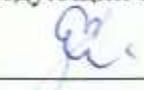


Учреждение образования «Гомельский государственный университет  
имени Франциска Скорины»

Факультет биологический  
Кафедра зоологии, физиологии и генетики

СОГЛАСОВАНО

Заведующий кафедрой

 Г.Г. Гончаренко

01.03 2022

СОГЛАСОВАНО

Декан факультета

  
В.С. Аверин

01.03 2022

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС ПО УЧЕБНОЙ  
ДИСЦИПЛИНЕ**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА**

для специальности

**1-31 80 01 Биология**

Рассмотрено и утверждено на заседании  
кафедры зоологии, физиологии и генетики

1 февраля 2022 г., Протокол № 7

Составители:

член-корр. НАН Б, д.б.н., профессор Гончаренко Г.Г.

к.б.н., доцент Крук А.В.

ст. преподаватель Курак Е.М.

ст. преподаватель Зятков С.А.

Рассмотрено и утверждено

На заседании научно-методического совета

УО «Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины»

2 марта 2022 г., Протокол № 3

**02 Содержание учебно-методического комплекса по дисциплине  
«Молекулярная генетика»  
для специальности  
1-31 80 01 – «Биология»**

01 Титульный лист

02 Содержание

03 Пояснительная записка

1 Теоретический раздел

1.1 Перечень теоретического материала

2 Практический раздел

2.1 Задания к лабораторным работам

3 Контроль знаний

3.1 Перечень вопросов к зачету

3.2 Критерии оценок по дисциплине

3.3 Тестовые задания по дисциплине

4 Вспомогательный раздел

4.1 Учебная программа дисциплины

4.2 Глоссарий

4.3 Перечень рекомендуемой литературы

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

### 03 ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Учебно-методический комплекс дисциплины «Молекулярная генетика» составлен на основе учебной программы ведущего учреждения образования (Белорусского государственного университета) «Молекулярная генетика» для специальности 1-31 01 01 Биология, утв. 30.06.2020, регистрационный № УД-9424/уч. и учебных планов ГГУ имени Ф. Скорины направления специальности 1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность), регистрационные номера G 31-01-16/уп от 17.06.2019, G 31-01-19/зф от 09.05.2019.

Актуальность введения данной дисциплины обусловлена тем, что молекулярная генетика является наиболее стремительно развивающейся областью биологии, открывающей новые горизонты знания, что дает исключительные возможности для совершенствования и создания принципиально новых методов и технологий. Достижения молекулярной генетики позволили осуществить настоящий прорыв в молекулярной и клеточной биотехнологии: перевернули представление человека о сущности процессов реализации генетической информации и передачи наследственного материала дочерним клеткам или потомкам и вооружили его инструментами для направленного изменения генома и управления его функционированием.

Цель учебной дисциплины – сформировать у студентов систему знаний о молекулярных механизмах генетических процессов, протекающих в клетке.

Задачи учебной дисциплины: помочь студентам сформировать четкие современные представления о структуре, функциях и методах изучения нуклеиновых кислот, молекулярных механизмах матричных процессов, протекающих в клетке.

Место учебной дисциплины в системе подготовки специалиста с высшим образованием.

Учебная дисциплина относится к циклу дисциплин специализации компонента учреждения высшего образования.

Программа составлена с учетом межпредметных связей и программ по учебным дисциплинам «Генетика», «Биохимия», «Микробиология», «Молекулярная биология».

В результате изучения дисциплины студенты должны:

знать:

современные представления о строении генов прокариот и эукариот, а также основные методы их исследования;

молекулярные механизмы матричных процессов, протекающих в клетке и их регуляцию.

уметь:

применять знание молекулярной генетики при изучении других биологических дисциплин.

использовать полученные знания в практической работе и экспериментальных исследованиях.

владеть:

основными молекулярно-генетическими методами исследования генов про- и эукариот.

Освоение учебной дисциплины «Молекулярная генетика» должно обеспечить формирование следующих академических, социально-личностных и профессиональных компетенций:

академические компетенции:

АК-1. Уметь применять базовые научно-теоретические знания для решения теоретических и практических задач.

АК-2. Владеть системным и сравнительным анализом.

АК-3. Владеть исследовательскими навыками.

АК-4. Уметь работать самостоятельно.

АК-5. Быть способным вырабатывать новые идеи (обладать креативностью).

АК-6. Владеть междисциплинарным подходом при решении проблем.

АК-7. Иметь навыки, связанные с использованием технических устройств, управлением информацией и работой с компьютером.

АК-8. Обладать навыками устной и письменной коммуникации.

социально-личностные компетенции:

С ЛК-2. Быть способным к социальному взаимодействию.

С ЛК-3. Обладать способностью к межличностным коммуникациям.

С ЛК-4. Владеть навыками здоровьесбережения.

СЛК-5. Быть способным к критике и самокритике.

СЛК-6. Уметь работать в команде.

профессиональные компетенции:

ПК-1. Квалифицированно проводить научные исследования в области молекулярной генетики, проводить анализ результатов экспериментальных исследований, формулировать из полученных результатов корректные выводы.

ПК-7. Осуществлять поиск и анализ данных по изучаемой проблеме в научно-технических и других информационных источниках.

Теоретический раздел содержит лекционный материал, включающий в себя в соответствии с учебной программой 11 тем (22 часа), предназначенных для студентов дневной формы обучения и заочной формы обучения.

Практический раздел включает в себя в соответствии с учебным планом дисциплины 4 темы лабораторных занятий (12 часов), предназначенных для студентов дневной формы и заочной формы обучения. При проведении лабораторных занятий используются демонстрационные материалы, разнообразный раздаточный материал, таблицы и рисунки.

Раздел контроля знаний целесообразно проводить в форме текущего контроля знаний на лабораторных занятиях, коллоквиумов, тестового компьютерного контроля по темам и разделам курса. Для общей оценки усвоения студентами учебного материала рекомендуется введение рейтинговой системы.

Вспомогательный материал содержит необходимые элементы учебно-программной документации: учебную программу по дисциплине «Молекулярная генетика» с пояснительной запиской и содержанием учебного материала. Кроме этого, в данном разделе имеется дополнительный материал, который может быть использован при чтении лекций, проведении лабораторных занятий.

