те, которые содержат **вариабельные минисателлиты.** Далее проводится стандартный Саузерн-блот анализ. Все полученные фрагменты подвергаются электрофорезу в геле и **фракции содержащие минисателлитную ДНК** выявляются с помощью специального меченого зонда комплементарного к звену из 13 повторяющихся нуклеотидов. Так как зонд радиоактивен, то он засвечивает ренгеновскую плёнку только в определённых местах, давая картину из нескольких десятков чередующихся темных фракций, соответствующих отдельным минисателлитам. Схематическое изображение этапов использования **вариабельного числа тандемных повторов** при проведении фингерпринта ДНК представлена на рис. 1.

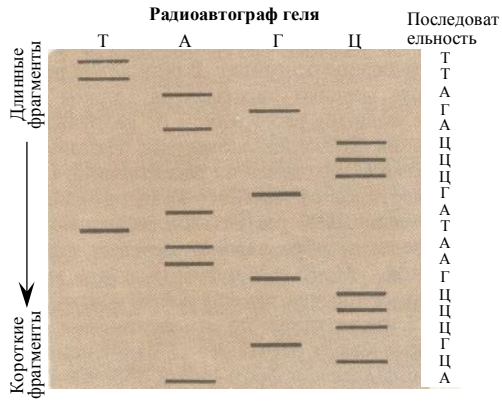
Для двух людей картина на авторадиограмме существенно отличается как по числу, так и по расположению и интенсивности фракций. Чем более родственны анализируемые особи, тем число сов-падающих полос после **фингерпринта ДНК** будет больше и наоборот. Полностью совпадающие спектры **минисателлитной ДНК** выявляются только у однояйцевых близнецов. Следует добавить, что метод фингерпринта минисателлитной ДНК обладает высокой чувствительностью и анализ можно проводить на одной капле крови или нескольких волосяных луковиц.

Фингерпринт, Саузерн блоттинг и другие методы анализа рестрикционных фрагментов ДНК дали возможность сделать много важных открытий в генной инженерии, но настоящим успехом стала разработка **методов сиквенирования фрагментов ДНК** длиной 100-500 нуклеотидных пар. Первый прямой **метод определения**

последовательности ДНК был предложен Ф. Сэнгером в 1975 г. Он основан на **элонгации ДНК** при помощи фермента **ДНК-полимеразы**. Этим способом была быстро сиквенирована короткая ДНК фага φx174, длиной 5,4 кб. Столь же мощный метод сиквенса ДНК был разработан А. Максамом и У. Гилбертом в 1977 г. в Гарвардском университете. С его помощью менее чем за год удалось установить последовательность ДНК для вируса sv-40 (5,2 кб) и плазмиды pBR322 (4,3 кб).



Химическим путем разрушают одно из четырех оснований, в результате чего происходит расщепление цепи в соответствующих точках. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы в каждой точке расщеплялись только некоторые из цепей; при этом получается набор фрагментов разной длины



С помощью электрофореза в геле фрагменты разделяются по размеру; те из них. которые содержат радиоактивную метку, оставляют «отпечатки» на рентгеновской пленке. По положению этих отпечатков можно определить, какое именно основание было разрушено при образовании каждого из радиоактивных фрагментов

Метод **сиквенирования ДНК по Максамому-Гилберту** заключается в следующем. Один из концов фрагмента ДНК, последовательность которого нужно прочитать (секвенировать) метят с помощью ^{32}P. **Препарат меченой ДНК** делят на четыре порции и каждую из них обрабатывают реагентом, специфи-чески разрушающим одно из четырех оснований ДНК. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений. Когда эти повреждённые молекулы обрабатывают пиперидином, в ДНК образуется разрыв в том месте, где находилось разрушенное основание. В результате получается **набор меченых фрагментов**, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца молекулы. Например, если остатки Г находятся на расстоянии 2, 6, 11 и 16 нуклеотидов от меченого конца, как в случае рассмотренном на рисунке слева, то обработка данной цепи ДНК реагентами, разруша-ющими Г, приведёт к образованию меченых фрагментов длиной 2, 6, 11 и 16 нуклеотидов (при этом, естественно образуются еще и фрагменты длинной 3 и 4 нуклеотида, но эти фрагменты расположенные между остатками Г будут не меченными). Наборы меченых фрагментов, образующихся при каждой из четырёх реакций подвергают электрофорезу в соседних дорожках полиакриламидного геля, при этом происходит разделение фрагментов ДНК в соответствии с их размерами. Затем проводят радиоавтографию геля. Набор полос, регистрируемых на рентгеновской плёнке, «**читают**», определяя таким образом **нуклеотидную последовательность ДНК**. Так в примере представленном на рисунке стр. 65 последовательность цепочки ДНК от меченого конца будет следующая АЦГЦЦЦГААТАГЦЦЦАГАТТ.

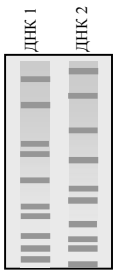
Для анализа последовательностей ДНК широко используется также метод Сэнгера основанный на использовании дидезокси нуклеотидов.

В последние годы вместо радиоактивных меток при анализе последовательностей ДНК используются флюорисцентное окрашивание. Флюорисцентные красители разного цвета применяются для каждого из четырёх нуклеотидов и четыре смеси электрофорезируются вместе. Флюорисцентный анализ позволяет определять последовательность ДНК автоматически, что даёт возможность прочитывать более 1000 нуклеотидных пар за одну операцию.

2. Ключевые слова и понятия

минисателлитная ДНК **строгая последовательность из 13 нуклеотидов** **минисателлитная цепочка** **тандемно повторяющиеся последовательности** **генная дактилоскопия** **фингерпринт ДНК** **гипервариабельные минисателлиты** **участки минисателлитной ДНК отличающиеся по длине**	**методы сиквенирования фрагментов ДНК** **метод определения последовательности ДНК** **элонгация ДНК** **ДНК-полимеразы** **сиквенирование ДНК по Максамому-Гилберту** **препарат меченой ДНК** **набор меченых фрагментов** **«чтение» нуклеотидной последовательности ДНК**

3. Примеры решения задач

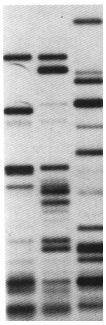


3.1. Образцы человеческой ДНК обработанные рестриктазами были проанализированы методом фингерпринта с использованием радиктивно меченого зонда комплементарного к звеньям минисателлитной ДНК. Схематическое изображение радиограммы проведённого фингерпринта ДНК представлены на рисунке справа.

Исходя из характера спектра укажите у одного или двух человек была взята ДНК для анализа?

Решение:

В каждом спектре образцов ДНК представленных на радиограмме с права насчитывается по 10 фракций. Поскольку только 1 фракция у двух образцов полностью совпадает, в то время, как по 9 фракциям имеются чёткие отличия можно однозначно заключить, что ДНК 1 и ДНК 2 взята для фингерпринта у двух неродственных индивидуумов.

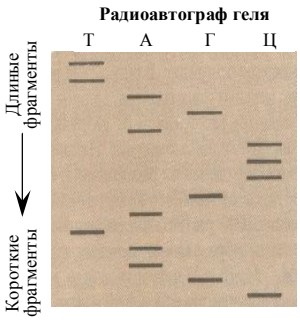


3.2. На рисунке справа представлено изображение радиограммы образцов ДНК трёх человек, проанализированых методом фингерпринта с использованием радиктивно меченого зонда, комплементарного к звеньям минисателлитной ДНК.

Исходя из характера спектра на радиограмме ДНК полученной в результате фингерпринта укажите возможно ли наличие родственных связей у проанализированных трёх человек?

Решение:

Родственные связи возможны только между исследованными индивидуумами №1 и №2, поскольку из первых 15 фракций ДНК у них совпадает 5. В тоже время индивидуум №3 не может иметь с двумя первыми никаких родственных связей, т. к. из 17 первых фракций у него с ними не совпадает ни одной ни по интенсивности, ни по электрофоретической подвижности.



3.3. Нуклеотидная последовательность короткого рестрикционного фрагмента ДНК длинной в 15 нуклеотидов была сиквенирована методом Максама-Гилберта.

На основе спектра представленного на радиограмме

справа определите (прочитайте) нуклеотидную последовательность фрагмента ДНК.

Решение:

Суть метода прочтения (определения) нуклеотидной последовательности по результатам электрофореза на радиоавтографе геля заключается в следующем. Чтение нуклеотидной цепочки начинается с радиоактивно меченого конца. Чем короче радиоактивный фрагмент на геле, тем ближе искомый нуклеотид расположен к началу цепочки. Поэтому самый короткий радиоактивный фрагмент и соответственно первый нуклеотид располагаются в самой нижней части геля. На нашей радиограмме это нуклеотид Ц, второй Г, третий и четвёртый А, пятый Т, шестой А и т.д. вверх по радиоавтографу геля.

Таким образом нуклеотидная последовательность короткого рестрикционного фрагмента ДНК из 15 нуклеотидов по результатам сиквенирования представленного на данной радиограмме следующая: ЦГААТАГЦЦЦАГАТТ.

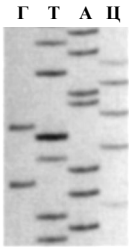


Рис. 2. Схема радиограммы сиквенса ДНК человека

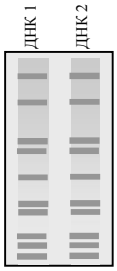
3.4. Используя для анализа электрофоретический спектр, представленный на радиограмме рис. 2 определите коэффициент специфичности нуклеотидного состава для ДНК человека по результатам сиквенирования 20 нуклеотидов в данном рестрикционном фрагменте ДНК.

Решение:

Первый нуклетид в данном фрагменте будет Т, второй А, третий Т, четвертый Ц и т.д. вверх по радиоавтографу геля.

В целом нуклеотидная последовательность рестрикционного фрагмента ДНК из 20 нуклеотидов по результатам сиквенирования представленного на радиограмме (рис. 2) следующая: ТАТЦАГАТЦТГЦААЦ-ТЦАТА. Соотношение нуклеотидных пар Г+Ц к А+Т, составляющих коэффициент специфичности для данного фрагмента ДНК человека будет 7/13 или 0.53.

4. Задачи для самоконтроля



4.1. На рисунке справа представлено схематическое изображение радиограммы образцов человеческой ДНК, проанализированных методом фингерпринта с использова-нием радиктивно меченого зонда комплементарного к звеньям минисателлитной ДНК.

Исходя из характера спектра укажите у одного или двух человек была взята ДНК для анализа?

4.2. Если образцы человеческой ДНК представленные на радиограмме в предыдущей задаче были взяты у двух человек, то в какой степени родства по отношению друг к другу они находятся?

4.3. Образцы ДНК, взятые у матери, её ребёнка и двух мужчин, претендующих на то, что они являются отцами были проанализированы методом фингерпринта минисателлитной ДНК. Радиограмма полученных спектров ДНК четырёх человек представлена на рис.3.

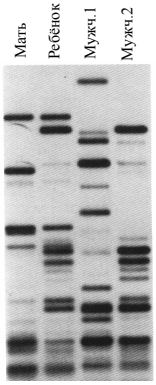


Рис. 3. ДНК фингерпринт матери, ребёнка и двух мужчин.

Проанализируйте представленные спектры ДНК после фингерпринта и укажите, кто из двух мужчин является биологическим отцом данного ребёнка?

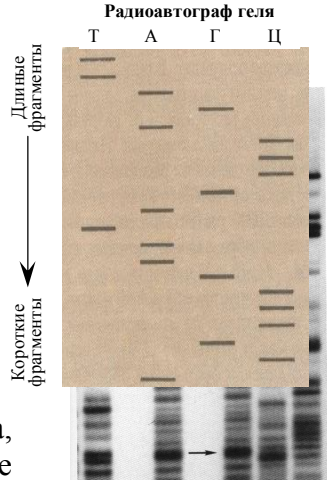


Рис. 4. Фингерпринт ДНК жертвы, предполагаемого преступника и трех

4.4. На месте преступления кроме образцов биологических тканей жертвы были обнаружены образцы волосяных фолликул предполагаемого преступника. Спектры ДНК жертвы и предполагаемого преступника, полученные в результате фингерпринта минисателлитной ДНК представлены на радиограмме, приведенной на рис. 4, на дорожках №1 и №2 соответственно. Был проведен также анализ образцов ДНК трех человек, подозреваемых в совершении данного преступления. Спектры их ДНК расположены на дорожках №№ 3-5.

Исходя из представленных спектров ДНК после фингерпринта укажите, кто из трех подозреваемых является предполагаемым преступником?

4.5. В ходе расследования убийства на месте преступления была обнаружена капля крови принадлежащая убийце. Спектры ДНК данной капли крови, а также семи подозреваемых, полученные в результате фингерпринта минисателлитной ДНК представлены на радиограмме, приведенной на рис. 5. Спектр ДНК образцов капли крови, оставленный преступником на радиограмме отмечен звёздочкой, а спектры семи подозреваемых - цифрами.

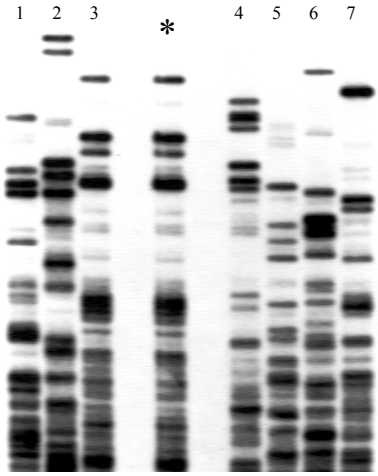


Рис. 5. Фингерпринт спектров минисателлитной ДНК образца капли крови убийцы и семи подозреваемых в преступлении.

Исходя из представленных спектров ДНК образцов крови на радиограмме после фингерпринта, укажите, кто из семи подозреваемых является предполагаемым преступником?

4.6. В ходе молекулярно-генети-ческих экспериментов возникла необходимость установить нуклеотидную последовательность короткого рестрикционного фрагмента ДНК мыши длиной в 20 нуклеотидных пар. Этот фрагмент был сиквенирован методом Максама-Гилберта.

Схематическое изображение радиоавтографа геля, полученного в результате сиквенирования короткого фрагмента ДНК мыши по Максаму-Гилберту представлено на рисунке справа.

Исходя из характера электрофоретического спектра представленного на радиограмме справа определите точную нуклеотидную последовательность рестрикционного фрагмента ДНК мыши длиной в 20 нуклеотидных пар?

4.7. Учёные получили интересный рестрикционный фрагмент ДНК длиной более 60 нуклеотидных пар из генома плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. На рис. 6 приведено схематическое изображение радиоавтографа полиакриламидного геля, полученного в результате сиквенирования по Максаму-Гилберту рестрикционного фрагмента ДНК дрозофилы длиной более 60 нуклеотидных пар.

Используя для анализа электрофоретический спектр представленный на схеме радиограммы (рис. 6) определите точную нуклеотидную последовательность первых 20 нуклеотидов в рестрикционном фрагменте ДНК дрозофилы.

Рис. 6. Схема радиограммы сиквенса ДНК дрозофилы

4.8. По электрофоретическому спектру представленному на радиограмме рис. 6, который был полученному методом Максама-Гилберта определите точную нуклеотидную последовательность первых 40 нуклеотидов в рестрикционном фрагменте ДНК дрозофилы.

4.9. Используя для анализа электрофоретический спектр, представленный на радиограмме рис. 6 определите коэффициент специфичности нуклеотидного состава для ДНК дрозофилы по результатам анализа первых 50 нуклеотидов в данном рестрикционном фрагменте ДНК.

4.10. Была установлена нуклеотидная последовательность короткого фрагмента ДНК дрозофилы состоящий из 30 нуклеотидов. Эта последовательность имела следующий состав: ТЦАЦТГЦЦЦГЦТТТЦЦАГТЦГГГ-АААЦЦТГ.

Как будет выглядеть схема радиограммы сиквенса ДНК для этих 30 нуклеотидов?

4.11. Просеквенированный фрагмент ДНК имеет следующую нуклеотидную последовательность:
ГЦЦАГЦТГЦАТТААТГААТЦГГЦЦААЦГЦГ.

Изобразите схему радиограммы сиквенса ДНК для этих нуклеотидов?

4.12. На рис. 7 приведена радиоавтография полиакриламидного геля, полученного в результате секвенирования по Сэнгеру фрагмента ДНК человека длиной 50 нуклеотидных пар.

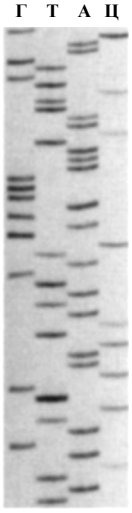


Рис. 7. Схема радиограммы сиквенса ДНК человека

Используя для анализа электрофоретический спектр представленный на радиограмме (рис. 7) определите точную нуклеотидную последовательность первых 20 нуклеотидов во фрагменте ДНК человека.

4.13. Исходя из электрофоретического спектра ДНК представленного на радиограмме рис. 7 определите нуклеотидную последовательность 30 последних нуклеотидов.

4.14. Вычислите коэффициент специфичности для фрагмента ДНК человека на основе результатов секвенирования по Сэнгеру, которые представлены на радиограмме (рис. 7).

5. Задачи повышенной сложности

5.1. Известно, что митохондриальная ДНК передаётся потомкам только с яйцеклеткой, т. е. наследуется по материнской линии. Анализ нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК позволил установить истину в одной почти детективной истории. Долгие годы многие верили, что некая Анна Мэнехен является Анастасией, спасшейся от смерти дочерью русского царя Николая II и его жены Александры (рис. 8). Другие же считали Анну Мэнехен самозванкой. Однако однозначных объективных до-казательств своей правоты ни та, ни другая сторона предоставить не могли.

	Фрагмент митохондриальной ДНК					
Анна Мэнехен	Ц	Ц	Т	Т	Ц	Т
Маучер (ник Мэнехен)	Ц	Ц	Т	Т	Ц	Т
Эдинбургский (ник Александры)	Т	Т	Ц	Ц	Т	Ц

Рис. 8. Семья последнего российского императора Николая II. Царица Александра Фёдоровна вверху справа, Анастасия и Алексей сидят обнявшись.

Ниже приведён фрагмент нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК Анны Мэнехен, её племянника Карла Маучера, а также герцога Эдинбургского, который является племянником последней русской царицы Александры – матери Анастасии.

Исходя из приведённых нуклеотидных последовательностей коротких фрагментов митохондриальной ДНК укажите могла ли Анна Мэнехен являться принцессой Анастасией.

5.2. Считается, что наследственное заболевание гемофилия, вызывающее несвёртываемость крови и широко распространённое в 19 веке в королевских семьях Европы первоначально возникло в результате мутации у английской королевы Виктории, которая была гетерозиготным носителем этой болезни. Именно эту мутацию по гену гемофилии через свою мать царицу Александру унаследовал и младший сын царевич Алексей. Существует большая вероятность того, что принцесса Анастасия, сестра Алексея, могла быть также носительницей гена гемофилии.

Можно ли опираясь на приведенные сведения, а также используя данные задачи 5.1 установить последовательность 6 нуклеотидного фрагмента мтДНК у английской королевы Виктории, супруги последнего русского царя Александры и их детей Анастасии и Алексея?

5.3. Ещё в 1949 г. Лайнус Полинг установил, что наследственное заболевание крови – серповидно-клеточная анемия вызывается мутацией, которая изменяет в гене только 1 нуклеотид в результате чего нарушается функция важнейшего белка - гемоглобина. На рисунке справа (рис.9) представлено схематическое изображение результатов секвенирования короткого начального фрагмента ДНК нормального и мутантного глобинового гена.

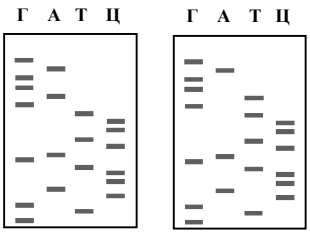


Рис. 9. Схематическое изображение сиквенса короткого фрагмента ДНК нормального (слева) и мутантного (справа) глобинового гена.

Используя результаты сиквенса найдите мутацию в глобиновом гене приводящую к серповидно-клеточной анемии.

5.4. Каков механизм действия серповидно-клеточной мутации по β-глобино-вому гену? При этом необходимо схематически отразить все этапы реализации генетической информации в нормальном и мутантном сайте от гена до фенотипического признака.

5.5. Вся научная общественность с восхищением и надеждой встретила сообщение о результатах успешного клонирования овечки Долли из соматической клетки взрослой овцы. Однако нашлось немало скептиков, которые не верили в то, что Долли произошла из ядра соматической клетки вымени донорской овцы породы Фин Дорсет.

Для того, чтобы развеять все сомнения, молекулярные генетики провели специальный эксперимент на основе использования фингерпринта минисателлитной ДНК. Они взяли образцы геномной ДНК из клеток вымени донорской овцы Фин Дорсет, из культуры клеток вымени донорской Долли, а также из 12 других овец, из клеток крови разрезана рестриктазой Mbo1, после чего был проведен электрофорез и Саузерн-блотт анализ с использованием минисателлитного зонда. Спектры ДНК овечки Долли, 12 других овец и клеток вымени донорской овцы Фин Дорсет полученные в результате фингерпринта минисателлитной ДНК, представлены на радиограмме выше (рис. 10).

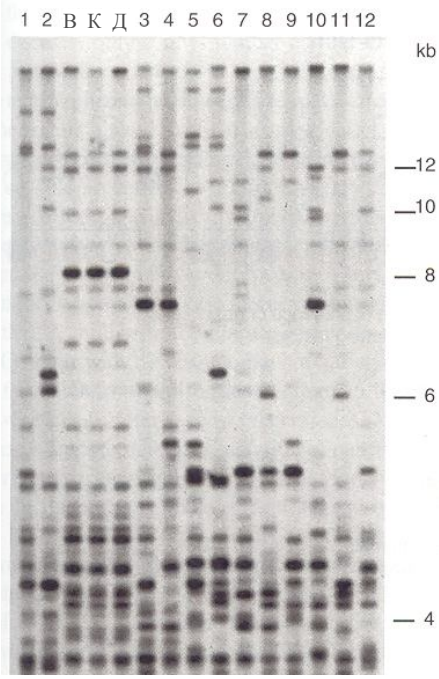


Рис. 10. Фингерпринт образцов геномной ДНК, приготовленных из клеток вымени донорской овцы Фин Дорсет - В, из культуры клеток вымени донорской овцы - К, из клеток крови Долли – Д, и 12 других овец (образцы 1-12).

Могут ли спектры ДНК 15 образцов приведенные на радиограмме после фингерпринта (рис. 10) являться однозначным доказательством того, что Долли произошла из ядра соматической клетки вымени донорской овцы породы Фин Дорсет? Иными словами, была ли Долли успешно клонирована из соматической клетки Фин Дорсет?

5.6. Установлено, что различные мутации в гене, кодирующем трансмембранный белок родопсин, вызывают различные формы наследственного заболевания под названием пигментная ретинопатия (ПР), которое характеризуется прогрессирующей потерей зрения.

Молекулярные генетики провели сиквенирование фрагмента ДНК нормального и мутантного гена ответственного за синтез родопсина. Результаты сиквенирования представлены на рисунке 11.

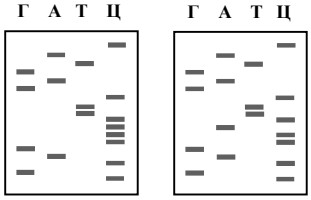


Рис. 11. Схематическое изображение сиквенса фрагмента ДНК нормального (слева) и мутантного (справа) гена родопсина.

Можно ли, основываясь на результатах сиквенирования фрагмента ДНК определить изменения в белке родопсине, приводящие к аутосомно-доминантному наследственному заболеванию пигментная ретинопатия?

6. Литература

55. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. - М.: Мир, 1988. , ил.
56. **Жимулев И.Ф**. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
57. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности.- Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
58. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии**/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
59. **Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г.** Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002. – 114с.
60. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986.- 186 с.: ил.
61. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
62. **Щелкунов С.Н.** Конструирование гибридных молекул ДНК.- Новосибирск: Наука, 1987.- 168 с.
63. **Льюин Б.** Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
64. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
65. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.
66. **Desmond Nicholl** An introduction to genetic engineering. / Second edition – Cambridge University press. 2002. – 292 p.

67. **Genetics: from genes to genomes.** Hartwell L. et al. – McGraw Hill: Higher education. New York. 2004. – 880 p.

ЗАНЯТИЕ 7

ТЕМА: амплификация фрагментов ДНК с помощью метода ПЦР (полимеразной цепной реакции)

<u>ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:</u> Ознакомиться с методом амплификации (размножения) ДНК с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) на примере решения типовых задач

1. Теоретическая часть

Несмотря на то, что методы исследования наследственного материала (нуклеиновых кислот) все время совершенствовались, тем не менее для анализа структуры ДНК требовалось определенное количество клеточного материала. Например, даже при использовании такого чувствительного метода, как **фингерпринт,** требуется наличие капли крови или другого эквивалентного количества образца животной или растительной ткани, содержащих в клетках достаточное для анализа количество копий ДНК.

Ситуация радикально изменилась благодаря появлению метода, который был разработан Кэри Мюллисом. Этот метод получил название **полимеразной цепной реакции (ПЦР)** и стал неотъемлемой процедурой, освоенной во всех генно-инженерных лабораториях мира. Использование ПЦР методики позволяет **амплифицировать (размножать)** ДНК или её фрагмент in vitro увеличивая количество копий **в миллионы раз за несколько часов**. ПЦР осуществляют в пробирке с помощью специального термостабильного фермента ДНК-полимераза **(Tag-полимеразы)**, набора всех четырех нуклеотидов А, Т, Г и Ц и коротких **олигонуклеотидных затравок** – праймеров. **Праймеры** – это короткие, длиной в **20-30 нуклеотидов**, одноцепочечные фрагменты ДНК, комплементарные **3'-концевым последовательностям** копируемой **ДНК-матрицы**. Благодаря праймерам ограничивается фрагмент ДНК, который будет скопирован Tag-ДНК-полимеразой, присоединяющейся к **3'-концам праймеров** и достраивающие их до заданной длины. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) протекает в три стадии (рис. 1).

1. ***Денатурация***. Инкубационную смесь, в которой содержится образец нужной ДНК, нагревают до температуры 90 °С. При этом, в течении 15 секунд происходит разрушение слабых водородных связей между нитями ДНК, и из одной двухцепочечной молекулы образуется две одноцепочечные.

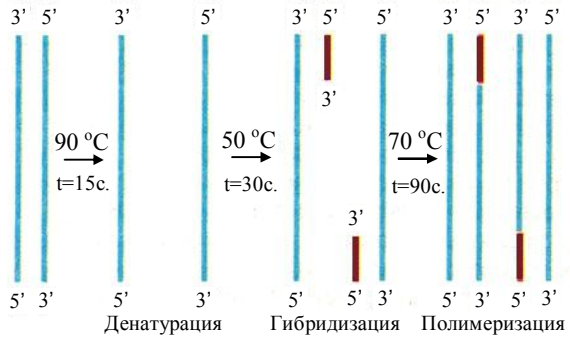


Рис. 1. Последовательные стадии одного цикла амплификации (размножения) фрагмента ДНК с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. ***Гибридизация праймеров***. Температуру снижают до 50 °С. При этом происходит гибридизация цепей ДНК с праймерами. Эта стадия обычно протекает 30 секунд.

3. ***Полимеризация***. Инкубационную смесь нагревают до температуры 70°С. При этой температуре Tag-полимераза удлиняет оба праймера с их 3'-концов. Праймеры дорастают до размеров матрицы. Этот процесс протекает в течении 90 скунд. В результате **количество ДНК удваивается**. Фермент Tag-полимераза была выделена из термофильных бактерий *Thermus aquaticus,* и отличается устойчивостью к высокой температуре. При температуре 70°С гибрид праймер-ДНК не денатурирует, а Tag-полимераза способна работать с большой скоростью. За 20 циклов амплификации

количество копий ДНК достигает величины 10^6.

В последние годы удалось создать специальный прибор -- **амплификатор**, с помощью которого все три стадии размножения ДНК производятся автоматически, что превратило процесс **ПЦР-амплификации** конкретной последовательности ДНК в простую задачу.

За разработку метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в 1993 г. Кэри Мюллис (K. Mullis) был удостоен звания лауреата Нобелевской премии.

ПЦР технологии позволили ученым без огромных временных и материальных затрат получать точные данные по **структуре генов и фрагментов ДНК** при наличии **самого минимального количества** биологического материала. Одним из важнейших применений ПЦР стала **диагностика наследственных заболеваний** человека, особенно на **пренатальных стадиях развития** при наличии малого количества ДНК из **фетальных клеток**. Не менее важным применением ПЦР технологий стала **дактилоскопия и идентификация индивидуумов**, используя материал ДНК, полученный из нескольких сперматозоидов, одного волоса и, в некоторых случаях, даже из одного **бластомера**, выделенного из **зародыша (пре-эмбриона)** на стадии восьми зародышевых клеток. Метод ПЦР успешно используется также для **направленного получения точковых мутаций**.

2. Ключевые слова и понятия

фингерпринт	***Thermus aquaticus***
полимеразная цепная реакция	**амплификатор**
ПЦР	**ПЦР-амплификации**
амплификация	**ПЦР технологии**
праймеры	**диагностика наследственных заболеваний**
15-30 нуклеотидов	**пренатальная стадия развития**
Tag-полимераза	**фетальные клетки**
олигонуклеотидные затравки	**фетус**
ДНК-матрица	**генетическая дактилоскопия и идентификация индивидуумов**
3'-концы праймеров	**бластомеры**
денатурация ДНК	**бластула**
гибридизация праймеров	**амниоцетез**
полимеризация	
количество ДНК удваивается	

3. Примеры решения задач

3.1. Для идентификации членов семьи, захороненных в начале XX в., из костных останков ученым удалось получить лишь около 10 копий небольших фрагментов ДНК, содержащих нужный ген. Такое ограниченное количество копий ДНК не позволяет провести секвенирование и электрофоретический анализ гена, что исключает генетическую идентификацию и дактилоскопию членов семьи.

Каково будет количество копий ДНК нужного гена, если исследователю удастся провести 20 успешных циклов амплификации (размножения) фрагментов ДНК из костных останков, используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)?

Решение:

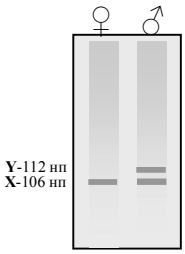
Если исследователю удастся провести 20 успешных циклов амплификации (размножения) фрагментов ДНК из костных останков членов семьи, захороненных в начале XX в., используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), то количество копий ДНК нужного гена составит $10x2^{20}$=10485760. Иными словами, за 20 успешных циклов будет получено более 10 миллионов копий ДНК, содержащих нужный ген. Такого количества копий ДНК будет достаточно для любого молекулярно-генетического анализа, включая фингерпринт и секвенирование.

3.2. У человека ген кодирующий компонент зубной эмали – амелогенин расположен в половых хромосомах X и У. Причем длина этого гена в X хромосоме состовляет 106 нуклеотидных пар, тогда как в У хромосоме он на 6 пар длиннее.

Как будут выглядеть электрофоретические спектры образцов ДНК, гена амелогенина взятых из костных останков мужчины и женщины и амплифицированных (размноженных) методом ПЦР, после электрофореза в агарозном геле?

Решение:

Образцы ДНК, гена амелогенина взятые из костных останков мужчины и женщины и амплифицированные (размноженные) методом ПЦР на электрофореграмме после электрофореза в агарозном геле будут представлены отличаюшимися спектрами. Схематическое изображение электрофореграммы образцов ДНК мужчины и женщины показано на рисунке справа. Поскольку мужской ген амелогенина расположенный в Y хромосоме был размером на 6 нуклеотидных пар тяжелее, то естественно, на фореграмме его фракция будет двигаться медленнее и располагаться ближе к старту. В целом мужской спектр состоит из двух фракций, одна длиной 112 н.п. образованная геном амелогенина Y хромосомы и одна 106 н.п. образованная геном X хромосомы. У женщин имеются 2 X хромосомы, которые производят лишь один фрагмент величиной 106 нуклеотидных пар.



3.3. Во время пожара в помещении погибло 3 молодых человека. Родительская пара хотела бы точно знать, нет ли среди погибших их сына, который накануне не вернулся домой. При молекулярно-генетической дактилоскопии останков 3 погибших генетики выделили ДНК из костей и после ПЦР-амплификации, используя метод фингерпринта ДНК, проанализировали гены А и Б, которые содержат тандемно повторяющиеся последовательности вариабельной длины. Они так же проанализировали эти два гена у родительской пары. Результаты анализа представлены в таблице справа, где число показывает количество копий тандемного повтора в каждом аллеле. Например, у погибшего №3 имеется один аллель с 8, а другой аллель с 9 копиями тандемных повторов в гене А.

Образцы	Ген А	Ген Б
юноша №1	6/8	5/5
юноша №2	7/8	5/7
юноша №3	8/9	7/7
мать	8/8	3/5
отец	7/10	7/7

Исходя из полученных данных, можно ли указать, кто из трех погибших может быть сыном этой родительской пары?

Решение:

Исходя из полученных данных по молекулярно-генетической дактилоскопии ДНК амплифицированной ПЦР из костей останков 3 юношей и результатов анализа методом фингерпринта ДНК, различных аллелей, содержащих тандемные повторы в генах А и Б у погибших и родительской пары (таблица справа), можно однозначно сказать, что сыном этой пары может быть только юноша №2. Поскольку только у него по гену А имеется аллель 7 полученный от отца и аллель 8 от матери, и по гену Б имеется аллель 5 полученный от матери и аллель 7 от отца. Как следует из данных таблицы генотипы двух других юношей не могли возникнуть от брака этой родительской пары.

3.4. Болезнь Хантингтона, как уже отмечалось в занятии 3, является аутосомно-доминантным заболеванием, при котором происходит нейродегенеративное расстройство, приводящее к летальному исходу. Четкие симптомы этой болезни начинают проявляться только у взрослых как правило после 35 лет.

Семья, в которой один из супругов страдает заболеванием Хантингтона, ждёт ребенка. Они хотели бы уже на эмбриональной стадии на основе молекулярной диагностики определить, болен ли этим заболеванием их будущий ребенок.

Выполнима ли эта задача на современном уровне развития генетики?

Решение:

Да, при современном уровне развития генетики эта задача выполнима. В настоящее время имеется возможность молекулярно-генетической диагностики данного заболевания уже у ребенка любого возраста, включая эмбриональную стадию

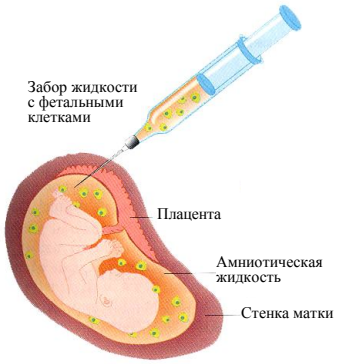


Рис. 2. Процесс изъятия эмбриональных клеток из околоплодной амниотической

на основе метода Саузерн-блот анализа. Для этого на первом этапе при помощи амниоцетеза необходимо изъять несколько эмбри-ональных клеток из околоплодной амниотической жидкости (рис. 2) и провести амплификацию взятого из этих клеток материала ДНК с использованием метода полимеразной цепной реакции. После того, как будет получено достаточное количество ДНК, необходимо провести Саузерн-блот анализ с использованием специального ДНК-зонда (G8). По полученным электрофоретическим спектрам легко установить имеется ли ген заболевания Хантингтона в ДНК их будущего ребенка.

3.5. Перед молекулярными генетиками стояла задача размножить при помощи ПЦР интересный структурный ген мыши длиной 1.2 kb, последовательность которого известна. Ниже приведены только первые и последние 15 нуклеотидов, представляющие соответственно начало и конец данного структурного гена

5'- АТГГЦЦАААЦАГГАГ…….АГТАЦГТТГЦЦТТАА -3'.

Какова должна быть последовательность двух праймеров, с помощью которых можно провести амплификацию указанного гена методом ПЦР.

Решение:

Праймеры должны ограничивать фрагмент ДНК, который будет амплифицирован (размножен) Tag-ДНК полимеразой. В тоже время каждый праймер должен гибридизоваться с разными цепочками молекулы ДНК.

Чтобы облегчить построение необходимых праймеров нужно сначала к первой цепочке достроить вторую (комплементарную) цепочку ДНК нашего гена

5'- АТГГЦЦАААЦАГГАГ…….АГТАЦГТТГЦЦТТАА -3'
3'- ТАЦЦГГТТТГТЦЦТЦ…….ТЦАТГЦААЦГГААТТ -5'

Поскольку ДНК полимераза всегда синтезирует (достраивает) цепочки в направлении от 5' к 3' концам, то праймер №1 фланкирующий (ограничивающий) начало гена должен быть комплементарен кодирующей (3'- 5') цепочки ДНК и поэтому последовательность этого праймера должна быть: 5'- АТГГЦЦАААЦАГГАГ -3'. Второй праймер фланкирующий конец гена мыши должен быть комплементарен не кодирующей (5'-3') цепи двухцепочечной молекулы ДНК, и его последовательность должна быть следующая: 5'-ТТААГГЦААЦГТАЦТ -3'.

3.6. В лаборатории возникла задача не только размножить, но и клонировать в плазмиде pUC18 структурный ген мыши из предыдущей задачи. Как нужно модифицировать праймеры использованные в предыдущей задаче, для того, что бы после амплификации встроить ген мыши в плазмиду по сайтам BamI и EcoRI.

Решение:

Для того, что бы можно было после амплификации встроить данный ген мыши в плазмиду pUC18, необходимо достроить (присоединить) к праймерам из предыдущей задачи нуклеотиды соответствующие сайтам рестрикции для BamI и EcoRI. Тогда праймер №1 для нижней цепочки (3'-5') будет следующим 5'-ГГАТЦЦАТГГЦЦАААЦАГГАГ-3', а праймер №2 для верхней цепочки (5'-3') будет 5'-ГААТТЦТТААГГЦААЦГТ АЦТ-3'.

Поскольку нуклеотиды определяющие сайты рестрикции присоединены к праймерам с 5' конца они не будут препятствовать ДНК-полиме-разе достраивать комплементарные цепи в ходе амплификации.

Схема R-киназного гена

3.7. Многие белки состоят из нескольких доменов, имеющих различную функциональную нагрузку. Так фермент R-киназа имеет три важных функциональных домена. Перед генетиками стала задача изучить функцию домена3. Для этого решили получить белок R-киназу без этого домена путем направленной делеции участка гена ответственного за синтез домена3.

Как будет выглядеть состав двух праймеров, при помощи которых можно

амплифицировать молекулу ДНК с делецией участка гена, кодирующего домен 3, если последовательность ДНК в начале гена и на границе доменов 2 и 3 (граница отмечена вертикальной чертой) имеет следующий состав:

5'- АТГЦТГГТЦЦТТААЦ …….ЦЦААТТГГЦГАГ|ААТЦАГТАТТТА…. -3'.

Решение:

Для облегчения построения праймеров к первой цепочке ДНК достроим вторую

5'- АТГЦТГГТЦЦТТААЦ…….ЦЦААТТГГЦГАГ|**ААТ**ЦАГТАТТТА…. -3'

3'- ТАЦГАЦЦАГГААТТГ…….ГГТТААЦЦГЦТЦ|ТТАГТЦАТАААТ…. -5'

и легко построим первый праймер, который будет иметь последовательность 5'-АТГЦТГГТЦЦТТААЦ-3'.

Что касается праймера №2, то если бы нам нужно было амплифицировать фрагмент гена от начала до конца домена2 + 12 нуклеотидов начальной части домена3 без изменений, он бы выглядел следующим образом 5'-ТАААТАЦТГАТТЦТЦГЦЦААТТГГ -3'.

Но поскольку нам нужно синтезировать белок без домена3, то сразу после последнего триплета, завершающего фрагмент гена, кодирующего домен2, нужно ввести стоп-кодон вместо первого триплета, начинающего домен3. Иными словами, нужно заменить в цепочке 5'-3' первый триплет домена3 ААТ на один из стоп-кодонов, например на ТАА. Следовательно, в самом праймере нужно заменить АТТ на ТТА и тогда праймер №2 будет иметь следующий вид: 5'-ТАААТАЦТГ**ТТА**ЦТЦГЦЦААТТГГ -3'.

Таким образом, при использовании данных праймеров и амплифицированной новой ДНК с делецией по фрагменту, кодирующему домен3, будет транслироваться белок R-киназа только с двумя доменами1 и 2 .

4. Задачи для самоконтроля

4.1. Для генетической идентификации членов семьи, захороненных еще в прошлом веке, генетики из костных останков получили около 20 копий небольших фрагментов ДНК, содержащих нужный ген. Такое ограниченное количество копий ДНК не позволяет провести секвенирование и электрофоретический анализ гена, что исключает генетическую идентификацию и дактилоскопию членов семьи.

Каково будет количество копий ДНК нужного гена, если генетикам удастся провести 10 успешных циклов амплификации (размножения) фрагментов ДНК из костных останков, используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)?

4.2. Для генетической идентификации членов семьи египетского фараона XIX династии Сети I, забальзамированных еще в середине II тысячелетия до н. э., молекулярные генетики из костных останков мумий получили около 10 копий небольших фрагментов ДНК, содержащих нужный для дактилоскопии ген. Такое ограниченное количество копий ДНК не позволяет провести секвенирование и электрофоретический анализ гена, что исключает генетическую идентификацию и дактилоскопию членов семьи египетской династии.

Каково будет количество копий ДНК нужного гена, если генетикам удастся провести 20 успешных циклов амплификации (размножения) фрагментов ДНК из костных останков, используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)?

4.3. Можно ли проанализировать фрагмент ДНК, содержащий нужный для дактилоскопии ген имея в наличии лишь два сперматозоида?

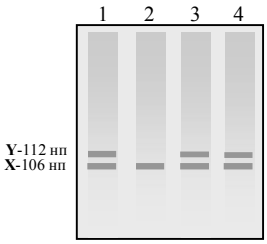
4.4. В ходе расследования убийства на месте преступления была обнаружен лишь один волос, принадлежащий вероятному убийце.

Можно ли провести молекулярно генетический анализ фрагмента ДНК, содержащего нужный для дактилоскопии ген (включая фингерпринт и секвенирование) имея в наличии лишь один человеческий волос?

4.5. У человека ген кодирующий компонент зубной эмали – амелогенин расположен в половых хромосомах Х и У. Причем длина этого гена в Х хромосоме состовляет 106 нуклеотидных пар, тогда как в У хромосоме он на 6 пар длиннее.

Как будет выглядеть электрофоретические спектры образцов ДНК, гена амелогенина взятых из костных останков мужчины и женщины и амплифицированных (размноженных) методом ПЦР, после электрофореза в агарозном геле?

4.6. На электрофореграмме полученной после электрофореза в агарозном геле (рисунок справа) представлены спектры образцов, амплифицированных методом полимеразной цепной реакции ДНК гена амелогенина, взятые из костных останков захоронения четырех представителей одной знатной семьи.



Исходя из представленного электрофоретического спектра четырех образцов, можно ли точно определить, сколько мужчин и сколько женщин находились в захоронении?

4.7. В ходе идентификации останков девяти представителей царской семьи Николая II, расстрелянной в 1918г., был проведен электрофоретический анализ образцов ДНК гена амелогенина из костных останков, амплифицированных методом полимеразной цепной реакции. Полученная электрофореграмма образцов ДНК приведена на рис. 3. Слева в качестве контроля приведены спектры ДНК гена амелогенина синтезированных на матрице геномной ДНК из живых тканей мужчины и женщины.

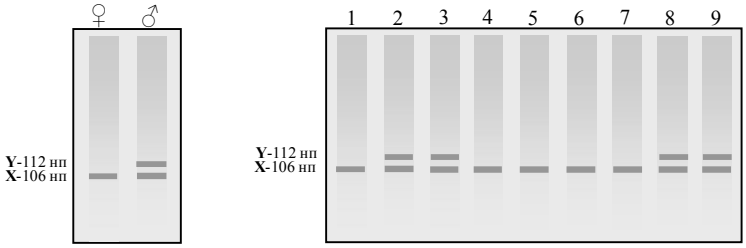


Рис. 3. Электрофореграмма образцов ДНК гена амелогенина из костных останков 9 представителей царской семьи Николая II (слева в качестве контроля спректры ДНК гена амелогенина из живых тканей мужчины и женщины).

Исходя из представленных 9 спектров, останков семьи Николая II определите, сколько женщин находилось в захоронении?

4.8. В калифорнийском лесу было найдено 4 обгоревших трупа. Возникло подозрение, что это могут быть двое детей и родители пропавшей семьи Джонсонов. При молекулярно-генетической дактилоскопии останков 4 погибших генетики выделили ДНК из костей и после ПЦР-амплификации используя метод фингерпринта ДНК проанализировали гены А и Б, которые содержат тандемно повторяющиеся трехнуклеотидные последовательности вариабельной длины. Они так же проанализировали эти два гена еще у живого мужчины, который как подозревали так же мог быть отцом этих детей. Результаты анализа генов А и Б представлены в таблице справа, где число показывает количество копий тандемного повтора в каждом аллеле. Например, у погибшего ребенка 2 имеется один аллель с 7, а другой аллель с 8 копиями тандемных повторов в гене А.

Образцы	Ген А	Ген Б
ребенок 1	8/8	3/7
ребенок 2	7/8	5/7
женщина	8/8	3/5
мужчина 1	7/10	7/7
мужчина 2	8/9	5/7

Исходя из полученных данных может ли женщина быть матерью двух детей?

4.9. На основе полученных данных в предыдущей задаче 4.8, которые представлены в таблице можно ли определить, кто из двух мужчин может быть отцом погибших детей?

4.10. Путем искусственного оплодотворения в пробирке была получена зигота, которая после нескольких делений достигла стадии восьми бластомеров.

Можно ли с помощью специального ДНК-ового зонда провести молекулярный анализ генотипа этого эмбриона (пре-эмбриона) на наличие у него наследственного заболевания циклический фиброз, если использование одного бластомера не повлияет на дальнейшее развитие эмбриона.

4.11. Болезнь Хантингтона, является аутосомно-доминантным заболеванием, при котором происходит нейродегенеративное расстройство, приводящее к летальному

исходу. Четкие симптомы этой болезни начинают проявляться только у взрослых.

В семье, которая ждет ребенка, один из супругов страдает заболеванием Хантингтона. Они хотели бы уже на эмбриональной стадии определить, болен ли этим заболеванием их будущий ребенок. Возможно ли это?

4.12. Аутосомно-рецессивное наследственное заболевание — кисто-фиброз (мукополивисцидос) является одним из тяжелейших заболеваний детского возраста.

В молодой семье первый ребенок оказался больным циклическим фиброзом. Супруги хотели бы уже на эмбриональной стадии определить, болен или нет этим заболеванием их будущий второй ребенок. Возможно ли это?