Электронный учебно-методический комплекс дисциплины «Молекулярная генетика» адресуется студентам первой степени высшего образования дневной и заочной форм обучения специальности 1-31 80 01 «Биология».

# 1 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

## *1.1 Перечень теоретического материала*

- 1 Введение
- 2 Структура и свойства нуклеиновых кислот
- 3 Методы исследования нуклеиновых кислот
- 4 Организация генома про - и эукариот
- 5 Репликация ДНК
- 6 Транскрипция
- 7 Процессинг и сплайсинг
- 8 Трансляция
- 9 Мутационный процесс
- 10 Репарация ДНК
- 11 Рекомбинация ДНК

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ



Гончаренко Г. Г., Курак Е.М.

# **МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА**

Гомель 2022

# ЛЕКЦИЯ 1

## ВВЕДЕНИЕ

1. Предмет, цели, задачи молекулярной генетики
2. История открытия нуклеиновых кислот и доказательство их генетической роли
3. Достижения молекулярной генетики

### 1. Предмет, цели, задачи молекулярной генетики

**Молекулярная генетика** – раздел генетики, изучающий закономерности и молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и передачи наследственных признаков.

Предметом дисциплины являются структурно-функциональная организация генетического аппарата клеток и механизм реализации наследственной информации.

Молекулярная генетика занимается изучением целого ряда проблем, стоящих перед современной биологией. К ним относятся:

1. Исследование тонкой структуры нуклеиновых кислот и генов.
2. Изучение процессов, в которых участвуют нуклеиновые кислоты: транскрипция, трансляция, репликация, репарация, рекомбинация.
3. Мобильные генетические элементы.
4. Генетика развития, нуклеиновые кислоты в оогенезе и онтогенезе.
5. Проблемы старения клетки и апоптоз.

**2. История открытия нуклеиновых кислот и доказательство их генетической роли** Открытие нуклеиновых кислот связано с именем молодого врача из города Базеля (Швейцария) Фридриха Мишера (рис. 1).

После окончания медицинского факультета Мишер был послан для работы над диссертацией в Тюбинген (Германия) где приступил к работе в биохимической лаборатории. Ему было поручено заняться изучением химического состава гноя. Для получения материала пришлось связаться с хирургическим отделением местной больницы, где собирались бинты, снятые с больных при перевязках. Мишер выделил из лейкоцитов новое вещество. Это вещество не распадалось при действии протеолитических ферментов и содержало большое количество



Рисунок 1 – Мишер Иоган Фридрих (1844-1895) швейцарский биохимик

фосфора. Новое вещество было подвергнуто элементарному анализу. В нем оказалось 14% азота и примерно 6% фосфора. Ввиду ядерного происхождения Мишер предложил для него название «нуклеин» (лат. «нуклеус» – ядро). В 1869 г. он вернулся в Базель. Здесь Мишер решил выделить нуклеин из ядер других клеток. Он изолировал из молок рейнского лосося очищенный нуклеин, который ему удалось разделить на составные части: белковоподобный компонент, обладающий щелочными свойствами, и остаток, не содержащий белка. Этот остаток содержал высокий процент фосфора. Белковоподобный компонент нуклеина исследователь назвал протамином.

Свободный от белка остаток нуклеина был назван в 1889 г. нуклеиновой кислотой. Это название оказалось удачным и сохранилось до настоящего времени. В ядрах молок рыб присутствовали, таким образом, и нуклеиновая кислота, и щелочной протамин. Мишер высказал предположение, что оба эти вещества находятся в ядрах в комплексе. Ботаник Захариас в 1881 г. экспериментально показал, что нуклеин действительно содержится в хромосомах. Эти опыты были поставлены на различных клетках как растительного, так и животного происхождения.

Исследованием химического состава нуклеина, полученного Мишером, занялся Альбрехт Коссель (рис. 2).

Коссель выделил из продуктов гидролиза нуклеиновых кислот ранее неизвестные химикам вещества — азотистые основания аденин и ксантин. Был выделен также уже известный гуанин. Его получали из гуано (экскрементов птиц). Затем Косселем и его учениками были выделены тимин и цитозин. Коссель был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине 10 декабря 1910 года за свои исследования клеточной биологии, химического состава клеточного ядра и за



Рисунок 2 – Альбрехт Коссель (1853-1927), немецкий биохимик

свою работу по выделению и описанию нуклеиновых кислот. Кроме идентификации некоторых продуктов гидролитического расщепления нуклеиновой кислоты, важная заслуга Косселя состоит в открытии белка со щелочными свойствами в ядрах клеток разных тканей. Ученый предложил для обнаруженного им белка название «гистон» (от «histos» — ткань, греч.).

Дальнейшее исследование состава и структуры нуклеиновых кислот проводилось в лаборатории уроженца России Петра Левина в США и в ряде других лабораторий. Первые работы Левина и

сотрудников были посвящены изучению состава и строения углеводного компонента нуклеиновой кислоты. После идентификации рибозы и дезоксирибозы нуклеиновые кислоты получили названия. РНК и ДНК.

В 1936 г. молодой советский ученый, ставший впоследствии академиком, А. Н. Белозерский впервые препаративно выделил ДНК в чистом виде из растительного материала – из ростков конского каштана.

В 1944 г. были опубликованы результаты опытов Эвери и сотрудников (США) по трансформации бактерий. Явление трансформации было открыто в 20-х годах нашего столетия микробиологом Гриффитсом (Англия). В 1928г. Гриффите обнаружил, что один штамм пневмококка, культивируемый в особых условиях *in vitro*, утратил способность к синтезу своего полисахарида и поэтому рос на твердой среде в виде так называемых складчатых колоний (R-формы), отличных от гладких, блестящих колоний клеток, имеющих капсулы (S-формы). При этом S-форма пневмококков была вирулентной, а R-форма не вызывала заболевания. Способность иметь капсулу – наследственно закрепленное свойство пневмококков. Гриффитс установил, что прибавление к бескапсульным формам бактерий экстракта из капсульных форм вызывало трансформацию: R-формы пневмококков превращались в S-формы. Гриффитсу удалось произвести трансформацию пневмококков и *in vivo*.

Он вводил мышам небольшое количество живых R-форм и большие дозы S-форм, убитых нагреванием (рис. 3).

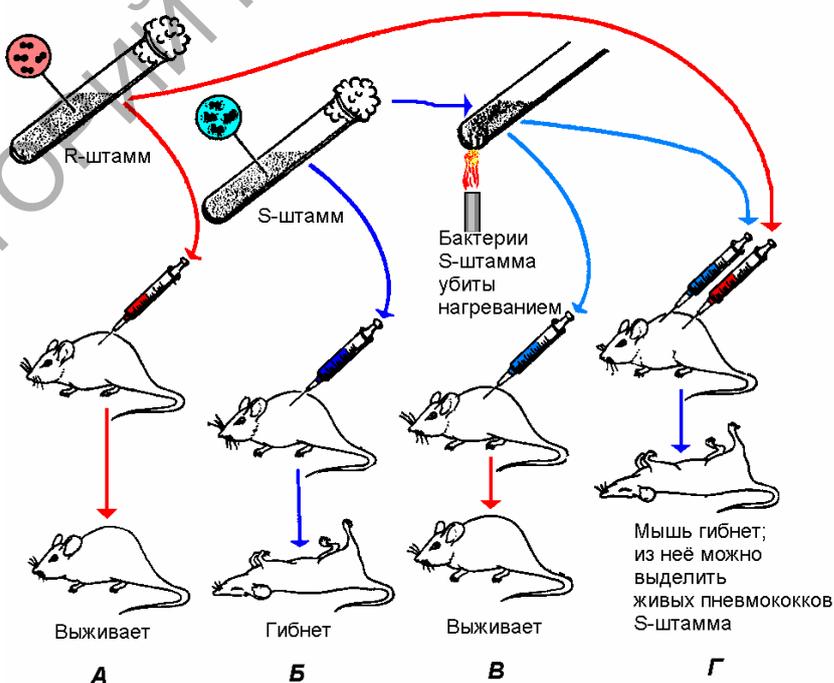


Рисунок 3 – Эксперимент фредерика Гриффитса, демонстрирующий явление трансформации.

В результате мыши погибали, причем из погибших животных удалось выделить жизнеспособные S-формы пневмококков. Таким образом, стало ясно, что от одного штамма бактерий к другому возможна передача наследственного начала, однако химическая природа его не была обнаружена.

Эвери и сотрудники выяснили химическую природу трансформирующего агента. Они разрушали суспензию пневмококков и удаляли из экстракта белки, капсульный полисахарид и РНК, однако трансформирующая активность экстракта сохранялась. Это вещество было идентифицировано Эвери по цветной реакции, как ДНК.

Новым доказательством прямой генетической роли ДНК явились опыты вирусологов Херши и Чейз (рис. 4).

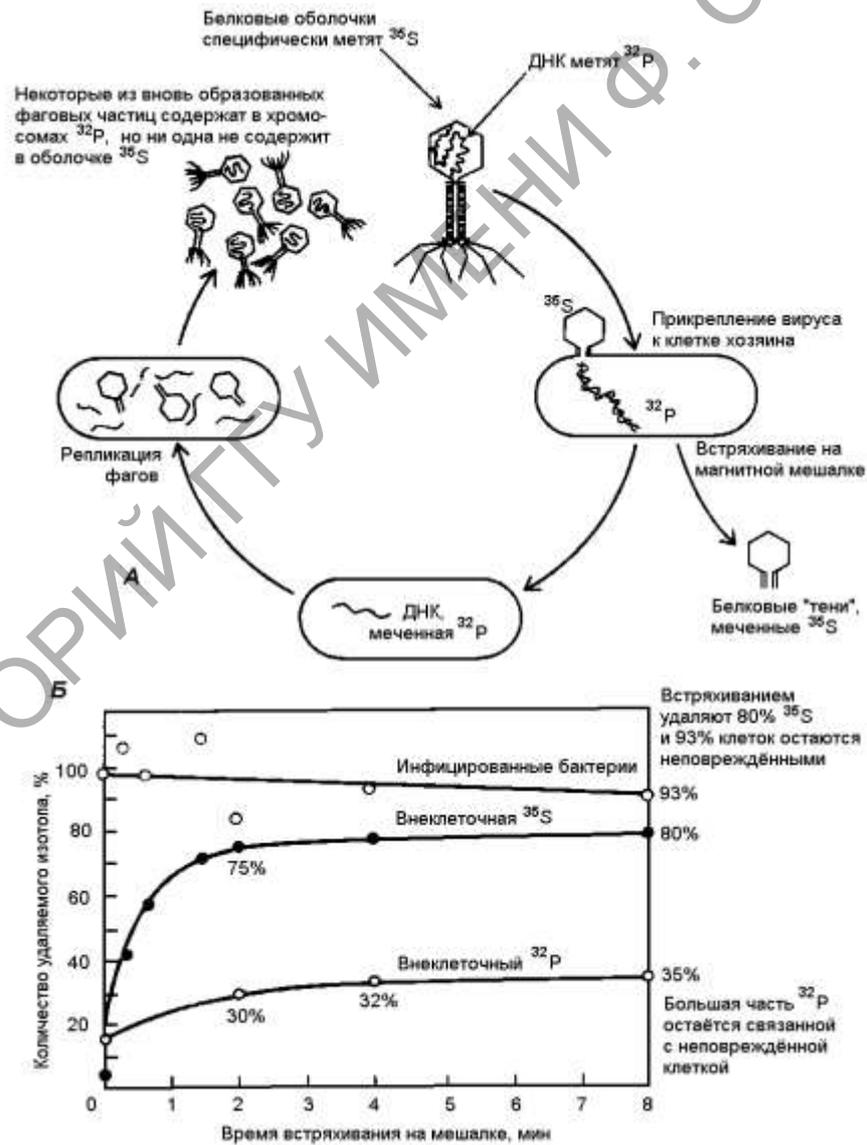


Рисунок 4 – Схема опыта Херши-Чейз, показавший, что компонентом, ответственным за образование потомства фага T2 в зараженной фагом клетке является ДНК фага.