4.13. Перед молекулярными генетиками стояла задача размножить при помощи ПЦР интересный структурный ген дрозофилы длиной 1 kb, последовательность которого известна. Ниже приведены только первые и последние 15 нуклеотидов, представляющие соответственно начало и конец данного структурного гена

5'- АТГГАЦААТЦАГГАГ…….АГАТЦГТТГЦЦТТАА -3'.

Какова должна быть последовательность двух праймеров, с помощью которых можно провести амплификацию указанного гена методом ПЦР?

4.14. Возникла необходимость не только размножить, но и клонировать в плазмиде pUC18 структурный ген дрозофилы из предыдущей задачи. Как нужно модифицировать праймеры использованные в предыдущей задаче, для того, что бы после амплификации встроить ген дрозофилы в плазмиду по сайтам EcoRI и HindIII.

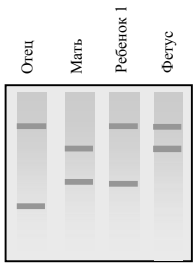
4.15. Фермент фосфоглюкомутаза имеет три важных функциональных домена. Перед генетиками стала задача изучить функцию домена 3. Для этого решили получить фосфоглюкомутазу без домена 3 путем направленной делеции участка гена ответственного за синтез этого домена.

Как будет выглядеть состав двух праймеров, при помощи которых можно амплифицировать молекулу ДНК с делецией участка гена, кодирующего домен 3, если последовательность ДНК в начале гена и на границе доменов 2 и 3 (граница отмечена вертикальной чертой) имеет следующий состав:

5'- АТГААГГТГЦТТЦАЦ …….ГЦААТАГГЦГАЦ|ААЦАГТАЦТТА…. -3'.

5. Задачи повышенной сложности

5.1. Мутантный аллель вызывающий аутосомно-рецессивное наследственное заболевание кисто-фиброз (КФ), в Центральной Европе встречается с частотой 3%. Это заболевание связано с мутацией гена кодирующего регуляторный белок трансмембранной проводимости для ионов хлора (Cftr). Европейская семья, в которой первый ребенок родился с заболеванием КФ, хотела бы точно знать, является ли больным их будущий второй ребенок (фетус). Молекулярные генетики взяли образцы ДНК у каждого члена семьи, включая фетуса (эмбриона) и с помощью метода ПЦР и электрофореза в геле провели анализ микросателлитной ДНК из интронной части гена Cftr. Результаты электрофоретического анализа родителей, первого ребенка и фетуса представлены на рисунке справа.



Исходя из данных молекулярно-генетического анализа микросателлитной ДНК из интронной части гена Cftr представленных на электрофоретическом спектре, можно ли ответить на вопрос родителей о том, больным или здоровым является их будущий второй ребенок (фетус)?

5.2. Используя приведенные в предыдущей задаче электрофоретические данные, по анализу микросателлитной ДНК из интронной части гена Cftr у родителей, первого больного ребенка и фетуса укажите, какова вероятность того, что у второго ребенка (фетуса) после того как он успешно родится, повзрослеет и вступит в брак, появится ребенок с заболеванием кисто-фиброз (КФ).

5.3. Наследственная болезнь Тея-Сакса является аутосомно-рецессивным заболеванием, которая характеризуется недостаточностью лизосомального фермента гексозаминидазы-А. В результате чего в нейронах накапливается ганглиозид G_{M2}. Симптомы заболевания начинают проявляться в возрасте 5 месяцев. В терминальной стадии болезни, которая развивается к 3-4 годам наступает полная обездвиженность, глухота, слепота, трофические нарушения, декортикация и наступает смерть.

В молодой американской семье первый ребенок (девочка) оказался с заболеванием Тея-Сакса и умер в возрасте 4 лет. Супруги естественно хотели бы иметь здорового ребенка. Проведение молекулярно-генетичес-кой диагностики заболевания на эмбриональной стадии путем амниоцитоза для этой семьи не приемлемо по религиозным причинам. Поскольку, если эмбрион окажется вновь с мутантными аллелями, несущими заболевание, супруги не смогут пойти на прерывание беременности, следуя религиозным канонам.

Есть ли какой либо выход для данной семьи в этой ситуации?

5.4. Частота гена, несущего аутосомно-рецессивное наследственное заболевание— кисто-фиброз превышает 6% в популяциях Северной Европы. В исландской молодой семье первый ребенок оказался больным кисто-фибро-зом. У жены взяли 15 яйцеклеток и успешно оплодотворили спермой мужа. Было получено 15 эмбрионов (пре-эмбрионов), достигших стадии развития восьми бластомеров. Фотография восьмиклеточного пре-эмбриона представлена на рисунке справа.

Как отобрать эмбрионы, у которых заболевание кисто-фиброз будет отсутствовать?

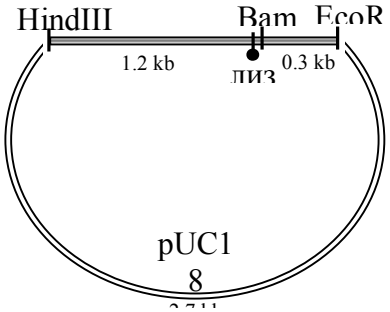
5.5. Исходя из приведенных выше данных по 15 зародышам и генотипам родителей исландской семьи укажите, сколько полученных эмбрионов несут ген заболевания кисто-фиброзом (КФ) в гомозиготном и гетерозиготном состоянии.

5.6. Миотоническая дистрофия (MD) характеризуется прогрессирующей дегенерацией мышц на взрослых стадиях и наследуется по доминантно-аутосомному типу. Этот ген содержит район так называемых расширяющихся (expansed) тринуклеотидных повторов ЦТГ. Нормальные аллели гена MD содержат от 5 до 30 копий ЦТГ, тогда как мутантные от 50 до 2000 копий. В настоящее время вся нуклеотидная последовательность гена миотонической дистрофии установлена.

Опишите молекулярно-генетический тест для диагностики мутантного гена вызывающего заболевание миотоническая дистрофия, используя геномную ДНК новорожденного ребенка и фетальные клетки полученные амниоцитозом и одного бластомера взятого из 8-клеточной бластулы (пре-эмбриона).

5.7. Киназы являются переносчиками фосфатных групп от молекулы АТФ к субстрату. В ходе изучения функциональных свойств активного центра одной из киназ понадобилось дезактивировать данный фермент. Ключевой аминокислотой входящей в субстратный карман связывания киназы с АТФ является положительно заряженная аминокислота лизин. Предполагается, что если ее заменить на другую аминокислоту, то связывание с АТФ нарушится и фермент перестанет работать.

Последовательность к-ДНК длиной в 1.5 kb кодирующая белок R-киназу была встроена в плазмиду pUC18 по сайтам рестрикции HindIII и EcoRI. Схема генетического конструкта с рестриктазной картой киназного гена в плазмиде с указанием местоположения триплета, кодирующего аминокислоту лизин, которая располагается в субстратном кармане киназы представлена на рисунке ниже. Приведена также



последовательность нуклеотидов, расположенная в начале и в активном центре данного гена.

5'-ААГЦТТАТГАЦТЦАТГТГЦЦТ…….ЦЦТГТТТТА**ААА**ЦГГАТЦЦТТГ……..-3'

Опишите этапы получения новой конструкции гена R-киназы с точковой мутацией (мутантного гена) по лизину при помощи ПЦР метода, используя приведенную на рисунке карту рестрикции и зная последовательность нуклеотидов в начале и в районе кодирующем субстратный карман с лизином в этом гене.

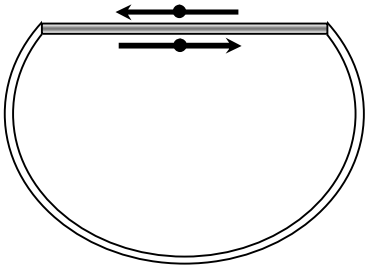
5.8. Какие аминокислотные замещения произойдут в ферменте R-киназа, если для амплификации гена из предыдущей задачи использовать праймеры с точковыми мутациями следующего состава 5'-ААГЦТТАТ-ГАЦТ**ЦАГ**ГТГЦЦТ-3' и 5'-ЦААГГАТЦЦГ**ТТГ**ТАААЦАГГ-3'.

5.9. Фермент фосфоглюкомутаза имеет три важных функциональных домена. Перед молекулярными генетиками стала задача изучить функцию домена 1. Для этого решили получить фосфоглюкомутазу без домена 1 путем направленной делеции участка гена, ответственного за синтез этого домена.

Как будет выглядеть состав двух праймеров, при помощи которых можно амплифицировать молекулу ДНК с делецией участка гена, кодирующего домен 1, если последовательность ДНК в конце гена и на границе доменов 1 и 2 (граница отмечена вертикальной чертой) имеет следующий состав:

5'- …….АЦТААГГТГ|ЦТТЦАЦТТА ……. АТАГГЦГАЦАААГАГТАЦ -3'.

5.10. В кольцевую плазмиду встроен фрагмент гена, кодирующий важный белок. Для того, чтобы заменить в этом белке одну аминокислоту на другую были сконструированы два комплементарных антипарралелльных праймера с точковыми мутациями, изменяющими кодон.



Возможно ли провести амплификацию и получить мутантный ген в достаточных количествах, используя вышеприведенную генетическую конструкцию?

6. Литература

68. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. - М.: Мир, 1988., ил.
69. **Гончаренко Г.Г.** Основы генетической инженерии. Гомель: ГГУ, 2003. – 118с.

70. **Жимулев И.Ф.** Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
71. **Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М.** Генетика: Энциклопедический словарь.- Мн.: Тэхналогія, 1999.- 448 с.
72. **Льюин Б.** Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
73. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
74. **Маккьюсик В.** Генетика человека: Пер. с англ.- М.: Мир, 1967.- 200 с., ил.
75. **Фогель Ф., Мотульски А.** Генетика человека: В 3-х т. Т. 1-2: Пер. с англ.- М.: Мир, 1990.
76. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
77. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.
78. **Desmond Nicholl** An introduction to genetic engineering. / Second edition – Cambridge University press. 2002. – 292 p.
79. **Annette Reineke** Gentechnik. Grunlagen, Methoden und Anwendungen.– Verlag Eugen Ulmer Stuttgart. 2004. – 142 S.
80. **Genetics: from genes to genomes.** Hartwell L. et al. – McGraw Hill: Higher education. New York. 2004. – 880 p.

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ УСВОЕННОГО МАТЕРИАЛА

1. Основы молекулярной генетики

Тест 1.1

Ниже приведены 5 правильных ответов для 10 первых задач (4.1 – 4.10). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. 3'–ТТТААГГЦЦЦ–5'.

–. 3'–ТТАГЦГАЦТА–5'.

–. 5'–АТЦАТАГЦЦГ–3'.

3'– ТАГТАТЦГГЦ–5'.

–. 5'–ААГЦУЦАУГГУА–3'.

–. 5'–УУУЦУАГУГАУААГАЦААУГАУ–3'.

–. 5'–ГУУЦУГУАУАГЦААУГА–3'

Тест 1.2

Ниже приведены 5 правильных ответов для 10 задач (4.11 – 4.20). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Пролин – пролин – пролин – пролин.

–. Лейцин – лейцин – изолейцин – валин – изолейцин – триптофан– лейцин – лейцин.

–. Аланин, аспарагин, цистеин, глицин.

–. Один из вариантов решения: УУУ, УГА, ЦЦА, ЦАА, ГЦА.

–. После удаления из ДНК шестого нуклеотида аминокислоты в молекуле белка имеют следующий порядок: треонин – глутамин – тирозин.

–. Один из вариантов решения: АУУ, ГАУ, ЦАГ, ААА, ГЦА, ГАЦ.

Тест 1.3

Ниже приведены 5 правильных ответов для 9 последних задач (4.21 – 4.29). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. После вставки тимина белок имеет вид: серин – треонин – лейцин – глицин.

–. После воздействия азотистой кислотой цепь белка будет иметь следующее строение: цистеин – глутаминовая кислота – серин – изолейцин – глицин – серин. Это один из вариантов ответа.

–. Один из вариантов ответа: 3'– ГЦА АЦЦ АТА ГТА ААА–5'

5'–Ц ГТ ТГГ ТАТ ЦАТ ТТТ –3'.

–. Один из возможных вариантов решения:

3'–ААА ЦАА ЦТА ГТТ ГТА ГАА АЦА ЦЦА ТЦА ГТА–5'

5'–Т ТТ ГТ Г ГАТ ЦАА ЦАТ ЦТТ ТГТ ГГТ АГТ ЦАТ–3'

–. Один из вариантов решения: 3'–ГЦА ГГА ГАА ЦАА ГЦГ–5' 5'–ЦГТ ЦЦТ ЦТГ ГТТ ЦГЦ–3'

Тест 1.4

Ниже приведены 5 правильных ответов для 10 первых задач(4.1 – 4.10). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. 3'–АГЦТАААТГЦ–5' .

–. 3'–АТЦЦГАТТАТЦГ–5'.

–. 3'–УААЦГАГУУУ–5'.

–. 3'–ГУГЦУАГГААГА–5'.

–. 3'–ЦГЦТГТАААГЦГЦАТЦАТЦТТАА–5'.

–. 5'–АУУЦУГУАУАГЦААУГА–3'

Тест 1.5

Ниже приведены 5 правильных ответов для 10 следующих задач (4.11 – 4.20). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Серин – аргинин – фенилаланин – фенилаланин.

–. Лейцин – валин – лейцин.

–. Один из возможных вариантов ответа: АГА, АУА, АГГ, УАЦ.

–. После удаления из гена первого нуклеотида белок имеет вид: аргинин – валин – лейцин.

–. При удалении из молекулы ДНК второго нуклеотида строение белка таково: глицин – фенилаланин – серин.

–. Один из возможных вариантов ответа: АГУ, ГУА, ГГГ, УАЦ.

Тест 1.6

Ниже приведены 4 правильных ответа для 9 последних задач (4.21 – 4.29). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. После облучения начало цепочки белка: глицин – треонин – глицин.

–. Один из возможных вариантов решения: АЦУ-УГГ-УАУ-ГУУ.

–. Один из вариантов решения:

и-РНК: 5'–ГЦУ АГА АЦУ ААА –3'

ДНК: 3'–ЦГА ТЦТ Т ГА ТТТ –5'

5'–ГЦТ АГА АЦТ ААА–3'.

–. Один из возможных вариантов решения:

3'–ЦЦА ТАА ЦАА ГТТ ГТЦ–5'

5'–Г ГТ АТТ ГТТ ЦАА ЦАГ–3'

–. Один из возможных вариантов решения: ГЦУ-УГА-УАУ-ГГУ.

2. Ферменты рестрикции и получение гибридной ДНК

Тест 2.1

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. В приведенной ДНК имеется один участок распознавания: ГГАТЦЦ для рестриктазы Bam I (см. таблицу на стр. 18). Поэтому ДНК может быть разрезана в одном месте с образованием двух фрагментов.

–. Рестриктаза EcoR I может разрезать фрагмент **а**.

–. Частота встречаемости четырехнуклеотидного фрагмента ЦЦГГ составит $(1/4)^4 = 1/256$. Таким образом, средняя длина фрагментов ДНК при разрезании Hpa II составит 256 нуклеотидных пар.

–. Средняя длина фрагментов ДНК при разрезании рестриктазами, узнающими восьминуклеотидную последовательность, составит 65536 нуклеотидных пар.

–. Средняя длина фрагментов при разрезании рестриктазами составит 53637 нуклеотидных пар.

Тест 2.2

Ниже приведены 4 правильных ответа для 7 задач (4.9 – 4.15).. Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Должно получиться 732422 + 23 =732445 рестрикционных фрагментов.

–. 52734 + 1 =52735 фрагментов.

–. 24414 + 4.

–. Bam I может разрезать фрагменты с образованием липких концов, а ДНК-лигаза скрепит их в одну молекулу.

–. 52734 фрагментов.

Тест 2.3

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8).. Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. ДНК может быть разрезана в одном месте рестриктазой Hae III с образованием двух фрагментов.

–. Фрагменты **а** и **б** могут быть разрезаны рестриктазами Hind III и Hpa II соответственно.

–. Средняя длина фрагментов ДНК при разрезании EcoRI составит 4096 нуклеотидных пар.

–. В результате полного расщепления человеческой ДНК рестриктазой Not I должно получиться 45776 + 23 = 45799 фрагментов.

–. Средняя длина фрагментов ДНК при разрезании EcoRI составит 2055 нуклеотидных пар.

Тест 2.4

Ниже приведены 3 правильных ответа для 7 задач (4.9 – 4.15). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. 3296 + 1 = 3297 фрагментов.

–. 18359 рестрикционных фрагментов.

–. С помощью Hind III можно разрезать оба фрагмента ДНК с образованием липких концов АГЦТ. Затем при смешении фрагментов липкие концы скрепятся между собой за счет водородных связей, а окончательную сшивку в единую гибридную молекулу произведет ДНК-лигаза.

–. 22575 рестрикционных фрагментов.

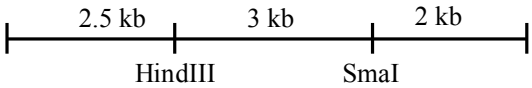
3. Анализ и использование фрагментов ДНК

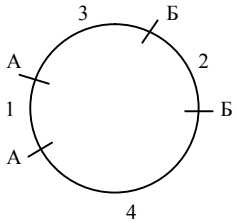
Тест 3.1

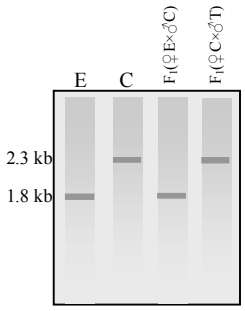
Ниже приведены 5 правильных ответов для задач 4.1 – 4.9. Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

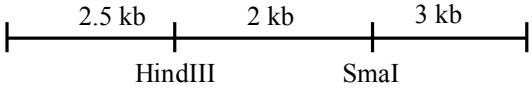
–. Две.

–. Одна.

–. 

–. 

–. 

–. 

Тест 3.2

Ниже приведены 4 правильных ответа для задач 4.10 – 4.18. Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

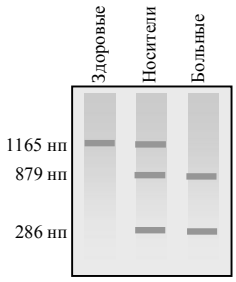
–. Выявить мутацию, приводящую к заболеванию, можно достаточно легко используя молекулярно-генетические методы. Для этого индивидуальные образцы ДНК необходимо обработать рестриктазой EcoRI. Затем, полученные рестрикционные фрагменты подвергнуть электрофоретическому фракционированию в агарозном геле с последующей Саузерн-блот гибридизацией, используя в качестве зонда меченый фрагмент специфической ДНК.

Поскольку в результате мутационной замены нуклеотида в ДНК гена, обуславливающего заболевание, происходит потеря сайта рестрикции для EcoRI, который присутствует в нормальном гене, то на авторадиограмме образцов, взятых у здоровых людей, будут присутствовать две фракции. В тоже время в образцах, взятых у людей, являющихся носителями заболевания кисто-фиброз, будет присутствовать дополнительная «тяжелая» (неразрезанная) фракция ДНК.

–. Старший сын является носителем заболевания кистозный фиброз.

–. Оба родителя являются носителями заболевания.

–.

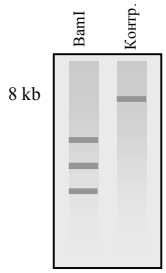


–. Все нормальные братья и сестры являются носителями.

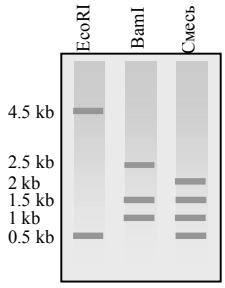
Тест 3.3

Ниже приведены 4 правильных ответа для задач 4.1 – 4 .9. Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

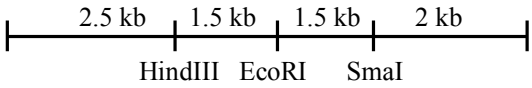
–.



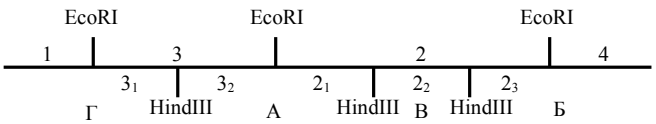
–.



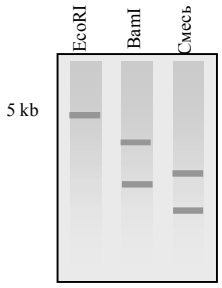
–.



–.



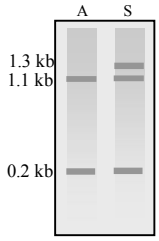
–.



Тест 3.4

Ниже приведены 5 правильных ответов для задач 4.10 – 4.18. Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–.



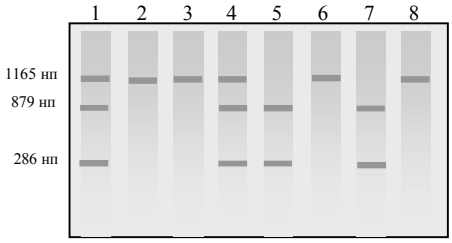
–. Так как оба родителя являются носителями поврежденного гена, т.е. гетерозиготами, то вероятность рождения детей с заболеванием Кисто-фиброз равна 25%.

–. Младший брат является нормальной гомозиготой, а остальные носителями заболевания.

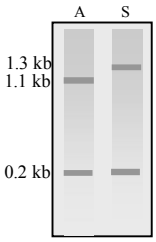
–. Первый ребенок (эмбрион) является гетерозиготой и соответственно унаследует аллель ДНК-маркера (3.7, 1.2 кб), сцепленный с болезнью Хантингтона, а учитывая 4% кроссинговер между геном, определяющим заболевание и сцепленным с ним ДНК-маркером можно сказать, что только в одном случае из 25 он будет нормальной гомозиготой.

Второй ребенок в любом случае унаследует аллель, несущий болезнь Хантингтона, поскольку поврежденный ген он обязательно получит от отца, который является гомозиготой по гену, обуславливающему заболевание.

–.



–.



4. Плазмидные вектора – специальные устройства для доставки и клонирования чужеродных генов

Тест 4.1

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Нет, поскольку во фрагменте отсутствует сайт для EcoR I.

–. Второй с помощью рестриктазы Hind III.

–. Можно. Первый с использованием EcoR I, второй – Hind III.

–. Так как трансформированные бактерии не растут на среде, содержащей тетрациклин, то можно предположить, что в плазмидной ДНК вставкой поврежден ген устойчивости к этому антибиотику. Следовательно, из плазмиды нужный нам фрагмент можно «вырезать» при помощи рестриктазы Bam I.

–. Первый.

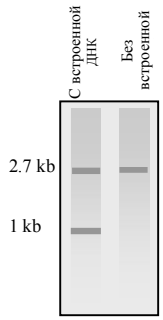
Тест 4.2

Ниже приведены еще 3 правильных ответа для 6 задач (4.9-4.14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

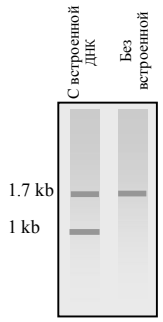
–. Гибридизация меченого зонда произойдет с фракциями ДНК величиной 4 и 2 кб.

–. Гибридизация произойдет с фракциями ДНК величиной 4 и 1 кб.

–.



–.



Тест 4.3

Ниже приведены еще 4 правильных ответа для 8 задач (4.1-4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. **а**.

–. Оба. Первый при помощи рестриктазы EcoR I, второй при помощи рестриктазы Hind III.