При этом ДНК фага метилась Р, а белок фага – S. Используя такой фаг с двойной меткой, они показали, что при фаговом заражении клеток *E. coli* внутрь бактериальной клетки проникает в основном только фаговая ДНК и лишь ничтожное количество белка фага. Основная масса вирусного белка остается снаружи бактериальной клетки. Эта ДНК фага затем обеспечивает синтез себя самой, а также синтез белков фага внутри клетки-хозяина. Из полученных ДНК и белков вновь собираются характерные фаговые частицы.

В 1969 году Алфред Херши получил Нобелевскую премию (совместно с Максом Дельбрюком и Сальвадором Лурией) за открытия, касающиеся механизма репликации и генетической структуры вирусов.

В лаборатории биохимии Колумбийского университета в Нью-Йорке Чаргафф начал с идеи о том, что если различные виды ДНК проявляют различную биологическую активность, то тогда обязательно должны существовать различия и в химическом составе нуклеиновых кислот. Чаргафф принялся искать разницу в нуклеотидном составе и расположении нуклеотидов в препаратах ДНК, полученных из различных источников. Методы, позволяющие точно дать химическую характеристику ДНК, в то время отсутствовали. Такие методы были развиты Чаргаффом, и они дали удивительные результаты. Хотя разные ДНК и различались значительно по своему нуклеотидному составу, все они подчинялись определенным общим правилам. Поразительным оказалось то, что в каждом образце ДНК число молекул аденина было равно числу молекул тимина, а гуанина – молекул цитозина.

В 1953 г. молодые ученые Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик создали структурную модель молекулы ДНК, которая полностью соответствовала правилам Чаргаффа (рис. 5).



Рисунок 5 – Дж. Уотсон и Ф. Крик. 1953 г.

Ученые встретились впервые в 1951 г. в Кембридже (Англия). В то время Морис Уилкинс и Розалинд Фрэнклин получили в Лондоне рентгенограммы ДНК. При этом оказалось, что ДНК может давать два типа структур в зависимости от содержания воды в препарате. При значительной гидратации ДНК находится в так называемой В-форме, которая переходит в кристаллическую А-форму при потере воды. По характеру рентгенограммы В-формы ДНК Уотсон и Крик поняли, что исследуемая структура находится в спиральной конформации. Они знали также, что молекула ДНК представляет собой длинную линейную полимерную цепь, состоящую из мономеров-нуклеотидов. На основании рентгенограммы В-формы ДНК Уотсон и Крик предположили, что молекула ДНК состоит из двух линейных полинуклеотидных цепей с фосфодезоксирибозным остовом снаружи молекулы и азотистыми основаниями внутри ее.

### 3. Достижения молекулярной генетики

Основополагающие открытия и достижения молекулярной генетики:

1869 — Ф. Фишер (F. Miesher) впервые выделил ДНК из лейкоцитов и молок лосося.

1935 — А.Н. Белозерский выделил ДНК из растений.

1939 — В.А. Энгельгардт открыл АТФазную активность миозина.

1940 — У. Эстбюри (W. Astbury) получил первую рентгенограмму ДНК.

1944 — О.Т. Эвери (O.T. Avery) установил, что ДНК (а не белок, как полагали ранее) является носителем генетической информации.

1951 — Л. Полинг и Р. Кори (L. Pauling, R. Corey) обосновали существование основных типов укладки аминокислотных остатков в полипептидных цепях белков ( $\alpha$ -спираль и складчатый  $\beta$ -слой).

1953 — Дж. Уотсон и Ф. Крик (J. Watson, F. Crick) создали модель двойной спирали ДНК на основе рентгенограмм, полученных Р. Франклин и М. Уилкинсом (R. Franklin, M. Wilkins).

1953 — Ф. Сангер (F. Sanger) расшифровал первичную структуру инсулина быка.

1956 — А. Корнберг (A. Kornberg) открыл ДНК-полимеразу.

1957 — А.Н. Белозерский и А.С. Спирин предсказали существование мРНК.

1960 — Дж. Кедрю (J. Kendrew) впервые описал трехмерную структуру миоглобина кашалота, а М. Перутц (M. Perutz) — структуру гемоглобина.

1960 — одновременно в нескольких лабораториях был открыт фермент транскрипции — РНК-полимераза.

1961 — Ф. Жакоб и Дж. Моно (F. Jakob, J. Monod) разработали модель оперона.

1965 — 1967 — Р. Холли (R. Holley) выяснил первичную структуру аланиновой тРНК, а А.А. Баев — валиновой тРНК.

1966 — М. Ниренберг, С. Очоа и Х.-Г. Корана (M. Nirenberg, S. Ochoa, H.-G. Khorana) расшифровали генетический код.

1967 — М. Геллерт (M. Gellert) открыл ДНК-лигазу – фермент, способный соединять фрагменты ДНК.

1970 — Г. Темин и Д. Балтимор (H. Temin, D. Baltimore) открыли обратную транскриптазу (РНК-зависимую ДНК-полимеразу) в онкогенных вирусах.

1972 — П. Бозер, С. Коэн и П. Берг (P. Boyer, S. Cohen, P. Berg) разработали технологию клонирования ДНК, заложили основы генетической инженерии.

1972 – Х.-Г. Корана (H.-G. Khorana) осуществил химический синтез гена аланиновой тРНК.

1975 — 1977 — Ф. Сангер (F. Sanger), а также А. Максам и У. Гилберт (A. Maxam, W. Gilbert) разработали методы быстрого определения первичной структуры ДНК.

1976 — Ф. Сангер (F. Sanger) расшифровал последовательность ДНК фага φX174.

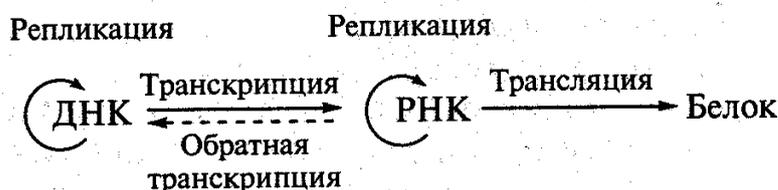
1976 — У. Гилберт (W. Gilbert) открыл мозаичное строение генов эукариот.

1976 — С. Ким, А. Рич, А. Клуг (S. Kim, A. Rich, A. Klug) определили 3-ую структуру тРНК.