–. При помощи фермента Bam I. Бактерии, трансформированные такой плазмидой, не будут расти на средах, содержащих тетрациклин.

–. Поскольку белок состоит из 300 аминокислот, то величина гена Ms будет 900 нуклеотидных пар, а тандемная копия составит 900 × 2 = 1800 нп. Следовательно, тандемная копия гена Ms может находиться только во фрагменте 3.

–. Только один. При помощи рестриктазы Hae II.

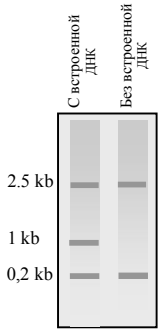
Тест 4.4

Ниже приведены еще 3 правильных ответа для 6 задач (4.9-4.14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

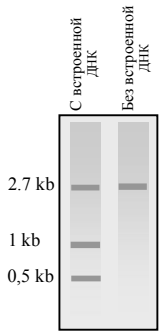
–. На первом этапе необходимо определить в какое место в плазмиде наиболее оптимально можно встроить ген, нужный нам для последующего клонирования. Фрагмент ДНК грибка *Podospora*, который содержит ген β-тубулина, можно встроить при помощи рестриктазы HaeII. Для этого ДНК грибка и плазмиду нужно обработать рестрикционным ферментом HaeII, произвести гибридизацию линейной молекулы плазмиды и ДНК *Podospora* с последующим сшиванием лигазой. Полученной гибридной плазмидой трансформировать *E. coli*. Далее, трансформированные бактериии выращивать на среде, содержащей тетрациклин. Затем перенести реплику (отпечаток) колоний на среду, содержащую канамицин. Так как ген устойчивости к канамицину отключен из-за вставки, то бактерии трансформированные гибридными плазмидами, не будут расти на среде, содержащей канамицин. Колонии устойчивые к тетрациклину, но чувствительные к канамицину, и будут искомыми.

–. Удалось. Так как в результате вставки чужеродной ДНК в плазмиду pUC18 произошло нарушение работы гена lac Z, то бактериальные клетки содержащие плазмиды со встроенной ДНК образовали неокрашенные колонии, а не синие.

–.



–.



5. Фаговые и космидные вектора и создание геномных библиотек

Тест 5.1

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Никакой, поскольку величина обеих фрагментов существенно меньше 15 кб.

–. Величина соответствующей β-глобиновой кДНК, составит около 462 нуклеотидных пар.

–. Да удастся в любой плазмиде например pSC101, pBR322 или pUC18 если к данному фрагменту человеческой ДНК подшить с помощью ДНК-лигазы линкерную последовательность допустим ГААТТЦ для действия рестриктазы EcoRI.

–. У линкера для данной кДНК, что бы её можно было клонировать в плазмиде pBR322 по маркёру устойчивости к ампициллину последовательность должна быть ЦТГЦАГ для действия рестриктазы PstI, расположенной в структуре гена Ap^r.

–. У линкера для данной кДНК, что бы её можно было клонировать в плазмиде pBR322 по маркёру устойчивости к ампициллину последовательность должна быть ГААТТЦ для действия рестриктазы PstI, расположенной в структуре гена Ap^r.

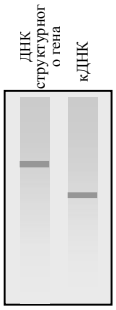
Тест 5.2

Ниже приведены 3 правильных ответа для 6 задач (4.9 – 4.14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют

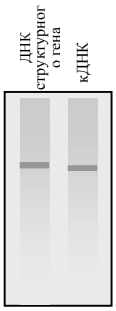
–. Да можно, поскольку EcoRI будет разрезать ДНК дрожжевого грибка на различные фрагменты (величина 4096 н. п. является только средней), в том числе и на фрагменты длиной около 15 кб, которые легко встроятся в фаг λ (λ-вектор) для последующего размножения в *E. coli.*

–. Минимальное число различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК человека составляющих геномную библиотеку в данном случае будет 45776 + 23 или 45799.

–. Поскольку структурный ген у высших эукариот всегда существенно длиннее, чем кДНК электрофоретический спектр их образцов после Саузерн-блот гибридизации на радиоавтограмме будет выглядеть следующим образом:



–. Электрофоретический спектр ДНК двух образцов после Саузерн-блот гибридизации на радиограмме будет выглядеть следующим образом:



Тест 5.3

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Успешно клонировать данный фрагмент ДНК в бактериофаге λ не удастся, т. к. его величина существенно меньше 15 кб.

–. Да сумеют, поскольку величина тандемной (двойной) копии данного гена составит около 41 кб и этот фрагмент ДНК можно будет успешно клонировать в космидном векторе.

–. Для того чтобы успешно клонировать кДНК гена Pgm дрозофилы в каком либо плазмидном векторе необходимо к кДНК с помощью ДНК-лигазы подшить удобную линкерную последовательность.

–. Поскольку рестриктаза EcoRI узнаёт последовательность ДНК, состоящую из шести нуклеотидов то она будет разрезать молекулу двухцепочечной ДНК в среднем один раз на 4096 нуклеотидных пар. И следовательно минимальное число различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК *Saccharomyces cerevisiae,* составляющих геномную библиотеку этого вида будет 3296 + 1 или 3297.

–. Поскольку EcoRI узнаёт последовательность ДНК, состоящую из шести нуклеотидов то она будет разрезать молекулу двухцепочечной ДНК в среднем один раз на 4096 нуклеотидных пар. И следовательно

минимальное число различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК *Drosophila melanogaster,* составляющих геномную библиотеку этого вида будет 24414+1 или 24415.

Тест 5.4

Ниже приведены 3 правильных ответа для 6 задач (4.9 – 4.14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют

–. Минимальное число различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК *Drosophila melanogaster* составляющих геномную библиотеку этого вида будет 24414+4 или 24418.

–. Электрофоретические спектры обеих ДНК на электрофореграммах будут существенно отличаться. ДНК структурного гена у эукариот существенно длиннее поскольку всегда содержит последовательности интронов и другие регуляторные фрагменты ДНК. Поэтому в ходе электрофореза образец ДНК структурного гена будет двигаться медленнее чем кДНК.

–. Нет не могут. Полученные три фракции на радиограмме свидетельствую о том, что сайты рестрикции для EcoRI в данном гене имеются в интронах, но отсутствуют в экзонах. Поэтому рестриктаза EcoRI дважды порезала ДНК структурного гена в интронной части и ни разу в его кДНК (экзонной части).

–. Да могут. Полученные три фракции на радиограмме свидетельствую о том, что сайты рестрикции для EcoRI в данном гене имеются в интронах, но отсутствуют в экзонах. Поэтому рестриктаза EcoRI дважды порезала ДНК структурного гена в интронной части, и ни разу в его кДНК. Всё это говорит о том, что существует три копии данного гена в геноме морской свинки.

6. Генная дактилоскопия и полный сиквенс (прочтение) нуклеотидных последовательностей ДНК

Тест 6.1

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Полное совпадение спектров ДНК в двух образцах говорит о том, что скорее всего они были взяты у одного человека (или у однояйцевых близнецов).

–. Биологическим отцом данного ребёнка может быть только мужчина имеющий спектр ДНК №2.

–. Из семи подозреваемых преступником мог быть только человек обладающий спектром ДНК №3.

–. Нуклеотидная последовательность первых 20 нуклеотидов в рестрикционном фрагменте ДНК дрозофилы будет следующая: ТЦАЦТГЦЦЦ-ГЦТТТЦЦАГТЦ.

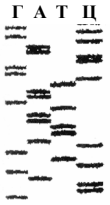
–. Нуклеотидная последовательность первых 20 нуклеотидов в рестрикционном фрагменте ДНК дрозофилы будет следующая: ТЦГЦТГЦЦГГ-ЦТАТЦЦАГТЦ.

Тест 6.2

Ниже приведены 3 правильных ответа для 6 задач (4.9 – 4.14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют

–. Коэффициент специфичности нуклеотидного состава для ДНК дрозофилы по результатам анализа первых 50 нуклеотидов в данном рестрикционном фрагменте ДНК составит 1.27.

–.



–. Последние 30 нуклеотидов в просиквенированном фрагменте ДНК человека будут иметь следующую последовательность: ТГАТЦГАГАГГГАААТЦААТТЦТГТГААЦГ.

–.

Тест 6.3

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Они могут быть только однояйцевыми близнецами.

–. Предпологаемым преступником может быть только человек имеющий спектр ДНК №3.

–. Нуклеотидная последовательность рестрикционного фрагмента ДНК мыши следующая: АЦГЦЦЦГААТАГЦЦЦАГАТТ

–. Первые 40 нуклеотидов во фрагменте ДНК дрозофилы будут иметь следующую последовательность: ТЦАЦТГЦЦЦГЦТТТЦЦАГТЦГГГАААЦЦТГТЦГТГЦЦАГЦ

–. Первые 40 нуклеотидов во фрагменте ДНК дрозофилы будут иметь следующую последовательность: ТЦАЦТГЦЦГТЦТТТЦЦАГТАЦГГГАААЦЦТГАЦГТГЦААГЦ

Тест 6.4

Ниже приведены 3 правильных ответа для 6 задач (4.9 – 4.14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют

–.

–. Первые 20 нуклеотидов во фрагменте ДНК человека длиной 50 нуклеотидов будут иметь следующую последовательность: ТАТЦАГАТЦТГЦААЦТЦАТА.

–. Коэффициент специфичности нуклеотидного состава по результатам анализа 50 нуклеотидов в данном рестрикционном фрагменте ДНК человека составит 0,66.

–.

7. Амплификация фрагментов ДНК с помощью метода ПЦР (полимеразной цепной реакции)

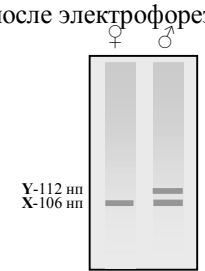
Тест 7.1

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Если провести 10 успешных циклов амплификации 20 фрагментов ДНК из костных останков, используя метод ПЦР, то количество копий ДНК нужного гена составит $20x2^{10}=20480$.

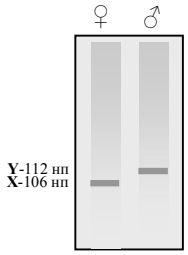
–. Проанализировать ДНК, содержащую нужный для дактилоскопии ген имея в наличии только два сперматозоида можно, но лишь после ПЦР-амплификации ДНК.

–. Спектры ДНК, гена амелогенина из костных останков мужчины и женщины амплифицированные ПЦР, после электрофореза будут выглядеть следующим образом:



–. Исходя из представленных 9 спектров ДНК гена амелогенина, останков семьи Николая II следует, что в захоронении было, 5 женщин.

–. Спектры ДНК, гена амелогенина из останков мужчины и женщины амплифицированные ПЦР, после электрофореза будут выглядеть так:



Тест 7.2

Ниже приведены 4 правильных ответа для 7 задач (4.9 – 4.15). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Исходя из данных по ПЦР-амплифицированной ДНК, из костных останков двух детей, мужчины, женщины и живого мужчины, генов А и Б следует, что отцом ребенка 1 является мужчина 2, поскольку только от него по гену А ребенок мог получить второй аллель 8, а по гену Б аллель 7, а отцом ребенка 2 является мужчина 1.

–. Да, возможно. Для этого на первом этапе необходимо путем амниоцитоза изъять несколько эмбриональных клеток и провести амплификацию взятого материала ДНК методом ПЦР. Затем необходимо провести Саузерн-блот анализ с использованием специального ДНК-зонда (G8). По полученным электрофоретическим спектрам легко установить, имеется ли ген заболевания Хантингтона в ДНК их будущего ребенка.

–. Праймер №1 должен быть комплементарен кодирующей (3'- 5') цепочки ДНК и его последовательность должна быть: 5'- АТГГАЦААТЦАГГАГ-3'. Последовательность второго праймера должена быть комплементарна другой (5'-3') цепи двухцепочечной молекулы ДНК, и его последовательность должна быть: 5'- ТТААГГЦААЦГАТЦТ -3'.

–. Для того, чтобы амплифицировать молекулу ДНК с делецией участка гена, первый праймер для цепочки 3'-5'должен иметь последовательность 5'- АТГААГГТГЦТТЦАЦ -3'. Что касается праймера №2, то если бы нам нужно было амплифицировать фрагмент гена без делеции, он бы выглядел следующим образом 5'-ТААГТАЦТГТТТ|ГТЦГЦЦТАТТГЦ-3'. Но так как нам нужно заменить в исходной цепочке 5'-3' первый триплет домена3 на один из стоп-кодонов, то праймер №2 будет иметь следующий вид: 5'-ТААГТАЦТГААТ|ГТЦГЦЦТАТТГЦ-3'

–. Исходя из данных по ПЦР-амплифицированной ДНК, из костных останков двух детей, мужчины, женщины и живого мужчины, генов А и Б следует, что отцом обоих детей является мужчина 2.

Тест 7.3

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Если провести 20 успешных циклов амплификации для 10 копий фрагментов ДНК из костных останков, используя метод ПЦР, то количество копий ДНК нужного гена составит $10x2^{20}$=10485760.

–. Проанализировать фрагмент ДНК, содержащий нужный для дактилоскопии ген имея в наличии лишь один человеческий волос можно, но лишь после амплификации ДНК с помощью ПЦР.

–. Исходя из спектров ДНК гена амелогенина, останков знатной семьи следует, что в захоронении находилась 1 женщина и 3 мужчины. 4,6

–. Исходя из данных по ПЦР-амплифицированной ДНК, из костных останков генов А и Б, содержащих тандемные повторы, следует, что женщина может быть матерью погибших детей, поскольку от нее по гену А они могли получить аллель 8, а по гену Б аллели 3 и 5.

–. Исходя из спектров ДНК гена амелогенина, останков знатной семьи следует, что в захоронении находился 1 мужчина и 3 женщины.

Тест 7.4

Ниже приведены 3 правильных ответа для 7 задач (4.9 – 4.15). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Можно, поскольку использование одного бластомера из восьми не повлияет на дальнейшее развитие эмбриона, а достаточное количество ДНК для анализа можно получать из одного бластомера, используя ПЦР.

–. Возможно. Для этого необходимо путем амниоцитоза изъять эмбриональные клетки, затем провести амплификацию материала ДНК методом ПЦР. После этого необходимо провести Саузерн-блот анализ с использованием специального ДНК-зонда. По полученным спектрам легко установить, имеется ли дефектный ген заболевания кисто-фиброз в гомозиготном состоянии в ДНК их будущего ребенка.

–. Для того, что бы можно было после амплификации легко встроить данный ген дрозофилы в плазмиду pUC18, необходимо достроить к праймерам, построенным к задаче 4.13 (стр. 84), нуклеотиды соответствующие сайтам рестрикции для EcoRI и HindIII. Тогда праймер №1 для нижней цепочки (3'-5') будет следующим 5'-ГААТТЦАТГГАЦААТЦАГГАГ-3', а праймер №2 для верхней цепочки (5'-3') будет 5'-ААГЦТТТТААГГЦААЦГА-ТЦТ-3'.

–. Исходя из данных по ПЦР-амплифицированной ДНК, из костных останков генов А и Б, содержащих тандемные повторы, следует, что женщина не может быть матерью двух погибших детей, поскольку у них нет ее аллелей по гену А и по гену Б.

ОТВЕТЫ
НА ЗАДАЧИ ПОВЫШЕННОЙ СЛОЖНОСТИ

Ферменты рестрикции и получение гибридной ДНК

2.5.1. Трансляция любого гена в аминокислотную последовательность всегда начинается только с метионинового триплета 5`-АУГ……-3`.

5`-ГЦЦГААТТЦЦЦТАТЦААЦАЦГААГТГАААГТЦТТАЦААЦЦЦАТГААТТЦГАТ-3`
3`-ЦГГЦТТААГГГАТАГТТГТГЦТТЦАЦТТТЦАГААТГТТГГ**ГТА**ЦТТААГЦТА-5`

В представленном фрагменте ДНК этот триплет (АТГ) расположен в нижней цепочке в направлении от 5` к 3`. Следовательно, транскрипция гена соматостанина в нашем случае будет происходить справа налево.

2.5.2. Обработка представленного фрагмента ДНК рестриктазой EcoRI не отразится на результатах трансляции человеческого гена соматостатина, поскольку после разрезания EcoRI структурная часть гена полностью сохраниться.

2.5.3. Исходя из нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК человеческого соматостатина, последовательность транслируемой части мРНК от инициирующего кодона АТГ и до стоп кодона ТГА будет следующей: мРНК – 5`-АУГ-ГГУ-УГУ-ААГ-АЦУ-УУЦ-АЦУ-УЦГ-УГУ-УГА-3`. Это означает, что человеческий пептидный гормон соматостатин имеет аминокислотный состав: метионин – глицин – цистеин – лизин – треонин – фенилаланин – треонин – серин – цистеин.

Анализ и использование фрагментов ДНК

3.5.1.

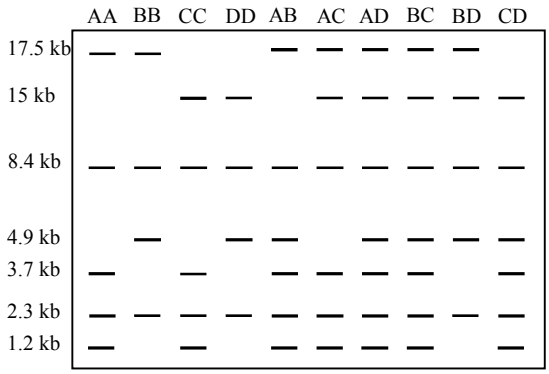


Рис. 1. Схема электрофоретических спектров рестрикционных фрагментов ДНК, обработанных HindIII, после Саузерн-блот гибридизации с использованием зонда G8 у ес-кие спектры рестрикционных людей, имеющих различные генотипы ько у гетерозигот AD и BC.

3.5.2. У проанализированных членов венесуэльской семьи, родословная которых приведена на рисунке 3.17 (стр. 37) существует прямая связь заболевания Хантингтона с генотипами AC, BC и CC, так как практически все потомки с этими тремя генотипами имели БХ, в то время как все потомки с тремя альтернативными генотипами AA, BB, AB были здоровы.

Что касается конкретного аллеля, то в этой семье существует четкая связь заболевания БХ только с аллелем C.

3.5.3. Наличие генотипа AC у здоровой женщины в шестом поколении (VI-5) венесуэльской семьи вероятнее всего объясняется тем, что она является кроссовером между локусом, несущим заболевание, и маркерным локусом, образовавшимся в результате кроссинговера в хромосоме с БХ и аллелем C.

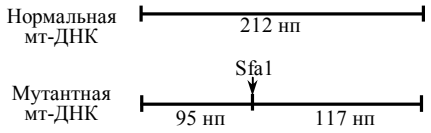
3.5.4. Поскольку из 20 потомков в венесуэльской семье, несущих аллель C, 19 страдают болезнью Хантингтона, а один является кроссовером, то величина кроссинговера составит 5% (1/20•100%). Отсюда следует, что ДНК-маркер по зонду G8 расположен на расстоянии 5 морганид от гена, обуславливающего это заболевание.

3.5.5. Зонд G8 может быть использован для идентификации района ДНК, в котором непосредственно расположен сам ген, обуславливающий заболевание Хантингтона, что поможет выделить и проанализировать данный ген. В дальнейшем выделенный ген, обуславливающий болезнь Хантингтона, может быть успешно клонирован, транскрибирован и транслирован, что в итоге даст возможность идентифицировать конкретный белковый продукт.

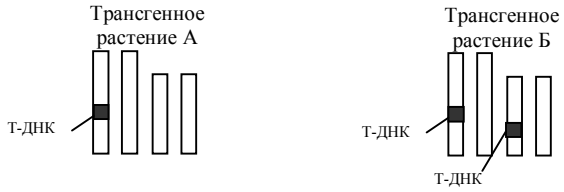
3.5.6. Данные, представленные в родословной трех поколений (рис. 10), не укладываются ни в рецессивный, ни в доминантный характер генетического контроля заболевания оптическая нейропатия Лебера. Эти данные достаточно хорошо объясняются материнским (цитоплазматическим) характером наследования. При этом отсутствие заболевания у 4 и 10 представителя семьи может быть связано как с неполной пенетрантностью, так и с различным соотношением митохондрий, содержащих нормальный и дефектный ген в цитоплазме различных материнских клеток.

В тоже время электрофоретические данные по анализу фрагмента митохондриальной ДНК однозначно подтверждают материнский характер наследования заболевания и свидетельствуют о том, что ген ответственный за оптическую нейропатию Лебера находится в мт-ДНК.

3.5.7. Исходя из молекулярно генетических данных анализа фрагментов митохондриальной ДНК (рис.10) можно сказать, что рестрикционные спектры, представленные на электрофореграмме, напрямую связаны с заболеванием оптическая нейропатия Лебера, поскольку все больные члены семьи обладают спектром мт-ДНК состоящим из двух фракций длиной 117 и 95 нуклеотидных пар, в то время как у 9 из 11 здоровых представителей семьи спектр состоял только из одной "тяжелой" фракции величиной 212 нуклеотидных пар. Таким образом карты фрагмента мт-ДНК у здоровых и больных представителей данной семьи будут выглядеть следующим образом:

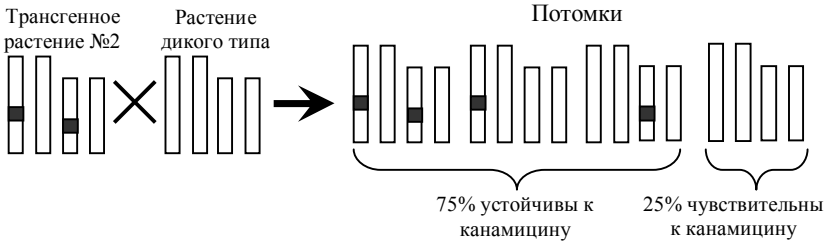


Относительно механизма возникновения дефектного (мутантного) аллеля, исходя из имеющихся



данных можно заключить, что произошла точковая мутация связанная с заменой одного нуклеотида на другой или небольшая инверсия, вызвавшая появление сайта рестрикции для фермента Sfa1, так как количество нуклеотидов в нормальном и дефектном фрагменте митохондриальной ДНК сохранилось одинаковым 212 нп.

3.5.8. Возможность того, что отсутствие заболевания у 4 и 10 представителя семьи может быть связано с различным соотношением нормальных и дефектных митохондрий, распределенных в цитоплазме материнских клеток опровергается экспериментальными данными. Если бы в цитоплазме была смесь митохондрий с нормальной и мутантной мт-ДНК (гетероплазмон), то мы должны были бы видеть, что рестрикционные спектры мт-ДНК некоторых членов семьи имели

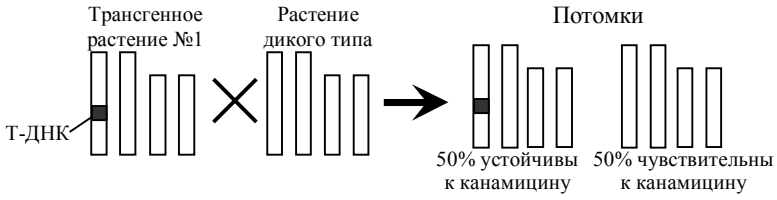


бы все три фракции – 95, 117 и 212 нп. Но на фореграмме (рис. 3.18) этого нет. Следовательно наиболее вероятным объяснением отсутствия заболевания у двух членов семьи является неполная пенетрантность митохондриальной болезни.

Плазмидные вектора – специальные устройства для доставки и клонирования чужеродных генов

4.5.1. В геном трансгенного растения №1 встроился только один фрагмент Т-ДНК с нужным геном. В геноме трансгенного растения №2 встроились два фрагмента Т-ДНК, причем в негомологичные хромосомы.

4.5.2. Соотношение потомков от самоопыления, при котором 3/4 из них оказались



канамицинустойчивыми, а 1/4 – чувствительными, т. е. 3 : 1, может быть получено при условии если только один фрагмент Т-ДНК встроен только в одну хромосому растения А, тогда как соотношение 15 : 1 может быть получено при встраивании двух фрагментов Т-ДНК в две негомологичные хромосомы, что имело место в растении Б. Таким образом хромосомы, трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* А и Б будут

выглядеть так:

4.5.3. Да, можно, поскольку на левом и правом концах полилинкера плазмиды pUC18 имеются сайты рестрикции для рестриктаз Hind III и EcoR I и если плазмиду обработать этими рестриктазами одновременно, то у неё образуются два разных липких конца. При обработке фрагмента человеческой ДНК величиной 0.5 кб, имеющей на концах такие же сайты рестрикции, одновременно двумя рестриктазами Hind III и EcoR I у неё также образуются два разных липких конца, совпадающие с таковыми у обработанной плазмиды pUC18. Поэтому процесс лигирования (вставки) данного фрагмента человеческой ДНК в плазмиду pUC18 в стандартных условиях пройдёт успешно.

4.5.4. Нет нельзя. Поскольку при обработке данного фрагмента ДНК рестриктазой EcoRI образуются не только липкие концы по флангам, но и сам ген гормона разрежется на 2 части, что сделает невозможным клонирование целого гена.

4.5.5. Можно клонировать в плазмидах pBR 322 или pUC18 только второй фрагмент с использованием Hind III и EcoR I. В тоже время первый клонировать не удастся, поскольку при обработке данного фрагмента ДНК рестриктазами Hind III и BamI образуются не только липкие концы по флангам, но и сам фрагмент разрежется на 2 части, что сделает невозможным его целостное клонирование.

4.5.6. Нет нельзя. Поскольку для того, чтобы встроить и клонировать этот ген обязательно понадобилось бы использование рестрикционных ферментов EcoRI и Hind III, сайты рестрикции для которых имеются по флангам фрагмента ДНК. Однако для EcoRI есть еще один сайт рестрикции внутри фрагмента гена, и её использование приведет к нарушению целостности клонируемого гена.

4.5.7. Клонировать этот участок ДНК в плазмиде pUC18, не нарушая целостности структурной части важного гена можно только с помощью рестриктаз PstI и SalI или PstI и SmaI. Поскольку использование рестриктаз Hind III, EcoRI и BamI обязательно приведет к нарушению целостности клонируемого гена.

Фаговые и космидные вектора и создание геномных библиотек

5.5.1. Поскольку в незрелых эритроцитах более половины мРНК является глобиновой её легко можно выделить и использовать с помощью обратной транскриптазы для получения соответствующей кДНК. Затем при скрининге геномной библиотеки клонов *E. coli* на нитроцеллюлозном фильтре радиоактивно меченная кДНК, используемая как зонд будет комплиментарно гибридизоваться только с ДНК β-глобинового гена. Поэтому по месторасположению радиактивной метки клон *E. coli,* содержащий фрагмент ДНК с β-глобиновым геном легко найти и выделить из него необходимое количество β-глобиновой ДНК.

5.5.2. Полученные четыре фракции на радиоавтограмме говорят о том, что рестриктаза HindIII три раза разрезала ДНК структурного гена белка зеленой мартышки, в то время как кДНК, несущую только экзонную часть она разрезала лишь один раз. Следовательно, в исследованном структурном гене зеленой мартышки, который отвечает за синтез важного белка имеются два сайта рестрикции по HindIII в интронной части гена и только один в экзонной.

Идентификация бактериальных колоний, содержащих плазмиду со вставкой фрагмента геномной ДНК с β-глобиновым геном. Бактерии с рекомбинантной плазмидой, содержащей последовательности, гомологичные последовательности меченого кДНК зонда, гибридизуются и выявляются радиоавтографически. Затем на исходной чашке отыскивают колонию, локализованную там же, где и соответствующая колония на фильтре-реплике.

Генная дактилоскопия и полный сиквенс (прочтение) нуклеотидных последовательностей ДНК

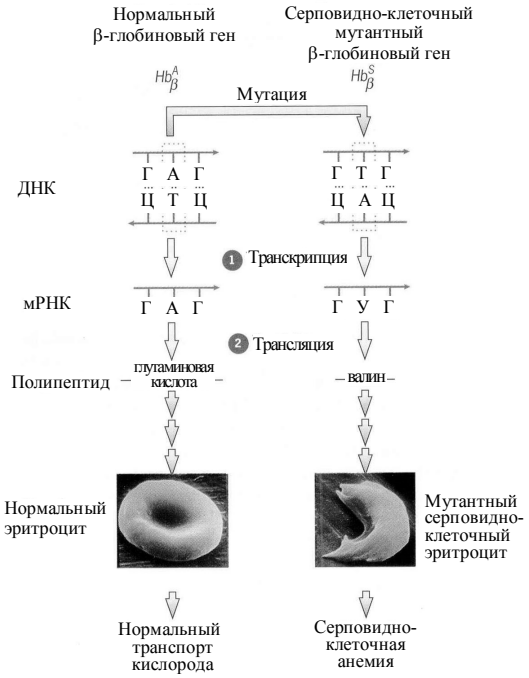
6.5.1. Если бы Анна Мэнехен действительно была принцессой Анастасией, то её мтДНК была такой же, как у всех родственников последней русской царицы Александры, включая её племянника герцога Эдинбургского. И короткий фрагмент проанализированной мтДНК у неё был бы ТТЦЦТЦ. Но фрагмент её мтДНК имеет другой состав и полностью совпадает с мтДНК её истинного племянника Карла Маучера, все предки и родственники которого никогда не имели родственных связей с королевскими семьями Европы, в том числе с семьёй последнего русского царя Николая II.

Таким образом можно однозначно утверждать, что Анна Мэнехен не являлась принцессой Анастасией.

6.5.2. Да, можно. Так как супруга последнего русского царя Александра и её дети Анастасия и Алексей, а также герцог Эдинбургский являются прямыми потомками королевы Виктории по материнской линии то у всех у них последовательность 6 нуклеотидного фрагмента мтДНК будет следующая ТТЦЦТЦ.

6.5.3. Исходя из электрофоретического спектра сиквенированного короткого начального фрагмента ДНК глобинового гена схематически представленного на радиограмме рис. 9 нуклеотидная

последовательность для нормального β-глобинового гена будет: ГТГЦАЦЦТГАЦТЦЦТГАГГАГ, а для мутантного ГТГЦАЦЦТГАЦТЦЦТГ**Т**ГГАГ. Таким образом мутация приводящая к серповидно-клеточной анемии произошла только в одном сайте, при этом нуклеотид А в семнадцатом положении β-глобинового гена заменился на нуклеотид Т.



6.5.4. От мутации, произошедшей только в одном сайте β-глобинового гена заместившего в семнадцатом положении нуклеотид А на Т до фенотипического проявления этой мутации, выражающегося в заболевании серповидно-клеточной анемией происходит ряд сложных этапов.

Основные этапы реализации генетической информации в нормальном и мутантном сайте от гена до фенотипического признака представлены на рисунке справа. Хорошо видно, что мутантный новый триплет ГТГ, возникший после мутации на первом этапе транскрибировался в молекуле мРНК вместо кодона ГАГ в новый кодон ГУГ. В результате этого вместо глютаминовой кислоты в шестом положении после процесса трансляции в состав цепочки β-глобина вошла другая аминокислота - валин. Именно из-за замены одной аминокислоты в составе β-глобинового полипептида при формировании четвертичной структуры гемоглобина возникают дефекты в его функциональной способности переносить кислород. Наличие дефектного гемоглобина придаёт эритроциту характерную серповидно-клеточную форму и приводит к заболеванию получившему название серповидно-клеточная анемия.

6.5.5. Поскольку в представленных на радиограмме образцах после фингерпринта минисателлитной ДНК спектр овечки Долли существенно отличался от спектров всех других овец, но оказался полностью идентичным спектру донорской овцы Фин Дорсет, это можно считать однозначным доказательством того, что Долли произошла из ядра соматической клетки данной овцы породы Фин Дорсет. Иными словами, Долли действительно была успешно клонирована из соматической клетки донорской овцы Фин Дорсет и поэтому их спектры ДНК идентичны.

6.5.6. Да, можно. Исходя из схематического изображения сиквенса фрагмента ДНК видно, что мутантный ген родопсина содержит вместо кодона ЦЦЦ новый кодон ЦАЦ. В результате этого в родопсине взамен аминокислоты пролин после процесса трансляции в состав цепочки вошла другая аминокислота гистидин, что и привело к нарушению функций важного зрительного белка. Таким образом, замена в родопсине всего одной аминокислоты вызвало серьезное наследственное заболевание пигментная ретинопатия, характеризующаяся прогрессирующей потерей зрения.

Амплификация фрагментов ДНК с помощью метода полимеразной цепной реакции

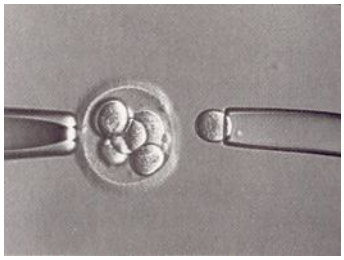
7.5.1. Исходя из данных молекулярно-генетического анализа микросателлитной ДНК из интронной части гена Cftr, полученных с помощью ПЦР и представленных на электрофоретическом спектре, можно однозначно сказать, что второй ребенок (фетус) не будет болен кисто-фиброзом. Но он является носителем данного заболевания (гетерозиготой), поскольку получил одну хромосому несущую дефектный ген от отца и нормальную от матери.

7.5.2. Зная, что второй ребенок гетерозиготен, вероятность того, что он, после вступления в брак передаст своим детям мутантный аллель, составит 50%. Поскольку мутантный аллель гена Cftr, является рецессивным, то у гетерозиготного родителя может родиться больной ребенок только в случае, если он встретит гетерозиготного супруга. Так как частота рецессивного мутантного аллеля в данной популяции составляет 0.03, можно, используя формулу Харди-Вайнберга, вычислить частоту гетерозигот, которая будет равна 0.06. Вероятность того, что второй гетерозиготный супруг передаст мутантный аллель, также равна 50 %, т.е. 0.06/2 = 0.03. Таким образом, вероятность рождения больного кисто-фиброзом (КФ)

ребенка у таких родителей будет 0.03 x 0.5 = 0.015 или 1,5%.

7.5.3. Не смотря на то, что для данной американской семьи проведение молекулярно-генетической диагностики заболевания Тея-Сакса на эмбриональной стадии путем амниоцитоза не решает проблемы рождения здорового ребенка по религиозным причинам, благодаря достижениям современной генетики выход был найден.

Для этого на первом этапе необходимо у жены взять несколько яйцеклеток и оплодотворить спермой мужа. На стадии развития восьми бластомеров из каждого пре-эмбриона можно безболезненно изъять для анализа по одному бластомеру. Фотография процесса извлечения одного бластомера (клетки) из восьмиклеточного эмбриона представлена на рисунке справа. После изъятия из каждого бластомера, на основе метода ПЦР необходимо получить достаточное для анализа количество ДНК и провести Саузерн-блот анализ полученной ДНК с использованием специального ДНК-зонда.



По электрофоретическим спектрам ДНК после Саузерн-блот анализа легко установить, имеется ли дефектный ген заболевания Тея-Сакса в гомозиготном и гетерозиготном состоянии в конкретном восьмиклеточном эмбрионе, или этот эмбрион является нормальной гомозиготой. Такие не несущие мутантных алелей эмбрионы и необходимо в первую очередь оставлять для имплантации и дальнейшего эмбрионального развития. В тоже время половина эмбрионов окажутся гетерозиготными, и у них также заболевание Тея-Сакса будет отсутствовать и в случае необходимости их можно использовать для имплантации.

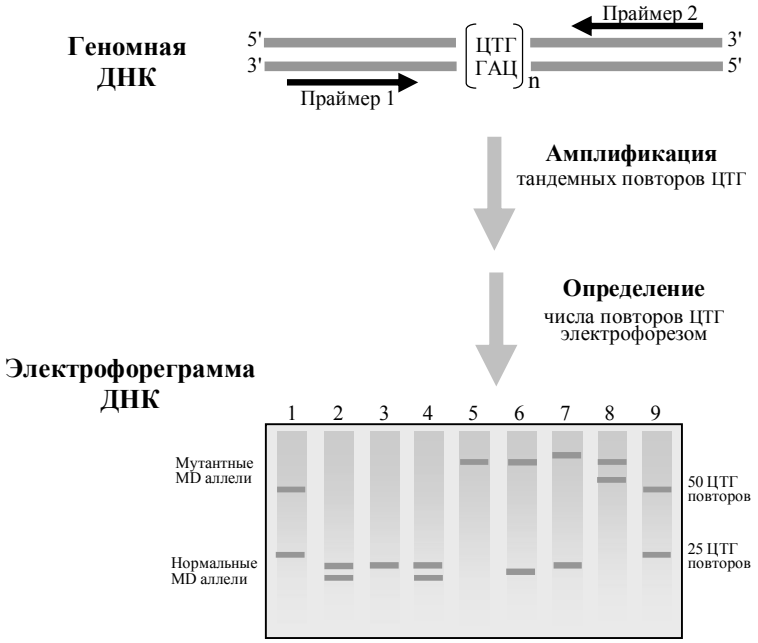
P.S. Выше названная религиозная американская семья, оба супруга в которой являются гетерозиготными носителями заболевания Тея-Сакса успешно прошли все этапы от зачатия в пробирке in vitro и молекулярно-генетического теста до рождения здорового ребенка. Сейчас их дочери Бритни 8 лет и родители счастливы.

7.5.4. Поскольку использование одного бластомера из восьми не повлияет на дальнейшее развитие эмбриона, то у каждого из 15 восьмиклеточных зародышей, полученных путем искусственного оплодотворения in vitro, можно безболезненно изъять для анализа по одному бластомеру. На следующем этапе из каждого бластомера, на основе метода ПЦР необходимо получить достаточное для анализа количество ДНК. Все это даст возможность провести Саузерн-блот полученной ДНК с использованием специального ДНК-зонда, позволяющего определить мутантный аллель.

По электрофоретическим спектрам ДНК после Саузерн-блот анализа легко установить, имеется ли дефектный ген заболевания кисто-фиброзом в гомозиготном и гетерозиготном состоянии в конкретном восьмиклеточном эмбрионе, или этот эмбрион не несет мутантного аллеля, т.е. является нормальной гомозиготой. Именно эти, гомозиготные по нормальному аллелю эмбрионы и следует оставить для имплантации и дальнейшего эмбрионального развития. В тоже время еще половина эмбрионов будут гетерозиготными, и у них также заболевание кисто-фиброз будет отсутствовать.

7.5.5. Поскольку оба родителя в исландской семье являются гетерозиготными носителями по гену заболевания кисто-фиброзом (мукополивисцидозом), то четверть зародышей должны нести ген заболевания в гомозиготном состоянии, а еще половина — в гетерозиготном. Иными словами, таких зародышей будет 11-12 из 15 восьмиклеточных зародышей, полученных in vitro.

7.5.6. Поскольку известна вся последовательность гена миотонической дистрофии (MD) то можно синтезировать олигонуклеотидные праймеры, комплементарные обеим цепочкам фрагмента ДНК в гене MD



Этапы тестирования района тринуклеотидных повторов ЦТГ в гене MD, ответственном за заболевание миотоническая дистрофия с использованием метода ПЦР и электрофореза. Образцы 1, 9 – маркеры с 20 и 50 повторами ЦТГ, образцы 2-4 – члены семьи с нормальными аллелями гена MD, 5-8 – образцы несущие мутантные аллели гена MD.

и размножить этот фрагмент методом ПЦР. Праймер 1 должен быть комплементарным району нижней (3'-5') цепочки, несущей последовательность ГАЦ, а праймер 2 должен быть комплементарен району верхней (5'-3') цепочки ДНК, несущей ЦТГ. После амплификации размер фрагмента ДНК содержащего ЦТГ повторы определяется электрофорезом. Количество тринуклеотидных повторов ЦТГ легко установить включением в гель в качестве маркеров последовательности ДНК с известным количеством повторов ЦТГ.

Все этапы тестирования заболевания миотонической дистрофии по гену MD с использованием методов ПЦР и электрофореза схематически представлены на рисунке выше. Если менее чем 30 копий ЦТГ повтора присутствует в каждой хромосоме, это означает, что ребенок, фетус или бластомер из восьмиклеточного пре-эмбриона является гомозиготным по нормальному MD аллелю (образец 3 на электрофореграмме выше) или гетерозиготным по двум нормальным аллелям (образцы 2, 4). Если более чем 50 копий ЦТГ повтора несет каждая гомологичная хромосома, то ребенок, фетус или пре-эмбрион является гомозиготным по доминантному мутантному аллелю MD (образец 5) или гететозиготным по различным мутантным аллелям (образец 8). Если одна хромосома содержит менее чем 30 копий ЦТГ повтора, а другая гомологичная хромосома содержит более чем 50 копий, то новорожденный, фетус или пре-эмбрион являются гетерозиготами несущими один нормальный, а другой мутантный аллели гена MD (образцы 6, 7).

7.5.7. Заменить одну аминокислоту в белке на другую можно путем **на-правленного введения точковой мутации** в праймер, с последующим проведением ПЦР. Так как надо заменить положительно заряженную аминокислоту лизин, кодируемую триплетом ААА, на другую аминокислоту, то нам достаточно будет заменить один из трех А на другой нуклеотид и использовать вместо ААА триплет ААТ, что приведет к замене лизина на аспарагин или ГАА, что заменит лизин на отрицательно заряженный глютомат. Так как в нашем случае триплет лизина лежит непосредственно перед сайтом рестрикции BamI можно при помощи ПЦР амплифицировать часть гена R-киназы длинной 1.2 kb от сайта HindIII до BamI.

При этом, включив при конструкции праймеров сайты рестрикции для HindIII и BamI мы сможем в дальнейшем по этим сайтам проводить клонирование амплифицированного участка гена R-киназы.

Для удобства конструирования нужных праймеров достроим вторую цепочку для участка гена R-киназы

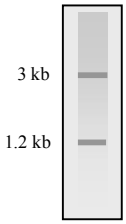
5'-ААГЦТТАТГАЦТЦАТГТГЦЦТ…….ЦЦТГТТТТА**ААА**ЦГГАТЦЦТТГ……..-3'
3'-ТТЦГААТАЦТТАГТАЦАЦГГА……ГГАЦАААТТТТГЦЦТАГГААЦ……..-5'

и легко построим первый праймер, который будет иметь последовательность 5'-ААГЦТТАТГАЦТЦАТГТГЦЦТ-3'. Что касается праймера №2, то если бы нам нужно было амплифицировать фрагмент гена без мутации, он бы выглядел следующим образом 5'-ЦААГГАТЦЦГ**ТТТ**ТАААЦАГГ-3', но поскольку нам нужно заменить лизин на аспартат, то триплет ТТТ в праймере №2 изменится на ТТЦ и наш праймер примет вид 5'-ЦААГГАТ-ЦЦГ**ТТЦ**ТАААЦАГГ-3'.

Построенные нами праймеры позволят с помощью ПЦР на первом этапе амплифицировать

(размножить) фрагмент киназного гена величиной 1.2 kb от сайта HindIII до BamI. Причем в этом фрагменте произойдет полное замещение триплета ААА, кодирующего лизин, на триплет ГАА, кодирующего глютомат.

Так как амплифицированный нами участок R-киназы длинной 1.2 kb будет естественно представлять собой двухцепочечную ДНК, то обработав его ферментами рестрикции HindIII и BamI мы получим молекулу с двумя липкими концами, которую можно использовать в дальнейшем клонировании.



На следующем этапе надо заменить участок исходного R-киназного гена от HindIII до BamI, на полученный нами с помощью ПЦР мутантный. Для этого надо вырезать данный участок из исходного конструкта в плазмиде pUC18 (см. рис. в условии задачи), используя рестриктазы HindIII и BamI. Полученную смесь двух молекул - 1.2 kb (фрагмент гена R-киназа) и 3 kb (2.7 kb pUC18 + 0.3 kb остаток гена R-киназа) для разделения необходимо подвергнуть электрофорезу в агарозном геле. Вследствие разной величины два фрагмента в геле легко отделятся друг от друга, что хорошо видно на рисунке справа. Верхнюю более тяжелую фракцию длинной в 3 kb можно вырезать из геля и после очистки (при помощи специальных смол) получим чистый фрагмент ДНК. Причем он будет иметь липкие концы по сайтам HindIII и BamI.

Далее сшиваем при помощи лигазы фрагмент длиной в 3 kb выде-ленный из геля, и фрагмент с мутацией длиной 1.2 kb полученный нами ранее при помощи ПЦР. В результате у нас будет новая генетическая конструкция с мутантным геном R-киназы встроенным в pUC18.

7.5.8. Если для амплификации гена из предыдущей задачи использовать праймеры с точковыми мутациями следующего состава 5'-ААГЦТТАТГ-АЦТ**ЦАГ**ГТГЦЦТ-3' и 5'-ЦААГГАТЦЦГ**ТТЦ**ТАААЦАГГ-3', то в белке R-киназа произойдет замещение третьей аминокислоты гистидин, которая кодируется триплетом ЦАТ на глицин, кодируемый новым триплетом ЦАГ, из-за замены Т на Г. Точковая мутация в другом праймере не приве-дет к изменению аминокислоты в белке, поскольку как триплет ААА, так и измененный вследствие мутации триплет ААГ будут кодировать одну и туже аминокислоту лизин (из-за вырожденности генетического кода).

7.5.9. Как и во всех предыдущих случаях, для облегчения построения праймеров к первой цепочке ДНК достроим вторую

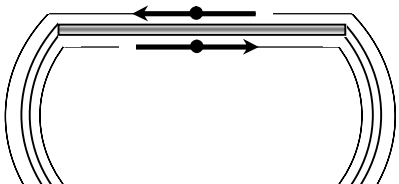
5'- ……АЦТААГГТГ|ЦТТЦАЦТТА …….АТАГГЦГАЦАААГАГТАЦ -3'
3'- ……ТГАТТЦЦАЦ|ГААГТГААТ.....ТАТЦЦГЦТГТТТ ЦТЦАТГ-5'.

Для того, чтобы амплифицировать молекулу ДНК с **делецией участка гена, кодирующего домен1**, праймер №2 для верхней цепочки (5'-3'), фланкирующий конец гена, должен иметь последовательность 5'-ГТАЦТЦ-ТТТГТЦГЦЦТАТ-3'.

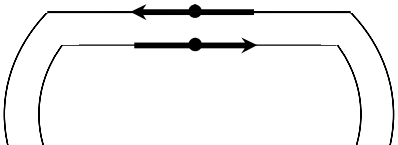
Что касается праймера №1 для нижней цепочки 3'-5', то если бы нам нужно было амплифицировать фрагмент гена от конца домена1 и начала домена2 до конца гена без изменений, он бы выглядел следующим образом 5'- АЦТААГ**ГТГ**|ЦТТЦАЦТТА -3'. Но поскольку нам нужно синтезировать белок без домена1, то в последнем триплете домена1 вместо ГТГ нужно ввести инициирующий кодон АТГ и тогда начало считывания белка начнется только с домена2. И поэтому праймер №1 должен иметь следующий вид: 5'-АЦТААГ**АТГ**|ЦТТЦАЦТТА -3'.