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

ДНК → РНК → Белок

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



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

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

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

## ЛЕКЦИЯ 2

### СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ.

1. Первичная и вторичная структура ДНК.
2. Молекулярная и пространственная организация РНК. Типы РНК.
3. Гибридизация ДНК-РНК.

#### 1. Первичная и вторичная структура ДНК.

В 1869 г. – Ф. Мишер из ядер лейкоцитов человека, а затем из спермы лосося выделил вещество, которое он назвал «нуклеином». В конце XIX века было установлено, что кислый компонент «нуклеина» является нуклеиновой кислотой, которая содержит азотистые основания (пурины и пиримидины), углевод и фосфорную кислоту (рис. 6).



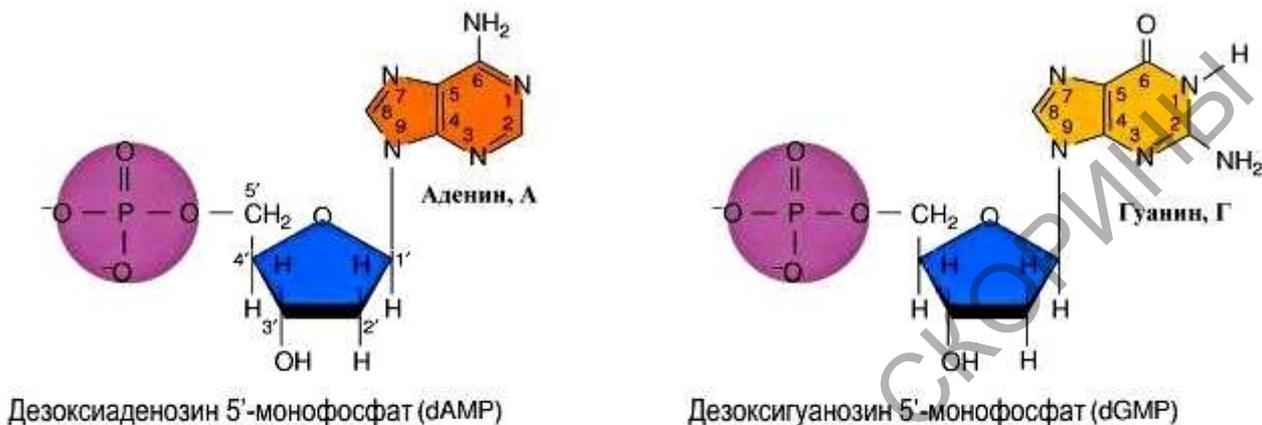
Рисунок 6 - Компоненты нуклеиновых кислот: азотистое основание (аденин, гуанин, цитозин и тимин), дезоксирибоза и остаток фосфорной кислоты.

К 30-м годам XX века П. Ливен с сотрудниками установил, что азотистое основание, углевод и фосфорная кислота соединены в блоки – **нуклеотиды** расположенные вдоль линейной молекулы нуклеиновой кислоты. Нуклеотидов оказалось четыре: **аденин, гуанин, цитозин и тимин**. (рис. 7).

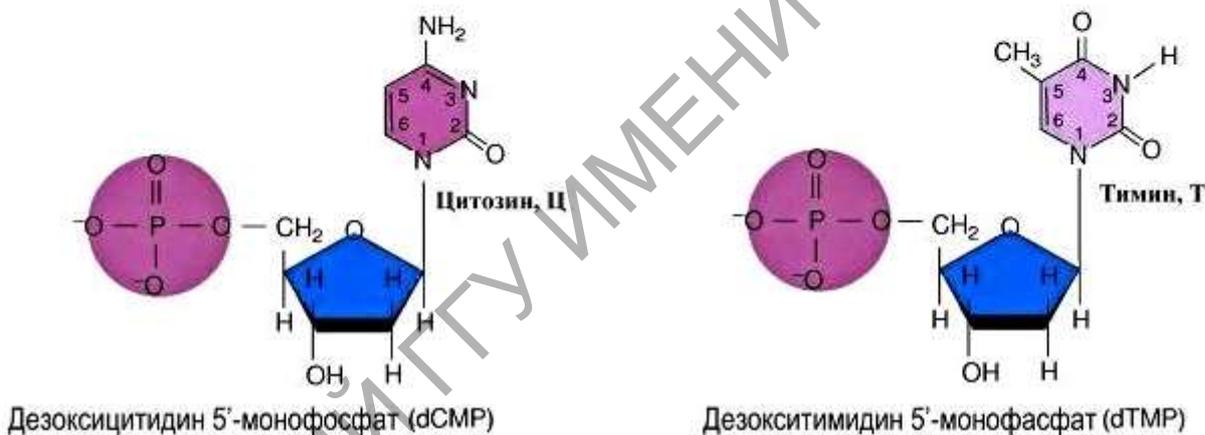
Поскольку углеводный компонент оказался **дезоксирибозой**, кислота получила название **дезоксирибонуклеиновой** – ДНК. Вместе с ядерной была выделена цитоплазматическая нуклеиновая кислота,

которая в качестве углевода содержала **рибозу** и поэтому получила название **рибонуклеиновой – РНК**.

### Пуриновые нуклеотиды



### Пиримидиновые нуклеотиды

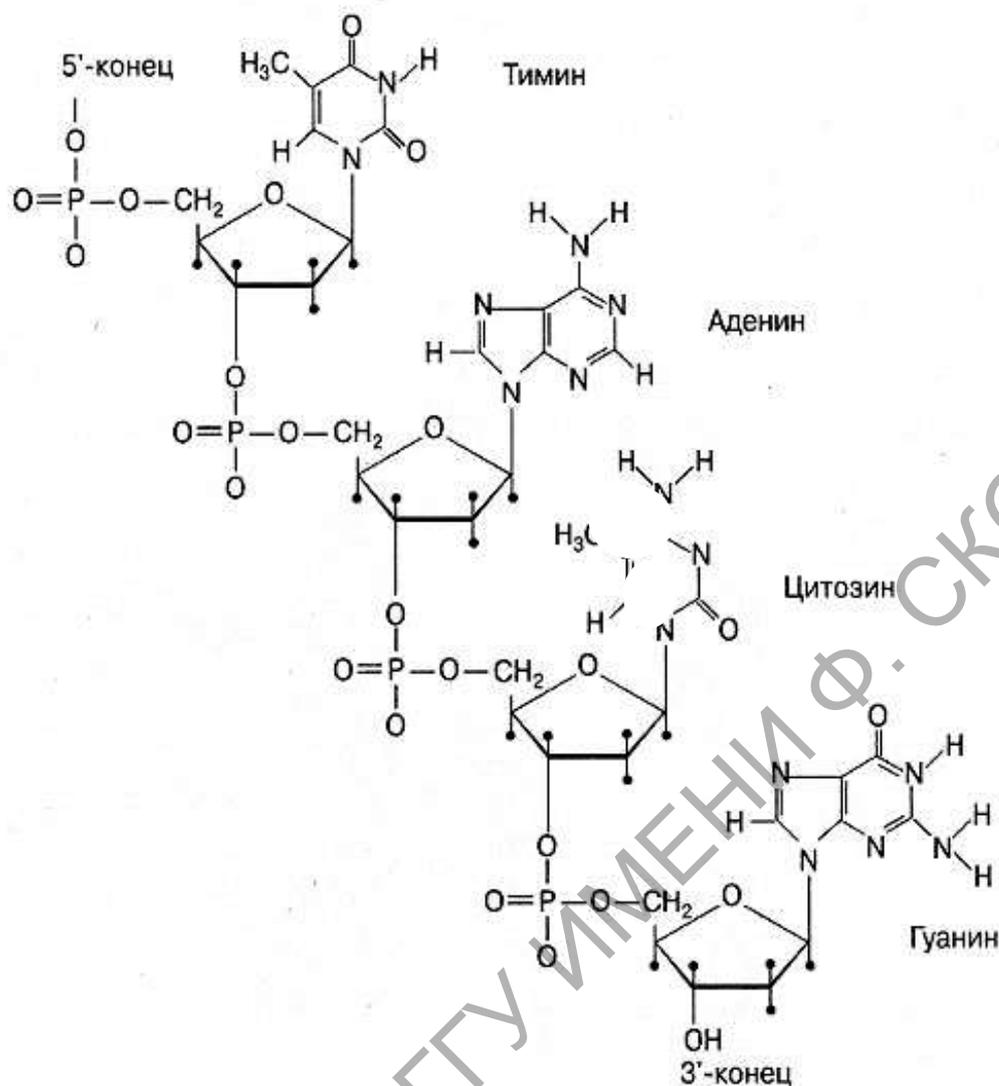


**Рисунок 7 - Нуклеотиды аденин, гуанин, цитозин и тимин, каждый из которых состоит из дезоксирибозы, остатка фосфорной кислоты и соответствующего азотистого основания**

Нуклеиновые кислоты являются биологическими полимерами. Мономерными звеньями ДНК и РНК являются нуклеотиды. Мономерные остатки в нуклеиновых кислотах связаны между собой фосфодиэфирными связями (рис. 8).

Как в ДНК, так и в РНК, эта связь осуществляется только за счет 3'-ОН одного нуклеотидного остатка и 5'-ОН другого. Такую межнуклеотидную связь называют 3',5'-фосфодиэфирной.

Цепи ДНК и РНК обладают определенной полярностью, или направлением, поскольку все межнуклеотидные фосфодиэфирные связи ориентированы вдоль цепи одинаково.



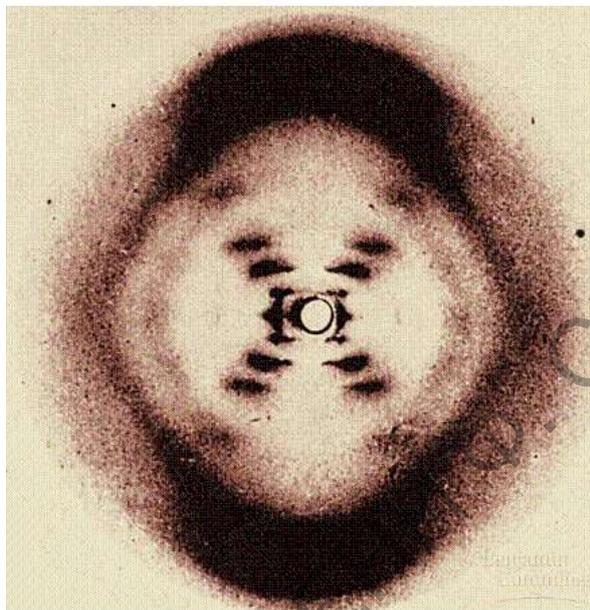
**Рисунок 8 – Первичная структура молекулы ДНК.**

В 1953 г. американский генетик Джеймс Уотсон и английский физик Френсис Крик предложили модель вторичной структуры ДНК. Согласно этой модели ДНК по своей пространственной организации представляет собой двойную спираль.

Свое открытие ученые сделали, основываясь на ранее полученных результатах других ученых. Так Эрвин Чаргафф и более поздние исследователи, изучая нуклеотидный состав ДНК различных видов организмов, сделали следующие выводы:

- а) нуклеотидный состав ДНК разных тканей одного и того же вида одинаков;
- б) нуклеотидный состав ДНК у разных видов различен;
- в) нуклеотидный состав не зависит от возраста и питания;
- г) в составе ДНК число остатков аденина всегда равно числу остатков тимина, а число остатков гуанина равно числу остатков цитозина.

Другие ученые Розалинд Франклин и Морис Уилкинс опубликовали рентгенограмму, полученную при рентгеноструктурном анализе ДНК. Рентгенограмма волокон ДНК указывала на то, что молекула обладает спиральной структурой и содержит более одной полинуклеотидной цепи.