Таким образом, при использовании данных праймеров и амплифицированной новой ДНК с делецией по фрагменту, кодирующему домен1, будет транслироваться фермент фосфоглюкомутаза только с двумя доменами2 и 3.

7.5.10. Возможно. Для этого на первом этапе необходимо провести присоединение (отжиг) сконструированных олигонуклеотидных праймеров содержащих требуемую мутацию, к соответствующим комплементарным последовательностями встроенного в плазмиду участка ДНК. Далее используя специальный фермент Pfu Turbo ДНК-полимераза производим достраивание кольцевой молекулы ДНК плазмиды и встроенного фрагмента. В результате на обеих материнских матрицах образуются (достроятся) новые кольцевые цепочки ДНК уже с измененной последовательностью, содержащие точковую мутацию.



На втором этапе происходит разрушение только метилированной материнской ДНК с использованием эндонуклеазы DpnI. Данная эндонуклеаза избирательно разрушает метилированную ДНК, которая характерна для всех бактерий, но не затрагивает вновь синтезированную при помощи праймеров не метилированную плазмидную мутантную ДНК.



Плазмидами содержащими мутацию трансформируют XL10-Gold ультрокомпетентные бактериальные клетки. На завершающем этапе культивирование бактериальных клеток позволяет получить достаточно большое количество плазмид, несущих вставку ДНК с нужной мутацией.

ГЛОССАРИЙ ТЕРМИНОВ ПО ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

А

Авторадиограмма — фотографический отпечаток, фиксирующий расположение фракций ДНК, полученных в результате электрофореза и гибридизовавшихся с радиоактивно меченым зондом. Получают путем наложения чувствительной к радиоактивному излучению фотопленки на нитроцеллюлозную мембрану, полученную после Саузерн-блот гибридизации (см.).

Амниоцетез (*amniocentesis)* — взятие проб амниотической жидкости при пренатальной диагностике (см.) пороков развитая плода, генных и хромосомных мутаций, определении пола эмбриона путем прокола через кожу и мускулатуру брюшной полости, матку и амниотический мешок, окружающий плод. Клетки, отслаивающиеся от плода и находящиеся в жидкости в виде суспензии, культивируют в течение 3 недель, чтобы получить большее их количество и провести хромосомный, биохимический и молекулярно-генетический анализ. А. не может быть проведен раньше 16 недель беременности из-за недостаточных размеров мешка, в котором находится эмбрион.

Амплификация (*amplification)* — процесс увеличения (размножения) количества нитей ДНК, числа копий гена (см. Амплификация генов).

Амплификация генов (*gene amplification)* — 1. Увеличение числа копий к.-л. гена в данной клетке или в пробирке методом ПЦР — полимеразной цепной реакции (см.). 2. Любой процесс, при котором специфическая последовательность ДНК увеличивается непропорционально родительским клеткам. В течение развития некоторые гены амплифицируются в специализированных тканях, напр., рибосомные гены амплифицируются и активно функционируют в течение оогенеза, особенно в ооцитах некоторых амфибий. Гены у дрозофилы, кодирующие белки хорионов, также амплифицируются в овулирующих фолликулярных клетках.

Амплификатор, термосайклер (*amplificator or thermocycler)* — прибор, обеспечивающий по программе быстрое нагревание и охлаждение малых объемов реакционной смеси. А. используется для осуществления ПЦР — полимеразной цепной реакции (см.). Он позволяет проводить тепловую денатурацию ДНК (ок. 90-94°С), отжиг праймера (при 50°С) и удлинение праймера (синтез цепи ДНК при 70-72°С).

Антикодон — группа из трёх оснований, занимающая фиксированное положение в транспортной РНК (см. Транспортная РНК), которая комплементарна кодону (см.) в информационной (матричной) РНК (см. Информационная (матричная) РНК).

Б

Бактериофаг — вирус, поражающий определенный тип бактерий. Общее название вирусов, инфицирующих бактерии – фаги (бактериофаги).

Бактериофаг λ, фаг λ — умеренный бактериофаг, инфицирующий *E. coli* (см.). Его геном представляет собой линейную двунитчатую ДНК размером в 49 кб, упакованную в белковую оболочку. На каждом 5'-конце ДНК имеются одноцепочечные комплементарные участки (см. *Cos*-сайты) длиной в 12 нуклеотидов (см. Липкие концы, Космиды), что позволяет ей образовывать кольцевые структуры после попадания в клетку-хозяина. Фаг λ обладает способностью к умеренной инфекции, т. е. кроме разрушения клетки он может встраивать свою ДНК в хромосому бактериальной клетки и длительное время реплицироваться синхронно с ДНК хозяйской клетки.

Банк генов (*gene bank*) — набор генов данного организма, полученный на основе рекомбинантных ДНК (см. Геномная библиотека, Библиотека генов).

Библиотека генов *(gene library)* — коллекция произвольно клонированных фрагментов геномной ДНК организма (см. Геномная библиотека, Банк генов) или специальный набор фрагментов ДНК, представляющих, напр., коллекцию иРНК (см. РНК информационная, кДНК), экспрессирующуюся в клетке в определенное время. В таких библиотеках фрагменты инсерцируются (включаются) в подходящие вектора, напр, космидные (см. Космида) или бактериальные векторы, и трансформируются (см. Трансформация) в подходящего хозяина. В идеале геномная библиотека должна содержать практически весь геном вида, из которого она происходит, а библиотека кДНК — все различные молекулы иРНК данной клетки на одной и той же стадии развития. Сейчас сконструировано множество типов генных библиотек для различных целей исследования.

Бластомеры (*blastomere*) — дробящиеся клетки, образующиеся при митотических делениях яйцеклетки (зиготы), которые обладают потенциями, реализуемыми в процессе развития. Б. не растут, поэтому уменьшаются в размерах при последовательных делениях.

Бластула (*blastula*) — зародыш многоклеточных животных, образующийся в процессе последовательных дроблений яйца (зиготы), от типа которых зависит строение Б.

Блоттинг (**blotting –** промакание) — этап процесса Саузерн-блот гибридизации, в результате которой весь электрофоретический спектр ДНК отпечатывается (blotting) за счет капиллярных сил на приложенной к гелю нитроцеллюлозной мембране (пленке), после чего фиксируется при помощи высокой температуры.

В

Вектор, переносчик — молекула ДНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках различных организмов, включать в себя чужеродную ДНК и обеспечивать размножение (клонирование) и работу (экспрессию) встроенного в неё искусственно какого-либо гена. Является инструментом генной инженерии, обеспечивающим доставку (перенос) генетической информации в клетку-реципиент и ее клонирование (см.).

λ вектор — вектор сконструированный на базе фага λ (см.), использующийся при клонировании достаточно больших фрагментов чужеродной ДНК длиной около 15 кб.

Величина генома (*genome size)* — количество пар оснований (п. о.) в расчете на гаплоидный геном (см. Гаплоидный набор).

Вирусы — формы внеклеточной жизни, которые состоят из ДНК (ДНК-вирусы: аденовирусы, бакуловирусы, геминивирусы и др.) или РНК (РНК-вирусы: бромовирусы, ретровирусы и др.) и белковой оболочки. В. не содержат клеточных органелл и используют для репликации метаболизм клетки хозяина. Клетка хозяина может быть разрушена в процессе репликации, и В. освобождается из клетки. В., патогенные для бактерий называют бактериофагами (см.).

Вирус *sv*-40, вирус обезьян — полиомавирус, геном которого состоит из кольцевой двунитчатой молекулы ДНК размером в 5,2 кб, содержащей 5 генов. Впервые был обнаружен у зеленой африканской обезьяны (зеленой мартышки) *Cercopithecus aethiops.* Инфицирует культивируемые клетки приматов, исключая человека. Размножение В. о. приводит к образованию до 100 000 вирусных частиц в одной клетке — это его свойство позволяет использовать вирусную ДНК в качестве эффективного вектора в генной инженерии.

Вырожденность кода — в молекулярной биологии генетический код (см.) является вырожденным, поскольку одна аминокислота кодируется более чем одним нуклеотидным триплетом, кодоном (см.). Напр., тирозин кодируется двумя триплетами УАУ и УАЦ, а лейцин может кодироваться даже шестью.

Г

***β*-галактозидаза** (*β-galactosidase)* — фермент, который катализирует расщепление лактозы на глюкозу и галактозу. У *E. coli β*.-г. является тетрамером, кодируемым *1ac-Z*-геном, размером 500 Д. *β*.-г. относится к группе адаптивных ферментов, т. е. его синтез возможен только при наличии субстрата (лактозы) во внешней среде.

Гель — желеобразный матрикс, состоящий из полимерного компонента и буферного раствора, используется для разделения в процессе электрофореза макромолекул ДНК (агарозный Г.), РНК (агарозный, полиакриламидный Г.) или белков (полиакриламидный или крахмальный, Г.).

Ген — основная физическая и функциональная единица наследственности, несущая информацию от одного поколения к другому. Г. представляет собой специфическую последовательность нуклеотидов в ДНК, а у некоторых вирусов — в РНК, детерминирующих или нуклеотидную последовательность транспортных РНК (тДНК), или рибосомных РНК (рДНК), или последовательность аминокислот в белках. Как правило, Г. состоят из кодирующих (экзоны) и некодирующих (интроны) последовательностей. Интронные последовательности чаще всего встречаются у эукариот. Любой Г., занимает строго определенное место, или локус, в хромосоме и может мутировать в различные аллельные состояния, а также рекомбинировать с гомологичными генами. Действие Г. проявляется в фенотипе. По выполняемым функциям Г. подразделяют на 3 класса: а) структурные Г., которые транскрибируются (см. Транскрипция) на ДНК, а затем транслируются на рибосомах (см. Трансляция) в полипептидные цепочки; б) структурные Г., которые транскрибируются в рРНК или тРНК и сами непосредственно используются; в) регуляторные Г., которые не транскрибируются, но служат сайтами узнавания (см.) для ферментов и др. белков при репликации и транскрипции ДНК. Термин введен В. Иогансеном в 1909 г. и нередко заменяется понятиями "наследственный фактор".

Ген устойчивости — ген, кодирующий белок, который катализирует разрушение токсина. Г. у. часто используются в векторах клонирования (см.) для облегчения отбора трансформантов (напр., ген антибиотикоустойчивости и др.).

Генетическая дактилоскопия и идентификация индивидуумов — точная идентификация (дактилоскопия) индивидуумов животных и растений на основе молекулярно-генетического анализа индивидуальных образцов ДНК (см. Генная дактилоскопия, ДНК-фингерпритинг, Фингерпринт ДНК, Сиквенирование ДНК, ПЦР-технологии).

Генетическая инженерия, генная и. — 1. Наука о генетическом конструировании, направленном создании новых форм биологически активных ДНК и генетически новых форм клеток и целых организмов с помощью искусственных приемов переноса генов (технологии рекомбинантных ДНК, генетической трансформации, гибридизации клеток). 2. Экспериментальные разделы молекулярной и клеточной биологии, которые позволяют *in vitro* изменять структуру генов, создавать новые гены или конструировать химерные гены (см. рекомбинантная ДНК). Г. и. возникла в 1972 г., когда впервые П. Берг создал рекомбинантную ДНК, включавшую в себя фрагменты фага-λ, *E. coli* и вируса обезьян *sv*40 (см.).

Генетическая трансформация *(genetic transformation)* — см. Трансформация.

Генетические карты — карты линейного расположения генов на хромосоме (группы сцепления), выявленные в экспериментах по генетическим рекомбинациям, а также распределение генов по разным хромосомам, как правило, с указанием генетического расстояния между ними.

Генетический код — система записи наследственной информации в молекулах нуклеиновых кислот (см.), основанная на определенном чередовании последовательностей нуклеотидов в ДНК или РНК, образующих кодоны (см.) соответствующих аминокислот белков. Каждый кодон кодирует одну молекулу аминокислоты. Г. к. триплетен (см. Триплет) — 3 нуклеотида кодируют 1 аминокислоту. Последовательности нуклеотидов в иРНК (см. РНК информационная) обозначены от 5' до 3', т. е. слева направо, т. к. имеется определенная направленность трансляции (см.). Код называют вырожденным (см. Вырожденность кода), если аминокислота определяется не одним, а большим числом кодонов. Код читается с фиксированной точки старта, в одном направлении, по 3 последовательно следующих друг за другом нуклеотида (триплета). Г. к. универсален для всех живых организмов.

Генная дактилоскопия — точная идентификация (дактилоскопия) личности на основе молекулярно-генетического анализа индивидуальных образцов ДНК (см. ДНК-фингерпритинг, Фингерпринт ДНК).

Геном (*genom*) — совокупность генов, характерных для гаплоидного набора хромосом данного вида организмов.

Основной гаплоидный набор хромосом.

Геномная библиотека (*genomic library)* — набор клонированных (см. Клонирование) фрагментов ДНК, представляющих индивидуальный (видовой) геном (см. Библиотека генов, Банк генов). У млекопитающих (в т. ч. у человека) геномы крупные, поэтому для них обычно создают хромосомные библиотеки (см.).

Гекомная ДНК (*geitomic DNA)* — 1. Вся хромосомная ДНК организма; 2. Ядерная ДНК в клетках эукариот (см. Дезоксирибонуклеиновая кислота).

Гибридизация праймеров — вторая стадия ПЦР в ходе которой при снижении температуры в реакционной смеси *in vitro* с 92°С до 50°С происходит гибридизация праймеров с матричными цепями ДНК (см. отжиг). Эта стадия обычно протекает 30 секунд.

Гибридная (рекомбинантная) ДНК — новая последовательность ДНК, образованная *in vitro* путем лигирования (см.) двух или более негомологичных молекул ДНК. Напр., рекомбинантная плазмида (см.), содержащая одну или более вставок чужеродной ДНК, которые включены в сайт клонирования или в полилинкер. Организмы, содержащие такие *in vitro* сконструированные ДНК, также относятся к рекомбинантам (рекомбинантный фаг, бактерия). Рек. ДНК широко используется в генетической инженерии *in vitro.*

Д

Двухцепочечная молекула кДНК — см. кДНК, комплементарная ДНК.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) — высокомолекулярный полимер, состоящий из четырех дезоксирибонуклеотидов (А, Т, Ц, Г), апериодическим чередованием которых кодируется генетическая информация вирусов, бактерий и высших организмов. ДНК может быть однонитчатой (*ss*ДНК), как, напр., у некоторых вирусов, или двунитчатой (*ds*ДНК) у всех высших организмов. У двунитчатой ДНК две комплементарные нити закручены в спираль, одна нить вокруг другой с противоположной ориентацией (антипараллельны, 5' → → → 3' и, наоборот, 3' → → → 5'). Две нити удерживаются вместе водородными связями между комплементарными основаниями (А = Т; Г = Ц). ДНК способна к самоудвоению, что обеспечивает генетическую преемственность между поколениями в процессе размножения. Нарушение последовательностей нуклеотидов в цепи ДНК приводит к наследственным изменениям — мутациям.

Денатурация ДНК — 1. Процесс разъединения двойной спирали нуклеиновых кислот на комплементарные одноцепочечные нити под действием физических и химических факторов (температуры, давления, pH и др.). 2. Первая стадия ПЦР в ходе которой происходит нагревание температуры в реакционной смеси *in vitro* до 90°С. При этом, в течении 15 секунд происходит разрушение слабых водородных связей между нитями ДНК, и из одной двухцепочечной молекулы ДНК образуется две одноцепочечные.

ДНК-ДНК гибридизация *(DNA-DNA hybridization)* — процесс образования двухцепочечной ДНК из двух комплементарных однонитчатых молекул ДНК.

ДНК-лигаза — фермент, который катализирует образование фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами в молекуле ДНК. Связи образуются между С—С, С—S, С—О и С—N за счет энергии сопряженной реакции гидролиза. В технологии рекомбинантной ДНК используются в основном две ДНК-л., выделенные из *E. coli* и *T4.* ДНК-л. соединяет две молекулы ДНК путем лигирования (см.) тупых или липких концов. Впервые была выделена Б. Вейсом и К. Ричардсоном в 1966 г.

ДНК-зонд (проба) — определенная (известная) радиоактивно- и нерадиоактивно меченая последовательность нуклеиновой кислоты, используемая в молекулярном клонировании для идентификации специфических молекул ДНК, имеющих комплементарные последовательности. Для этого используется радиоавтография или к.-л. др. система детекции (обнаружения) нерадиоактивно меченого зонда.

ДНК-матрица (*template*) — последовательности оснований ДНК (РНК), служащие в качестве основы для синтеза комплементарных нитей нуклеиновых кислот (см.).

ДНК-полимеразы *(DNA-polymerases)* — ферменты, участвующие в синтезе ДНК. У *E. coli* были выделены 3 типа ДНК-п.: *pol I, pol II* и *pol III. Pol III* является основным ферментом, ответственным за репликацию (см.) ДНК в клетке бактерий. Два др. фермента функционируют преимущественно при восстановлении (репарации) ДНК. Эукариоты содержат множество видов ДНК-п., находящихся в разных частях клетки: в ядре, цитоплазме или митохондриях, и выполняют различные функции, такие, как репликация. репарация и рекомбинация.

ДНК-фингерпринтинг, метод (техника) создания фингерпринта (*DNA fingerprinting or DNA fingerprint technique)* — (см. Фингерпринт ДНК), для чего геномная ДНК рестриктируется эндонуклеазами (см.), образующиеся фрагменты разделяются при помощи гелевого электрофореза (см.), переносятся на мембраны (нитроцеллюлозные фильтры, см.) и гибридизуются с мечеными зондами (с.м.) для фингерпринта (ДНК фага *M13*, различные синтетические олигонуклеотиды, кДНК; геномные зонды, содержащие последовательности генов; мини- и микросателлиты ДНК). В случае наличия в исследуемой ДНК участков, гомологичных зондам, образуются полиморфные полосы гибридизации, как правило, специфичные для каждого образца ДНК. Поэтому метод может быть использован для генетической идентификации (дактилоскопии) индивидуумов одного вида. Применяется при картировании геномов, выяснении отцовства, в криминалистике.

Е

***Escherichia coli, E. coli*, кишечная палочка** — грамотрицательная кишечная бактерия, широко известная в молекулярной биологии. Её геном (хромосома) включает ок. 4500 кб ДНК, организованных в 50 независимых топологических доменов, и содержит серию инсерций. В н. вр. весь геном *E. coli* секвенирован полностью. *E. coli* имеет большое значение для экспериментальных исследований рекомбинантной ДНК (см.), т. к. она служит хозяином для большого числа разных вирусов, плазмид и космидного клонирования векторов (см. Вектор клонирования. Космида).

EcoRI — одна из широко применяемых рестрикционных эндонуклеаз, или рестриктаз (см.), извлекаемая из *Escherichia coli*, которая в двухцепочечной ДНК узнает последовательность из шести нуклеотидов ГААТТЦ и разрезает ее между Г и А, образуя липкие концы (см.). В н. вр. выделено 7 рестриктаз группы *EcoR* — от *EcoRI* до *EcoRVII.*

И

Информационная (матричная) РНК (и-РНК, мРНК) — форма РНК, осуществляющая передачу записанной в ДНК информации к местам синтеза белка, состоит из одной цепи, содержит от одной до десяти тысяч пар оснований.

Интроны, интрогенные районы (*introns or intragenic regions or intervening sequences)* — последовательности нуклеотидов у эукариотических генов, транскрибируемых в про-иРНК, которые затем вырезаются и деградируют в ядре. Остающиеся последовательности транскрипта (см. Экзоны) соединяются, образуя зрелую информационную РНК (см.), с которой осуществляется трансляция белка. Т. о. И. никогда не присутствуют в белке. И. различаются по длине (от 50 до 12000 нуклеотидов), по их числу на один ген (один и более) и по последовательности нуклеотидов. Однако в большинстве И. пограничные сайты между И. и экзоном идентичны. Эти пограничные участки обеспечивают правильное вырезание (эксцизию, см.) И. и сплайсинг экзонов.

Искусственные генетические структуры — целенаправленно сконструированные (созданные) новые формы биологически активных ДНК и генетически новые формы клеток с помощью искусственных приёмов переноса фрагментов ДНК, целых генов или их частей.

***In vitro* (лат.), "в пробирке"** — биологические процессы, смоделированные при их экспериментальном изучении в условиях изоляции от всего (целого) организма, т. е. "в пробирке", напр., культура ткани, фермент-субстратная реакция и т.д.

К

Картирование (*mapping)* — установление позиций генов или каких-то определенных сайтов (см.) вдоль нити ДНК (см. Генетические карты, Рестрикционные карты).

Картирование генов *(gene mapping)* — установление линейной организации генов, определение относительной локализации генов на хромосомах (см. Хромосомные карты) или плазмидах (кольцевая карта сцепления) и относительного расстояния между ними. Генетические карты можно создавать на основе анализа рекомбинаций (см.), принятого в классической генетике, или на основе данных молекулярной генетики, т, е. напрямую используя данные сиквенса ДНК (см. Сиквенирование ДНК).

Кб, килобаза *(kb, kilobase)* — единица, используемая для выражения размера нуклеиновых кислот (см.), 1 кб = 1000 нуклеотидов, или пар оснований (п. о.), в двухцепочечной ДНК.

кДНК, комплементарная ДНК *(cDNA, complementary DNA)* — одно- или двунитчатая молекула ДНК, комплементарная молекуле иРНК. Образуется при обратной транскрипции иРНК с помощью обратной транскриптазы (см.) *in vitro.* кДНК соответствует определенному гену без интронов.

Кишечная палочка — см. ***Escherichia coli***.

Клонирование *(cloning or molecular c.)* — получение клонов (см.) с помощью одного или многих методических приемов. Различают клонирование генов — выделение и амплификация отдельных генов в реципиентных клетках, а также молекулярное клонирование — размножение молекул ДНК в составе вектора.

Клонирование гена *(gene cloning)* — см. Клонирование

Клонирование ДНК (*DNA cloning)* — использование технологии рекомбинантной ДНК для инсерции (включения) фрагмента ДНК, напр, гена, в клонирующий вектор (см.) и размножение этой последовательности путем трансформации вектора в подходящую клетку-хозяина, напр, в клетки кишечной палочки.

Кодон — последовательность из трех соседних нуклеотидов в ДНК или РНК, кодирующая определенную аминокислоту либо начало и конец трансляции (см.), т. е. это дискретная единица генетического кода. Всего возможно 64 сочетания нуклеотидов в триплетах — 61 из них кодирует 20 аминокислот, а 3 являются нонсенс-кодонами (см. Стоп-кодон).

Кольцевые молекулы ДНК — см. плазмиды (кольцевые).

3'-Конец *(3'-carbon atom end or 3'-terminus)* — один из концов линейной молекулы ДНК или РНК, несущий нуклеотид со свободной гидроксильной группой (OH^-) у 3'-атома углерода рибозы или дезоксирибозы.

3'-Конец праймера — конец праймера со свободной гидроксильной группой (OH) у 3' атома углерода рибозы с которого Tag-полимераза достраивает растущую цепь ДНК в 5'-3' направлении на третьей стадии цикла ПЦР (см.).

5'-Конец *(5'-carbon atom end or 3'-terminus)* — один из концов линейной молекулы ДНК или РНК, несущий нуклеотид со свободной гидроксильной (OH^-) группой у 5'-атома углерода рибозы или дезоксирибозы. С 5'-конца начинается синтез полинуклеотидных цепей в процессе репликации (см.), транскрипции (см.) и репарации (см.).