**Рисунок 9 - Рентгенограмма, полученная при рентгеноструктурном анализе ДНК.**

За предложенную Уотсоном и Криком модель двойной спирали ДНК, совместно с Уилкинсом получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

**Параметры двойной спирали ДНК**, предложенной Уотсоном и Криком:

- 1) ДНК состоит из двух цепей, закрученных в правую двойную спираль;
- 2) цепи в молекуле ДНК расположены относительно друг друга антипараллельно (межнуклеотидная связь в одной цепи имеет направление 5'-3', а в другой 3'-5');
- 3) молекулы азотистых оснований ориентированы перпендикулярно оси двойной спирали;
- 4) на внешней стороне двойной спирали находятся остатки пентозы и фосфорной кислоты;
- 5) цепи ДНК при закручивании в двойную спираль образуют большую и малую борозды, ширина большой борозды – 2,2 нм, малой – 1,2 нм;
- 6) на один виток спирали приходится 10 нуклеотидных остатков;
- 7) полный виток спирали имеет длину 3,4 нм;

- 8) диаметр двойной спирали 1,7 нм;
- 9) цепи ДНК связаны друг с другом водородными связями, образованными между гуанином одной цепи и цитозином другой цепи, или между тиминном и аденином, расположенными в разных цепях;
- 10) между тиминном и аденином образуются две водородные связи, а между гуанином и цитозином – три водородные связи.

Способность гуанина взаимодействовать в молекуле ДНК только с цитозином, а аденина – только с тиминном называют *комплементарностью*, а основания гуанин и цитозин, аденин и тимин – *комплементарными*.

Согласно принципу комплементарности, последовательность одной цепи будет определять последовательность другой цепи. Всегда против аденина будет находиться тимин, а против гуанина – цитозин. Таким образом, цепи ДНК в двойной спирали будут комплементарны друг другу.

В стабилизации спиральной структуры молекулы ДНК участвуют ковалентные, гидрофобные и водородные связи. Двойная спираль стабилизируется также стекинг – взаимодействиями между основаниями. Стекинг-взаимодействие оснований (base-stacking) — межплоскостное нековалентное взаимодействие расположенных друг над другом оснований в нуклеиновых кислотах.

Параметры двойной спирали в зависимости от условий и состава ДНК могут несколько отличаться от той модели, которую предложили Уотсон и Крик. В настоящее время описаны и другие модели ДНК. Тем не менее, во всех предложенных моделях сохраняется принцип комплементарности, и цепи ДНК закручены в двойную спираль.

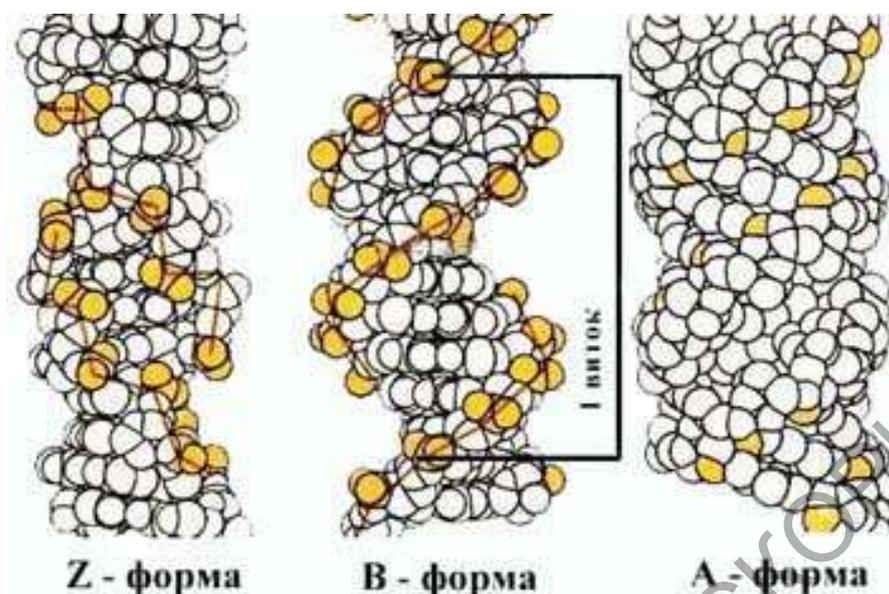
#### **A-форма ДНК**

A-форма ДНК образуется при относительно низкой влажности (75%) и в присутствии ионов Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> или Cs<sup>+</sup>. Эта структура является правой спиралью. В этой форме ДНК на виток спирали приходится 11 пар оснований. Расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали составляет 2,56 Å. Пары оснований наклонены на 20° (рис. 10).

Есть еще несколько форм правых спиралей и всего одна левая спираль (*Z-форма*).

#### **Z-форма ДНК**

Z-форма ДНК – левоспиральная. Число пар оснований на виток 12. Расстояние между соседними парами оснований 7,7 Å. Она была открыта в 1979 г при исследовании структуры гексануклеотида d(CG)<sub>3</sub>. На виток Z-спирали приходится 12 пар оснований. Ни A-, ни Z- формы не могут существовать в водном растворе без дополнительных воздействий (белки или суперспирализация).



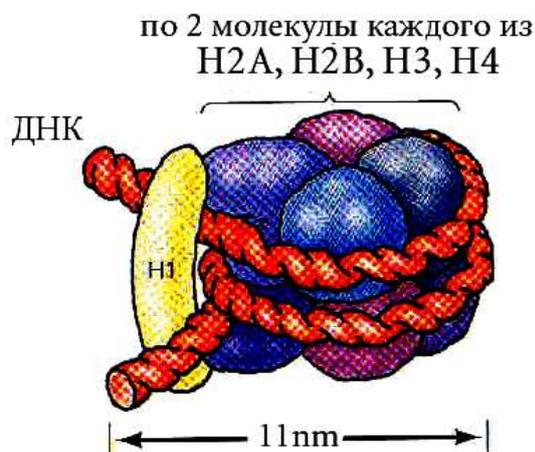
**Рисунок 10 – Формы двойной спирали ДНК.**

### Уровни упаковки генетического материала

Длина молекулы ДНК эукариот многократно превышает размеры клетки. Для обеспечения протекания различных биологических процессов она должна быть упакована. Существуют несколько уровней ее компактизации.

1. *Голая ДНК* – представляет собой двойную спираль диаметром 1,7 нм. Такая ДНК обладает сверхчувствительностью к ДНКазам – ферментам, гидролизующим фосфодиэфирные связи.

2. *Нуклеосомный* («бусы на ниточке»). На этом уровне ДНК (около 160 п.н.) делает два витка вокруг нуклеосомы (кора) – октамера, содержащего по две молекулы каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4 (рис. 11). Размер ДНК между нуклеосомами (линкерная ДНК) составляет около 60 п.н.



**Рисунок 11 – Нуклеосома.**

Нуклеосомный уровень упаковки свойственен всей эукариотической ДНК, он дает укорочение в 7 раз. Диаметр увеличивается до 11 нм.