Конкатамер ДНК *(DNA concatemer)* — структура из нескольких повторяющихся (одна за другой) единиц гена. У некоторых фагов (напр., фагλ и *T4)* геном во время репликации представлен в виде конкатамерных молекул — больших молекул ДНК, образованных из нескольких тандемно повторяющихся единиц генома.

Конструирование гибридных молекул ДНК — создание новых форм биологически активных ДНК с помощью искусственных приёмов переноса и сшивания различных фрагментов ДНК.

Концевая (терминальная) трансфераза (*terminal transferase)* — фермент, катализирующий достройку 10-40 дезоксинуклеотид-5'-трифосфатов к 3'-OH-группам обоих концов двунитчатой ДНК или к однонитчатой ДНК, образуя 3'-гомополимерное удлинение нити (полидезоксиаденилат) и освобождая неорганический пирофосфат. Фермент используется для радиоактивного мечения молекулы ДНК и образования гомополимерных хвостов на 3'-концах ДНК. Т. т. широко используется в технологиях рекомбинантной ДНК (см.).

Космиды — векторная плазмида, содержащая *cos*-участок *(cos*-сайт) ДНК фага лямбда, являющийся местом замыкания его линейной формы в кольцо. Благодаря наличию *cos*-участка К., включающая чужеродные гены, может быть упакована в головку фага *in vitro*. Метод клонирования ДНК с использованием К. разработан Дж. Коллинзом и Б. Холманом в 1977 г.

Л

***lac-Z*-ген** (*lac-Z-gene)* — ген лактозного оперона *E. coli,* кодирующего *β*-галактозидазу. Этот фермент катализирует превращение дисахаридов лактозы в моносахариды и глюкозу. *lac-Z-ген* входит в состав различных клонирующих векторов и выполняет роль репортерного гена (см.) в экспериментах по трансформации.

Лигаза, синтетаза — см. ДНК-лигаза.

Лигирование *(ligalion)* — 1. Процесс ковалентного соединения двух линейных молекул нуклеиновых кислот посредством фосфодиэфирных связей, осуществляемый с участием фермента лигазы. 2. Прием в генетической инженерии, в ходе которого чужеродная ДНК встраивается между двумя концами плазмидной ДНК с помощью фермента лигазы (см.).

Лизирование, лизис (*lysis)* — разрушение растворение вирусами, клеток хозяина под действием ферментов, содержащихся в лизосомах и выделяемых инфицирующими вирусными частицами, в результате чего в среду высвобождается новое потомство вируса.

Лизогения (*lysogeny or lisogenicity)* — состояние бактериальной клетки, при котором в ее хромосоме находится один или несколько встроившихся умеренных бактериофагов (профагов) и при этом не инициируется синтез фагового материала, а профаги репродуцируются вместе с хромосомами хозяина, передаваясь при каждом клеточном делении в дочерние клетки. При Л. бактериофаг сохраняет способность выходить из генома клетки-хозяина.

Линкер, линкерная ДНК *(linker, l. DNA)* — Синтетический олигодезоксирибонуклеотид определенной последовательности, содержащий один или несколько сайтов узнавания (см.) для рестрикционных эндонуклеаз (см.). Л. может быть лигирован к любому тупому концу (см.) дуплексной ДНК с помощью *T4*ДНК-лигазы (см.).

Липкий конец — термин, относящийся к двунитчатой молекуле ДНК, у которой одна нить длиннее ("выступающая"), чем другая ("заглубленная"). Выступающий участок нити может спариваться с др., комплементарным ему выступающим (липким) концом. Пример: два коротких (12 нуклеотидов) однонитчатых 5'-выступов на каждом конце линейного генома фага лямбда (cos-сайт). Эти Л. к. комплементарны по последовательностям нуклеотидов друг другу и могут спариваться, образуя кольцевую ДНК.

М

Маркер для селекции (селективный маркер) — специальный ген, кодирующий устойчивость к к.-л. антибиотику (напр., канамицину), который вводят в вектор для последующего отбора трансформантов.

Минисателлиты (*minisatelliles)* — короткие (9-64 н.п.), среднеповторяющиеся, тандемно организованные, высоковариабельные последовательности ДНК (обычно богатые ГЦ-последовательностями), рассредоточенные по геному человека (встречаются также у растений и животных). Они имеют одну общую короткую последовательность в 10-35 н.п. М.-с. проявляют значительный полиморфизм по длине, который возникает в результате неравного кроссинговера). В итоге в М.-с. изменяется число коротких тандемных повторов (см.), что ведет к образованию последовательностей длиной от 0,1 до 20 кб. Короткий тандемно повторяющийся М.-с., являясь хорошим генетическим маркером для анализа сцепления (см. ДНК-фингерпринтинг), может использоваться в качестве гибридизационного зонда для одновременного обнаружения высокополиморфных М.-с. в пределах рестриктов ДНК. Вероятность идентичности того же набора фрагментов ДНК у двух человек теоретически настолько мала, что каждый человек считается уникальным по набору полос (за исключением однояйцевых близнецов, см.), выявляющихся в результате гибридизации на радиоавтографах.

Молекула ДНК — см. Дезоксирибонуклеиновая кислота.

Молекулярная биология — область биологии, исследующая проявление жизни на молекулярном уровне. Основное направление М. б. — выяснение роли биологически важных молекул (белков, нуклеиновых кислот и др.) в росте и развитии организмов, хранении и передаче наследственной информации, превращении энергии в живых клетках и т. п. явлениях. М. б. включает в себя молекулярную генетику, молекулярную вирусологию, молекулярную иммунологию и т. д. М. б. сформировалась в середине XX в. и бурно развивается в наши дни.

Молекулярная генетика — раздел современной генетики, изучающий закономерности и молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и передачи наследственных признаков.

Молекулярно-генетическая диагностика наследственных заболеваний — точная идентификация наследственных заболеваний на основе молекулярно-генетического анализа индивидуальных образцов ДНК (см. Саузерн-блот анализ, ДНК-фингерпритинг, Сиквенирование ДНК**,** ПЦР-технологии). Молекулярно-генетическая диагностика может давать точную идентификацию наследственных заболеваний на всех стадиях развития и жизни организма человека, начиная с восьмиклеточной бластулы (пре-эмбриона), всех эмбриональных стадий внутриутробного развития, пост эмбриональных стадий и т.д.

Н

Наследственно измененные организмы — см. Трансгенные организмы. Трансформированные организмы.

Нитроцеллюлозная (пленка) мембрана — состоит из нитроцеллюлозных нитей, образующих поры определенного размера (0,45μм). Селективно (выборочно) улавливают двунитчатую ДНК или ДНК-РНК-гибриды, но свободно пропускают однонитчатые молекулы. Однонитчатые ДНК и РНК также могут задерживаться на Н. м., если ее проинкубировать при 80 °С в течение 2 ч (спекание). Такие блоты (пленки) используются в Саузерн- и Нозерн-блот экспериментах.

Нуклеотиды — органические вещества, состоящие из пуринового или пиримидинового основания, сахара рибозы (дезоксирибозы) и фосфорной кислоты; составная часть нуклеиновых кислот и многих коферментов (НАД, НАДФ, кофермента А и др.). Н. также называют нуклеозидфосфатами: аденозинмонофосфат (АМФ), гуанозинмонофосфат (ГМФ), цитидинмонофосфат (ЦМФ), уридинмонофосфат (УМФ) и тимидинмонофосфат (ТМФ). Н. являются некоторые макроэргические соединения, напр. АТФ.

О

Обратная транскриптаза, РНК-зависимая ДНК-полимераза, ревертаза (*reverse transcriptase, RNA-dependent DNA-polymerase)* — ретровирусный многофункциональный фермент класса трансфераз, синтезирующий двунитчатую ДНК с использованием в качестве матрицы однонитчатой РНК. О. т. широко используются в ДНК-рекомбинантной технологии для синтеза кДНК (см.) с информационной РНК и в генной инженерии для получения нужных ДНК *in vitro.* У некоторых ретровирусов (см.) О. т. является мономером, у других — димером.

Олиго(dT) праймер (*oligo(dT) primer* — синтетический гомополимерный олигодезоксирибонуклеотид, который может быть подсоединен к поли(А)хвосту (см.) полиаденилированной иРНК и использоваться как праймер (см.) для синтеза первой нити кДНК с помощью обратной транскриптазы.

Олигонуклеотидные затравки — см. праймер.

Отжиг (*annealing*) — процесс восстановления (ренатурация), называемый также гибридизацией, нуклеиновой кислоты, во время которого одноцепочечные полинуклеотиды образуют двухцепочечную молекулу с водородной связью между комплементарными нуклеотидами двух цепей. О. может происходить между комплементарными цепочками ДНК или РНК, в результате образуются гибридные двухцепочечные молекулы. Название обусловлено тем, что процесс О. связан с первоначальным нагреванием образца и последующим его охлаждением.

П

Первая рекомбинантная (гибридная) молекула ДНК — создана в 1972 г. П. Бергом, которая включала в себя фрагменты фага λ, *E. coli* и вируса обезьян *sv-40.*

Плазмиды — внехромосомный (экстрахромосомный) генетический элемент, кольцевая, автономно реплицирующаяся дуплексная молекула ДНК, имеющая размеры от 1 до 200 и более кб и от одной до нескольких сот копий на бактериальную клетку. Число копий П. может зависеть от факторов среды. П. обычно придают селективные преимущества клетке хозяина (напр., устойчивость к антибиотикам). Конъюгативные П. имеют набор генов, обеспечивающих их перенос в др. клетки. Бактериальные П. широко используются для конструирования векторов клонирования. Термин «П.» предложен Дж. Ледербергом и др. в 1952 г.

Плазмида pBR322 — серия сравнительно небольших, мультикопийных и неконъюгативных плазмидных векторов клонирования, содержащих гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину, а также несколько уникальных сайтов клонирования (или полилинкеры). Сайты клонирования локализованы в пределах одного из генов устойчивости. Это позволяет обнаруживать инсерцированную чужеродную ДНК по исчезновению устойчивости к антибиотику на селективной среде. Плазмида синтезирована в 1977 г. мексиканскими исследователями Боливаром и Родригесом. Они использовали ген тетрациклин-устойчивости от *pSC*101*,* ориджин репликации *ori* и *rep*-ген от *ColE1,* а ген ампициллин-устойчивости — от транспозона *Tn 3*. Плазмида реплицируется в *E. coli*.

Плазмида pSC101 — первая плазмида, которую начали использовать в генной инженерии. Несет только один сайт рестрикции для EcoR1 и превращается под действием этого фермента из кольцевой в линейную молекулу, концы которой могут «слипаться» между собой или с любыми фрагментами другой ДНК, полученными под действием той же рестриктазы. Обладает геном устойчивости к антибиотику тетрациклину и поэтому легко обнаруживается в бактериях на среде с этим антибиотиком. Все эти свойства pSC101 и были использованы для создания и клонирования первых гибридных (рекомбинантных) ДНК (см.).

Плазмида pUC18 — один из серии относительно мелких *E. coli* плазмидных векторов клонирования (см.), содержащий *PvuII / EcoR*-фрагмент из pBR322 (см.) с amp^r геном, кодирующим ампиниициллин-устойчивость, ориджином репликации *ori* (см.) и последовательностями, кодирующими *α*-пептид *lac-Z*-гена (*β*-галактозидазы) с полилинкером (см.). Инсерция чужеродной ДНК в полилинкер приводит к нарушению *β*-галактозидазного гена. В этом случае хозяйская бактериальная клетка образует бесцветные колонии, если она растет на среде с ампициллином и субстратом *X-gal*, который должен расщепляться при помощи *β*-галактозидазы. Штаммы, трансформированные плазмидой pUC18 без вставки чужеродной ДНК на той же среде с *X-gal*, образуют колонии окрашенные в синий цвет. Т. обр., можно легко отбирать рекомбинантные (т. е. с чужеродной ДНК) колонии.

Поли(А), полиаденилат (*poly(A) or polyadenylate)* — гомополимер, содержащий остатки адениновых нуклеотидов. Практически все мРНК эукариот на своих 3'-концах содержат последовательность поли(А) или поли(А) хвост.

Полилинкер, сайт множественного клонирования (*polylinker or multiple cloning site)* — синтетический двунитчатый олигонуктлеотид, содержащий много сайтов рестрикции (см.). П. вводят в векторы, чтобы расширить их возможности для клонирования чужеродных ДНК в любом из этих сайтов.

Полимеризация — третья стадия цикла ПЦР в ходе которой при увеличении температуры в реакционной смеси *in vitro* с 50°С до 72°С *Tag*-полимераза удлиняет оба праймера с их 3'-концов до размеров матричной нити ДНК. Этот процесс протекает в течении 90 секунд. В результате количество ДНК удваивается. Фермент *Tag*-полимераза был выделен из термофильных бактерий *Thermus aquaticus*, и отличается устойчивостью к высокой температуре. При температуре 70°С гибрид праймер-ДНК не денатурирует, а *Tag*-полимераза способна работать с большой скоростью.

Полимеразная ценная реакция, ПЦР (*polymerase chain reaction, PCR*) — процесс амплификации (см.) *in vitro,* при котором фрагмент ДНК длиной до 15 кб может быть амплифицирован (размножен) до 10^8 раз (копий). Для этого синтезируются два олигонуклеотида размером в 10-30 нуклеотидов, комплементарных последовательностям на двух концах исследуемой ДНК. Избыточное количество этих двух олигонуклеотидных праймеров (см.) смешивается с геномной ДНК, смесь нагревается для денатурации дуплексов ДНК. При последующем снижении температуры

праймеры присоединяются к их геномным гомологам и могут с помощью ДНК-полимеразы удлиниться, т. е. на ДНК-матрице синтезируется вторая цепь. Последовательный процесс (цикл процессов) денатурации, отжига праймера и его удлинения повторяется 20-40 раз. В результате происходит экспоненциальное увеличение копий изучаемой ДНК. За 25 амплификационных циклов количество целевых последовательностей ДНК увеличивается приблизительно в 10^6 раз. Для синтеза новых цепей ДНК используются термостабильные ДНК-полимеразы (*Taq*-полимераза, *Vent*™-ДНК-полимераза). В н. вр. ПЦР нашла широкое распространение в молекулярной биологии и на ее основе разработано множество методов анализа геномов. Имеет место также инвертированная полимеразная цепная реакция, т. е, модификация обычной ПЦР, позволяющая амплифицировать неизвестные последовательности ДНК, прилежащие к коровой области известной последовательности.

Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами (*arbitrarily primed polymerase chain reaction, AP-PCR*) — модификация стандартного метода ПЦР, позволяющая осуществлять амплификацию (см.) целевых последовательностей ДНК с помощью произвольно взятых праймеров (см.), без предварительного знания нуклеотидных последовательностей данного генома. Метод позволяет выявлять полиморфизм между штаммами бактерий и грибов, различными сортами растений.

Последовательность узнавания — см. Сайт узнавания.

Правило Чаргаффа — правило, гласящее, что в любой двунитчатой молекуле ДНК число адениновых оснований всегда равно числу тиминовых (А = Т), а число гуаниновых — числу цитозиновых (Г = Ц) оснований. Согласно П. Ч. количество пиримидинов (Т + Ц) равно сумме пуринов (А + Г). П. Ч. открыто в 1950 г. и лежит в основе классической модели ДНК Уотсона—Крика.

Праймер, затравка *(primer)* — короткий олигонуклеотид ДНК или РНК, комплементарный участку более длинной молекулы ДНК или РНК. К его 3'-ОН-концу ДНК-полимераза (см.) может добавлять нуклеотиды в растущую цепь ДНК в 5'—3'-направлении. У прокариот РНК-полимераза (см.) катализирует синтез таких РНК-праймеров для репликации ДНК. П. также нужны для РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы, см), *In vitro* (см.) используются синтетические П. размером до 10 п. о. для реакции полимеризации ДНК с помощью ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы, П. нужны для синтеза кДНК, ДНК секвенирования по Сэнгеру (см.), полимеразной цепной реации, ПЦР (см.) и др.

Пренатальная стадия развития — стадия развития зародыша (плода) живородящих животных в период перед рождением. Этим термином обычно обозначают поздние стадии развития зародыша млекопитающих.

Принцип комплементарности — пространственная взаимодополняемость (взаимное соответствие) поверхностей взаимодействующих молекул или их частей, приводящая, как правило, к образованию вторичных (Ван-дер-Вальсовых, водородных, ионных) связей между ними. Уникальность и прочность комплементарных структур определяется высокой избирательностью, большой площадью взаимодействия на уровне атомных группировок или зарядов по принципу «ключ - замок» (комплексы антиген – антитело и фермент – субстрат, четвертичная структура белков, вторичная и третичная структура нуклеиновых кислот). Наиб. ярко К. проявилась в структуре двуспиральных ДНК и РНК, где две полинуклеотидные цепи образуют в результате комплементарного взаимодействия пар пуриновых и пиримидиновых оснований (А-Т, Г-Ц) двуспиральную молекулу. Уникальная вторичная и третичная структура одноцепочечных полинуклеотидов (тРНК, рРНК) также определяется комплементарным спариванием оснований с образованием «петель» и «шпилек» вдоль по цепи. К. лежит в основе мн. явлений биол. специфичности, связанных с «узнаванием» на молекулярном уровне.

ПЦР (*PCR*) — см. Полимеразная ценная реакция.

ПЦР-амплификации — см. полимеразная ценная реакция (ПЦР), амплификация генов.

ПЦР технологии — различные методы размножения (амплификация) ДНК с помощью ПЦР.

Р

Радиоактивно меченный ДНКовый зонд — см. ДНКовый зонд.

Разделение рестрикционных фрагментов ДНК — см. Электрофорез в агарозном геле.

Распознаваемые участки — см. Сайты распознавания.

Репликация — процесс точного самовоспроизведения молекул нуклеиновых кислот, сопровождающийся передачей точных копий генетической информации в ряду поколений. Термин Р. в основном используется для определения процесса синтеза новой нити ДНК на матричной нити ДНК с целью точного копирования информации, содержащейся в геноме. Р. ДНК является полуконсервативной. Основные стадии этого процесса включают разделение нитей ДНК с образованием репликативной вилки, связывание ДНК-полимеразы и добавление комплементарных нуклеотидов начиная с 3'-конца. Нить, непрерывно реплицирующаяся (ведущая нить, лидерная нить), должна отделяться от др. (запаздывающей) нити, которая реплицируется прерывисто, короткими кусками (фрагменты Оказаки). После синтеза фрагменты Оказаки лигируются (с участием ДНК-лигазы), образуя целую запаздывающую нить.

Репортерный ген *(reporter gene)* — ген, хорошо изученный генетически и биохимически, который легко может быть сшит с регуляторной областью др. генов. Его активность в норме не обнаруживается в организме, в который этот ген переносится. Активность большинства Р. г. можно легко протестировать достаточно простыми методами (напр., определением ферментативной активности белкового продукта для галактозидазы, *β*-глюкуронидазы, хлорамфениколацетилтрансферазы, люциферазы, неомицин фосфотрансферазы, нопалинсинтазы и др.).

Рестриктазы — ферменты рестрикции, разрезающие ДНК по определенным нуклеотидным последовательностям, называемым сайтами рестрикции (см.). Р. могут кодироваться не только геномом бактерий, но также плазмидами и бактериофагами. Являются одним из главных инструментов генной инженерии, широко используются для получения рекомбинантных ДНК(см.). Синоним – рестрикционные эндонуклеазы.

Рестрикционные карты — диаграмма расположения на молекуле ДНК сайтов узнавания (см.) рестриктазами.

Самыми полными являются Р. к., построенные для небольших молекул ДНК (напр., хромосом прокариот). Первую полную физическую карту расположения участков 14 рестриктаз составил Д. Натанс для ДНК вируса sv-40.

Реципиентный организм, реципиент — 1. Любая клетка или организм, получающий: а) новую генетическую информацию в форме чужеродной ДНК или РНК; б) к.-л. биологический материал от др. организма-донора. 2. Клетка, принимающая генетический материал при трансдукции и конъюгации.

Ровные (тупые) концы — термин, относящийся к двухцепочечным фрагментам ДНК у которых ни одна нить на концевых участках не выступает за другую в отличие от липких концов (см.). Р.к. образуются в результате действия рестриктаз (рестрикционных эндонуклеаз) *Alu I, Ecor V, Hpa I, Nac I, Pvu II, Sma I* и др., а также путем удаления однонитчатых концов с помощью S1-нуклеазы или достройки их с помощью ДНК-полимеразы I.

Рибонуклеиновая кислота (РНК) — чаще всего однонитчатый полинуклеотид, характеризующийся наличием в нем сахара рибозы и урацила (вместо дезоксирибозы и тимина в ДНК). Обеспечивает передачу генетической информации (информационная иРНК и транспортная тРНК), служит в качестве структурного каркаса для рибосом (рибосомная рРНК) и выполняет ферментативные функции (рибозимы). Около 90% всей клеточной РНК составляет рРНК, около 8% составляет тРНК, а на долю иРНК приходится менее 2%. У эукариот молекулы РНК, как правило, транскрибируются в виде больших молекул (предшественников про-РНК), а затем путем сплайсинга и др. посттранскрипционных модификаций преобразуются в активные (зрелые) формы, имеющие меньшие (иногда существенно) размеры. У про- и эукариот функции РНК сильно различаются. У многих вирусов вся генетическая информация вместо ДНК содержится в одно- и двунитчатых РНК.

Рибосома — органоид клетки, с помощью которого осуществляется биосинтез белка. Р. представляет собой асимметричную рибонуклеопротеидную частицу диаметром 10—20 μm, которая состоит из двух субъединиц и обладающая каталитической функцией, ответственной за образование пептидных связей, т. е. за полимеризацию аминокислотных остатков в полипептидную цепь белка. При связывании Р. с информационной РНК начинается синтез полипептидов. Малая субъединица содержит единственную цепь рРНК (16*S* — у прокариот, хлоропластов и растений, 18*S* рРНК — у животных), ассоциированную с рибосомным белком (5-белки), которая связывается с иРНК. Крупная субъединица является комплексом единственной большой цепи рРНК (23*S* рРНК — у прокариот, 25*S* — у растений и митохондрий, 28*S* — у животных), одной или двух малых рРНК (5*S*— у прокариот, 5*S* и 5,8*S*— у эукариот) и рибосомных *L*-белков. Этот комплекс несет сайт для присоединения 2—3 молекул транспортной РНК.

С

Сайт клонирования — место (сайт) расщепления ДНК определенной рестриктазой в векторе клонирования, которое локализовано в пределах одного из генов устойчивости. Это позволяет обнаруживать инсерцированную чужеродную ДНК по исчезновению устойчивости к антибиотику на селективной среде в процессе клонирования (см.).

Сайт рестрикции — последовательность пар оснований в молекуле ДНК, в месте расположения которой определенная рестрикционная нуклеаза разрезает (расщепляет) ее.

Сайт узнавания — специфическая последовательность ДНК, с которой связываются рестрикционные эндонуклеазы, а также начинается расщепление молекулы ДНК данным ферментом. Для каждой рестриктазы имеется собственная специфическая последовательность узнавания. Обычно С. у. представлен коротким палиндромом.

***Cos*-сайты** *(cos-sites)* — однонитчатые, комплементарные участки на обоих концах ДНК фага лямбда (см. Липкие концы), состоящие из 12 нуклеотидов. Обеспечивают фагу образование кольцевых структур путем соединения водородными связями комплементарных концов и упаковку ДНК в фаговые частицы. С. *cos* используются для конструирования космид (см.).

Самостоятельная репликация — способность ряда внехромосомных генетических элементов (плазмид) к автономной репликации.

Саузерн-блот анализ — анализ молекул ДНК и их фрагментов при помощи метода блот-гибридизации по Саузерну.

Саузерн-блот гибридизация — метод, позволяющий идентифицировать конкретные гены и другие рестрикционные фрагменты ДНК после их электрофоретического разделения. Суть метода заключается в том, что сначала фрагменты ДНК, разделенные в агарозном геле, денатурируются до одноцепочечных молекул, а затем весь электрофоретический спектр ДНК отпечатывается (blotting) за счет капиллярных сил на приложенной к гелю нитроцеллюлозной мембране (пленке), после чего фиксируется при помощи высокой температуры. Далее мембрана помещается в гибридизационный буфер, содержащий специальный радиоактивно меченный ДНКовый зонд – короткую специфическую последовательность ДНК. Зонд способен гибридизоваться с определенным комплементарным фрагментом ДНК и свяжется только с одной или несколькими конкретными фракциями из всего электрофоретического спектра полученных рестрикционных фрагментов ДНК. На последнем этапе к нитроцеллюлозной мембране, содержащей весь спектр полученных фрагментов ДНК, включая фракции гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом, прикладывают рентгеновскую пленку. На пленке (авторадиограмме) после экспозиции выявляются засвеченные места, соответствующие расположению меченых фракций ДНК. Метод разработан Э. Саузерном и Р. Дейвисом в 1975 г.

Светящиеся фракции ДНК — двунитчатые фракции ДНК в агарозном или полиакриламидном геле, окрашенные красителем этидий бромидом, в комплексе с которым приобретают малиновую окраску при УФ освещении.

Сиквенирование ДНК (*DNA sequencing)* — метод определения последовательности оснований в молекуле ДНК. Существует несколько методов секвенирования: автоматическое, химическое, прямое, секвенирование по Максаму-Гил-берту, Сэнгеру и др.

Сиквенирование ДНК по Максаму-Гилберту, химический метод (*Maxam-Gilbert sequencing or chemical s.)* — один из наиболее распространенных методов определения первичной последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, Вначале ДНК режется на фрагменты размером 0,6—2,0 кб, концы фрагментов метятся радиоактивной или нерадиоактивной меткой и плавятся для получения однонитчатых молекул. Радиоактивное мечение может осуществляться изотопами серы ^{35}S или фосфора ^{32}P, нерадиоактивное мечение — с помощью биотиновой или флуоресцентной метки. После мечения образец ДНК разделяется на 4 части, каждую из которых обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно из четырех оснований ДНК. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений. Когда эти повреждённые молекулы обрабатывают пиперидином, в ДНК образуется разрыв в том месте, где находилось разрушенное основание. В результате получается набор 5'-меченых фрагментов, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца молекулы. Фрагменты, полученные в результате 4 типов реакции, подвергаются электрофорезу (см.) в полиакриламидном геле, и затем полосы выявляются соответствующим методом в зависимости от способа мечения. На основе результатов электрофореза определяются нуклеотиды и их последовательность в исходной ДНК.

Сиквенирование ДНК по Сэнгеру, ферментативный метод (*Senger sequencing or enzymatic method s.)* — техника сиквенирования (см.) однонитчатой ДНК. В основе метода — присоединение к однонитчатой ДНК-матрицы сиквенирующего праймера (см.) (обычно синтетических олигонуклеотидов). Реакционная смесь переносится в 4 пробирки, куда добавляются все 4 дезоксинуклеозидтрифосфата, один из которых мечен по ^{32}P. Каждая пробирка содержит также различные дидезоксинуклеозидтрифосфаты (ддАТФ, ддЦТФ, ддГТФ и ддТТФ). Для синтеза комплементарной цепи к однонитчатой последовательности-матрицы в пробирки добавляется фермент ДНК-полимераза(см.). В результате происходит удлинение праймера в соответствии с матричной последовательностью. Когда в растущую цепь вместо соответствующего дНТФ в матрице включается ддНТФ, 3'-конец растущей цепи теряет гидроксильную группу и не может дальше удлиняться: цепь терминируется. В итоге каждая реакционная смесь получит набор радиоактивно меченных фрагментов ДНК с общим 5'-концом (праймер), но с разными 3'-концами. После окончания реакции ДНК денатурируется, затем подвергается электрофорезу в полиакриламидном геле (см. Секвенирующий гель) и с помощью радиоавтографии (см.) выявляются радиоактивные полосы. Последовательность нуклеотидов в исходной ДНК-матрице может затем прочитываться прямо с радиоавтограммы.

Скрининг — поиск в генной библиотеке клонов конкретной колонии, содержащей нужный фрагмент чужеродной ДНК.

Создание рекомбинантных ДНК — конструирование новых последовательностей ДНК, образованных *in vitro* путем сшивания двух или более негомологичных молекул ДНК. Первая рекомбинантная ДНК была создана (сконструирована) в 1972 г. П. Бергом и включала в себя фрагменты фага λ, *E. coli* и вируса обезьян *sv40* (см. Первая рекомбинантная (гибридная) молекула ДНК).

Стоп-кодон, нонсенс-к., терминатор — тринуклеотид в информационной РНК, сигнализирующий об окончании синтеза полипептида и освобождении полной полилептидной цепи от рибосомы (см.). Существует три различных типа данных С.-к.: УАГ (амбер), УГА (опал) и УАА (охра). Ни один из них не соответствует антикодону тРНК.

Sma I — одна из рестрикционных эндонуклеаз, или рестриктаз (см.), которая в двухцепочечной ДНК узнает последовательность из шести нуклеотидов ЦЦЦГГГ и разрезает ее между Ц и Г, образуя ровные (тупые) концы (см.).

Т

***Tag*-полимераза, *Tag*-ДНК-полимераза** (*Tag polymerase or Tag DNA p*) — фермент из термофильной эубактерии *Thermus aquaticus,* осуществляющий полимеризацию дезоксинуклеотидов. Фермент исключительно термостабилен (оптимум температуры 70-75 °С) и обеспечивает выборочную амплификацию (см.) любой клонированной ДНК до 10 млн. раз с высокой точностью методом т. н. полимеразной цепной реакции (см. ПЦР). Может использоваться для мечения фрагментов ДНК с помощью радиоактивных нуклеотидов, а также биотина или дигоксигенина.

Thermus aquaticus — термофильная эубактерия, обитающая в горячих источниках. Из нее был выделен фермент *Tag*-полимераза, который отличается устойчивостью к высокой температуре и способен работать с большой скоростью при температуре 70°С в ходе третьей стадии цикла ПЦР.

Таблица (словарь) генетических кодов, с. кодонов (*genetic code table (dictionary))* — таблица, включающая генетические значения отдельных кодонов (см.), или триплетов (см.), соответственно продуктам их функционирования. Содержит 64 кодона, из которых 61 смысловой т.е. каждый из них кодирует конкретную аминокислоту и 3 стоп-кодона (см.), или нонсенс-кодона, которые сигнализируют об окончании синтеза полипептида и освобождении полипептидной цепи от рибосомы (см.).

Тандемный повтор (*tandem repeat)* — организация двух или более расположенных рядом одинаковых последовательностей в пределах двунитчатой молекулы ДНК. Возможны два типа их ориентации — прямые повторы (голова к хвосту 5' – *ЦГААТЦ ГТТАТЦГ ГТТАТЦГ АЦГТТ* - 3') или непрямые повторы (голова к голове 5' - *ЦГААТЦ ЦТТАТЦГ ГЦТАТТГ АЦЦГТ* - 3'). Т. п. в области кодирующих генов могут вести к тандемно повторяющимся аминокислотным последовательностям.

Транскрипция — синтез молекул РНК на ДНК- или РНК-матрице, осуществляемый ДНК-зависимой или РНК-зависимой РНК-полимеразой. Т. — первый этап реализации генетической информации, записанной в ДНК, осуществляемый с участием фермента РНК-полимераза у прокариот и не менее 3 типов РНК-полимераз, транскрибирующих гены у эукариот.

Трансляция — считывание (декодирование) информационной РНК, рибосомами (см.) и транслирование этого кода в белок. Процесс Т. начинается с того, что 5'-лидирующее окончание иРНК связывается с рибосомой. Затем иРНК движется через рибосому и служит матрицей для встраивания аминокислот в белок. Как только 5'-лидирующий конец иРНК пройдет через первую рибосому, он может связаться с др. рибосомой, на которой вновь будет происходить повторное декодирование и синтез белка (трансляционная амплификация). Как только 3'-поли(*A*)хвост иРНК выйдет из первой рибосомы, вновь синтезированный белок отделяется, а рибосома может начать следующий цикл Т. Группировка аминокислот в белок, осуществляемая с помощью тРНК, начинается с аминоконца (*N*-конец) и заканчивается карбоксильным концом (*C*-конец). На рибосоме имеются два сайта связывания для тРНК: *P*- и *A*-сайты. *P*-сайт (пептидил тРНК-сайт) связывает тРНК, которая прикрепляется к концу исходной полипептидной цепи, а *A*-сайт (аминоацил тРНК-сайт) связывает вновь подходящую тРНК, которая несет следующую аминокислоту. Связывание каждой тРНК с этим сайтом обеспечивает спаривание оснований ее антикодона (см.) с соответствующим кодоном иРНК, движущейся через рибосому. Изменение скорости трансляции иРНК регулирует экспрессию генов.

Транспортная РНК (т-РНК) — низкомолекулярная РНК (содержит 75-90 нуклеотидов), обеспечивающая перенос аминокислот к рибосомам (см.) для включения их в белки. т-РНК имеют специфическую вторичную структуру в виде “листа клевера”, антикодон расположен в антикодоновой петле, а на 5'-конце всегда находится гуанин (G). Аминокислоты присоединяются к 3'-концу последовательности ССА в тРНК в результате реакции аминоацилирования. Модель “листа клевера” для вторичной структуры тРНК предложена Р. Холли с сотр. в 1965 г.

Трансформация — 1. Перенос генетической информации в бактериальные клетки при помощи изолированной ДНК с участием или без участия плазмид (см.), но всегда без участия вирусов. 2. Направленная модификация генома клетки с помощью очищенной или рекомбинантной ДНК из клетки др. генотипа, которая интегрирует (поглощается) в геном модифицируемой клетки. 3. Изменение морфологии клетки или др. ее характеристик (напр., неопластического роста и др.), происходящее после интеграции нуклеиновой кислоты от онкогенных вирусов в клеточный геном, после воздействия химическими канцерогенами или спонтанно (онкогенная Т.). 4. Изменение наследственных свойств клетки в результате проникновения в нее чужеродной ДНК. Впервые обнаружена в 1928 г. у пневмококков Ф. Гриффитом.

Трансгенные организмы — организмы, в наследственные структуры которых искусственно введён хотя бы один активно функционирующий ген от другого организма.

Трансформированные организмы — организмы с измененными наследственными свойствами в результате проникновения в них чужеродной ДНК.

Триплет — комбинация из трех последовательно расположенных нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты (см. Кодон).

У

Участок расщепления — см. Сайт рестрикции.

Участок узнавания — см. Сайт узнавания.

Ф

Фаги — см. Бактериофаги.

Ферменты рестрикции — см. Рестриктазы.

Фетальные клетки — эмбриональные зародышевые клетки, отслаивающиеся от плода и находящиеся в амниотической жидкости в виде суспензии. Эти клетки путем амниоцетеза (см.) можно извлечь из амниотической жидкости для культивирования и проведения их хромосомного, биохимического и генетического анализа.

Фетус (от лат. *fetus*) — зародыш.

Фильтр из нитротцеллюлозной плёнки — см. Нитроцеллюлозная (пленка) мембрана.

Фингерпринт ДНК (*DNA fingerprint)* — высокоспецифичные гибридизационные полосы на электрофореграммах (фингерпринт), образующиеся как результат полиморфизма длины рестрикционных фрагментов геномной ДНК (ПДРФ, см.). Причиной такого полиморфизма могут быть мутации в пределах сайта рестрикции (см.), повторы ДНК (мини- и микросателлиты) и др.

Фракции гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом — часть молекул ДНК, которые после электрофоретического фракционирования комплементарно связались с радиактивным зондом в процессе Саузерн-блот гибридизации.

Х

X-Gal — специальный субстрат, который расщепляется ферментом *β*-галактозидазой (продукт гена ***lac-Z***) (см.) с образованием нерастворимого осадка сине-голубого цвета. Широко используется в генной инженерии для детекции (выявления) бактериальных колоний содержащих плазмиды со встроенной чужеродной ДНК.

Химерные плазмиды — плазмиды содержащие вставку (фрагмент) чужеродной ДНК.

Хромосомная библиотека *(chromosome specific library)* — один из видов геномной библиотеки (см.), используемый *для* анализа геномов больших размеров, напр. человека. Х. б. создают клонированием (см.) фрагментов ДНК индивидуальных гомологичных хромосом.

Ч

Чужеродная ДНК — ДНК какого-либо организма по отношению к организму-реципиенту.

Э

Экзоны (*exons)* — последовательности эукариотных генов, которые, как правило, сохраняются при процессинге (см.) про-иРНК и образуют зрелую матричную, или информационную РНК. Э., как правило, чередуются с нитронами (см.). Э. кодируют три принципиально различные функции: а) функцию лидера: первый Э. содержит сигналы для инициации транскрипции (см.) и последовательности с функцией, управляющей присоединением матрицы к рибосомам (см.), и не транслируется (см. Трансляция) в белок; б) функции матрицы (информации); Э. содержат информацию, которая обеспечивает образование белка из отдельных аминокислот; в) терминирующие функции (см. Терминация): последний Э. включает последовательности, которые в зрелой иРНК являются сигналом для окончания трансляции, а также гомополимерное адениловое окончание (хвост) — поли(А) иРНК. Термин экзон предложен У. Гилбертом в 1978 г.

Экспрессия гена — реализация генетической информации, закодированной в ДНК, путем ее транскрипции (см.) и трансляции (см.) иРНК.

Электрофорез в агарозном геле — Метод разделения заряженных биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот и т. д.) в электрическом поле, базирующийся на их различии по электрическому заряду, форме и размеру. Молекулы мигрируют через инертный агарозный гель под действием электрического поля. Э. открыт Ф. Ф. Рейсом в 1807 г. В биологии Э. начал использовать А. Тизелиус, сконструировавший первый прибор для электрофоретического разделения белков в 30-е гг. XX в.

Электрофоретическая камера — часть прибора для проведения электрофореза. Различают вертикальную и горизонтальную Э.к.

Элонгация (*elongation)* — удлинение нуклеотидной цепи путем добавления новых нуклеотидов (ДНК- или РНК-синтез) или аминокислотной цепи путем присоединения аминокислот.

Этидиум бромид (3,8-диамино-6-этил-5-фенилфенантридиум бромид) — флуоресцирующий краситель (канцероген), который обладает способностью интеркалировать между парами оснований в двунитчатой ДНК и РНК. Комплекс нуклеиновой кислоты с Э. б. флуоресцирует под УФ светом. Используется для визуального обнаружения двунитчатых молекул ДНК в агарозном и полиакриламидном геле (см.) при флуоресцентном излучении в 590 нм. Э. б. позволяет производить количественную оценку содержания нуклеиновых кислот в препарате.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Болезнь Тея-Сакса (БТС) (*Tay-Sachs desease*)— аутосомно-рецессивное заболевание, которое характеризуется недостаточностью лизосомального фермента гексозаминидазы-А. В результате чего в нейронах накапливается ганглиозид G_{M2} (в 100-300 раз выше нормы). Симптомы заболевания начинают проявляться в возрасте 5 месяцев. Для больных характерны макроцефалия и кукольное лицо, в 90% случаев на глазном дне в области желтого пятна сетчатки обнаруживается вишнево-красное пятно. В терминальной стадии болезни, которая развивается к 3-4 годам, наступает полная обездвиженность, глухота, слепота, трофические нарушения, декортикация и наступает смерть. Ген локализован в 15 хромосоме в сегменте 15q13.2. БТС наиболее часто встречается в популяциях евреев-ашкенази (с частотой 1:3600 человек).

Болезнь Хантингтона (БХ) (*Hantington disease*)— аутосомно-доминантное заболевание, при котором происходит нейродегенеративное расстройство. Болезнь выводит из строя нервные клетки головного мозга, и по мере развития больные начинают терять контроль над своими психическими и физическими действиями. БХ может проявиться в любом возрасте, но обычно ее начало наблюдается в период от 30 до 50 лет. Она начинает проявляться со слабых симптомов потери памяти, неуклюжести, депрессии. По мере прогрессирования БХ физическое и психическое состояние ухудшается и в конечном итоге через 15 лет после первых симптомов наступает летальный исход. Ген, ответственный за БХ, называется хангтингтин (Ht), и расположен в дистальной части короткого плеча хромосомы 4 в сегменте 4p16.2, имеет величину 210 кб и кодирует белок (хангтинтин) важной функции. Ген экспрессируется во многих клетках ЦНС, но функция кодируемого им белка не установлена, хотя предполагают его возможную роль в апоптозе. Ген содержит тринуклеотидные повторяющиеся последовательности ЦАГ вблизи 5'-конца. У нормальных индивидуумов частота ЦАГ повторов составляет от 0 до 26. Однако у больных БХ частота ЦАГ повторов увеличивается от 40 до 120. БХ – встречается с частотой 1:10 000 человек.

Гемофилия А (*hemophilia)* — сцепленное с полом рецессивное заболевание, характеризующееся несвертываемостью крови из-за дефицита белкового фактора коагуляции VIII (ФVIII), который состоит из трех доменов (А, В, С). Ген ФVIII величиной 186 кб находится в дистальной части длинного плеча Х-хромосомы в сегменте Xq28 и состоит из 26 экзонов. В гене имеется большой экзон 14 (3,1 кб), который кодирует домен В, и большой интрон 22 (32 кб). У больных Г. А идентифицировано более 600 различных мутаций в гене ФVIII. Около 75% из них являются точковыми, причём миссенс мутации, слабо изменяющие белок ФVIII, вызывают мягкие формы Г.А тогда как нонсенс и сдвиг рамки считывания вызывают серьезные формы Г.А. Даже нонсенс мутация ЦГА, приводящая к появлению стоп-кодона ТГА в позиции 2307, вызывает серьёзную форму Г. А, хотя при этом белок ФVIII, в норме состоящий из 2332 аминокислот, утрачивает только последние 26 аминокислот. У 20% больных найдена рекуррентная мутация, возникающая за счет рекомбинации последовательности ДНК в интроне 22 с гомологичной последовательностью в другом участке Х-хромосомы, в результате чего ген ФVIII разрывается на две части, разделенные последовательностью в 1000 кб. Эта мутация полностью дезактивирует ген ФVIII и вызывает наиболее серьёзную форму Г.А.

Кроме Г.А, получившей название царской болезни (т.к. была обнаружена у королевы Виктории и многочисленных её родственников), существует заболевание Г.В (болезнь Христа), имеющее сходные симптомы, но вызванное дефектами гена фактора коагуляции IX, который находится в другом месте Х-хромосомы. Г.А встречается у мужчин с частотой 1:5000, а Г.В с частотой 1:40000.

Кисто-фиброз (КФ) (муковисцидоз) (*cystic fibrosis*) — аутосомно-рецес-сивное наследственное заболевание. Выражается в патологии экзокринных желез (бронхиальных, потовых, слезных, слюнных, ушных), а также поджелудочной железы и печени, проявляющаяся в выделении секрета повышенной вязкости и сопровождающаяся вторичными изменениями в легких, поджелудочной железе, кишечнике. Заболевание связано с мутацией гена, кодирующего регуляторный белок трансмембранной проводимости для ионов хлора (CFTR - кисто-фиброзный трансмембранный регулятор), который состоит из 1480 аминокислот, включает несколько различных функциональных доменов и является также транспортным белком АТФ-азы. Ген Cftr величиной 250кб находится в длинном плече хромосомы 7 в сегменте 7q31.3. Он состоит из 27 экзонов и кодирует транскрипт м-РНК величиной 6,5 кб. Известно более 800 мутаций в гене Cftr. Наиболее частая мутация (66%), вызывающая это заболевание, является делецией кодона фенилаланина в положении 508 (ΔF508). КФ встречается с частотой 1:2500 наворожденных.

Миотоническая дистрофия (МД) (*miotonic dystrophy*) — аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся прогрессирующей дегенерацией мышц на взрослых стадиях. Гене MD находится в хромосоме 19 в сегменте 19q1. Заболевание МД вызвано мутацией в гене MD, связанной с увеличением числа тринуклеотидных повторов ЦТГ до 50-200 копий в отличие от нормальных аллелей, содержащих 5-30 копий.

Оптическая нейропатия Лебера (леберовская атрофия зрительного нерва) — заболевание, при котором у человека нарушается центральное зрение с сохранением периферического. Относится к заболеваниям сложного типа наследования, поскольку родословные невозможно объяснить ни доминантным, ни рецессивным характером наследования. Относительно хорошо согласуется только с известным фактом материнского наследования митохондрий, особенно если дополнительно предположить неполную пенетрантность. В качестве причины заболевания одно время упоминали дефект митохондриального фермента тиосульфат-сульфотрансферазы.

Пигментная ретинопатия (ПР) – заболевание, связанное с потерей периферической области зрения или даже полной слепотой при сумеречном свете и характеризующееся желто-восковой окраской зрачка. Наиболее часто встречается аутосомно-доминантная форма этого заболевания, вызываемая более чем 100 видами мутаций в структурном гене трансмембранного белка родопсина, который является фоторецептором дневного света в клетках-палочках сетчатки глаза. Одной из наиболее частых мутаций является замена цитозина на аденин в кодоне 23 гена родопсина. В результате кодон ЦЦЦ для пролина заменяется на ЦАЦ для гистидина. Ген белка родопсина лежит в длинном плече хромосомы 3 в сегменте 3q21.4. Родопсиновый полипептид состоит из 348 аминокислот и включает 7 доменов, содержащих участки связывания для функционально важных молекул. 7 домен связан со светочувствительной молекулой – хромофором. Данное заболевания встречается с частотой 1:3500.

Серповидно-клеточная анемия (СКА) *(sickle-cell anemia)*— аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутацией одного нуклеотида, что вызывает замену триплета ГАГ на ГТГ в кодоне 6 β-глобинового гена. В результате происходит замена в β-глобиновой цепи глутаминовой кислоты на валин. Данное аминокислотное замещение сильно влияет на растворимость и кристаллизацию гемоглобина. Мутантный HbS полимеризуется с образованием пучков и волокон. Аномальные кристаллы HbS нарушают структуру мембраны эритроцитов и обусловливают их серповидную форму. Серповидные клетки увеличивают вязкость крови и мешают её нормальной циркуляции в небольших кровеносных сосудах и капиллярах, что вызывает некроз отдельных органов и тканей. СКА сильно выражена только у гомозигот, так как у них полностью отсутствует нормальный HbA, в то время как у гетерозигот она проявляется только в условиях сильной гипоксии. Гетерозиготы HbA/HbS обладают повышенной устойчивостью к заболеванию малярией и вследствие этого частота гена HbS существенно повышена в районах распространения малярийных заболеваний (Средиземноморье, Восточная и Западная Африка), где оно встречается с частотой 1: 500. Ген, кодирующий β-глобиновый полипептид, находится в коротком плече хромосомы 11 в сегменте 11p15.5 и состоит из трех экзонов. β-глобиновый полипептид состоит из 146 аминокислот, образующих 3 различных домена. Два домена, состоящие из аминокислот 1-30 и 105-146, формируют наружную поверхность молекулы, в то время как третий – внутреннюю.