3. *Супернуклеосомный* (30 нм – хроматиновая фибрилла): такая структура формируется в результате взаимодействия гистона H1 с линкерной ДНК, ее диаметр равен 30 нм (рис. 12).

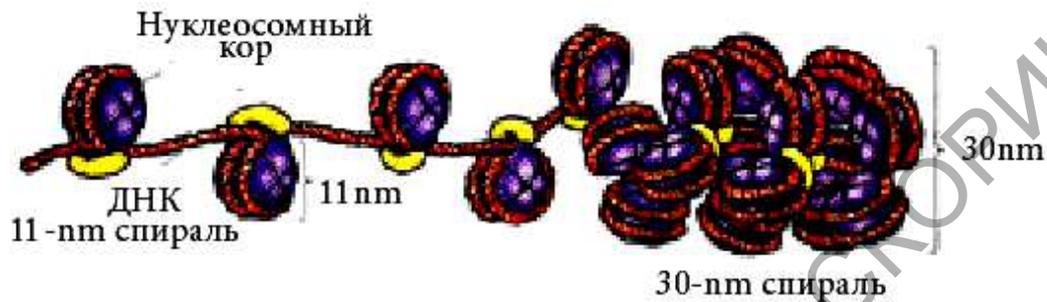


Рисунок 12 - Супернуклеосомный уровень упаковки ДНК.

4. *Хроматидный* (серия петельных доменов). В формировании такой структуры принимают участие ДНК-связывающие белки, они объединяют в петли 30-нм фибриллы, состоящие из 20000 – 100000 пар нуклеотидов (рис. 13).



Рисунок 13 – Хроматидный уровень упаковки ДНК.

5. *Метафазная хромосома*:

Такая структура формируется во время митоза. Толщина хроматиды 700-900 нм. Укорочение еще в 20 раз (рис. 14).



Рисунок 14 – Метафазная хромосома.

## Функции ДНК

ДНК выполняет следующие функции:

1. Участвует в копировании генетического материала (репликации) и передаче его дочерним клеткам в ходе их деления.
2. Обеспечивает: экспрессию генов (на этапе транскрипции); регуляцию экспрессии генов (регуляцию транскрипции).
3. Осуществляет поддержание стабильности наследственной информации посредством репарации повреждений;
4. Накапливает мутации, обеспечивающие изменчивость наследственного материала;
5. Участвует в кроссинговере (рекомбинации), что также обеспечивает изменчивость наследственного материала;
6. На уровне ДНК осуществляются манипуляции с генами (генная инженерия);
7. На уровне ДНК осуществляются манипуляции с последовательностями нуклеотидов (геномика).

## 2. Молекулярная и пространственная структура РНК.

РНК отличается от ДНК тем, что у нее углеводом является рибоза вместо дезоксирибозы. Кроме того, вместо нуклеотида тимина у нее урацил. И наконец, в отличие от ДНК она имеет в основном одноцепочечное строение (табл. 1).

Таблица 1 – Отличия в строении ДНК и РНК.

Характеристика	ДНК	РНК
Сахар	Дезоксирибоза	Рибоза
Азотистые основания	А, Т, Г, Ц	А, У, Г, Ц
Количество цепей в молекуле	99.99% двойная спираль 0.01% одноцепочечная.	99.99% одноцепочечная 0.01% двухцепочечная
Форма молекулы	Все одноцепочечные-кольцевые. Большинство двухцепочечных - линейные, часть-кольцевые.	Линейные молекулы

Различают следующие виды РНК:

**А) информационная (матричная) РНК** состоит из 300-30 тыс. нуклеотидов и составляет примерно 5% от всей РНК, содержащейся в

клетке. Представляет собой комплементарную копию определенного участка ДНК. Выполняет роль переносчика генетической информации от ДНК к месту синтеза белка (в рибосомы) и непосредственно участвуют в сборке его молекул.

**Б) транспортная РНК** состоит из 75-90 нуклеотидов и составляет до 10% от всей РНК клетки (насчитывается более 60-ти). Молекулы тРНК транспортируют аминокислоты из цитоплазмы в рибосомы, т.е. непосредственно участвуют в биосинтезе белков. Особенность строения тРНК – третичная структура в форме клеверного листа за счет неспаренных азотистых оснований.

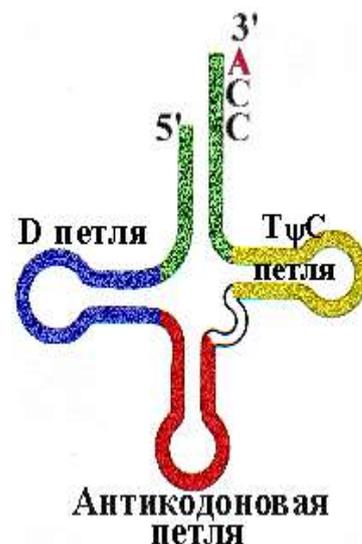
Каждая аминокислота присоединяется к определенной тРНК. На одном конце тРНК находится **акцепторный триплет ЦЦА**, к аденину которого присоединяется специфическая аминокислота. На другом конце (в антикодонной петле) каждой тРНК находится **антикодон** – специфический триплет, с помощью которого тРНК «узнает» соответствующий **комплементарный кодон** в иРНК, и тем самым определяет место, куда должна быть поставлена данная аминокислота в синтезируемой молекуле белка. Боковые петли тРНК, по-видимому, используются для связывания с рибосомой и со специфической аминоацил-тРНК-синтетазой.

### Структура транспортной РНК

*Транспортные РНК (тРНК)* - короткие молекулы (70-90 нукл.), имеющие и вторичную, и третичную структуру.

Вторичная структура - "клеверный лист". Последовательность ССА на 3'-конце одинакова для всех тРНК. К концевому аденозину (А) присоединяется аминокислота.

Наличие в тРНК тимина (Т), псевдоуридина (ψ) (в ТψС- петле), и дигидроуридина (ДГУ) (в D-петле) - минорных, т.е. редко встречающихся в РНК нуклеотидов, указывает на особенности ее строения, необходимые для безошибочного узнавания ферментами, для защиты от действия рибонуклеаз (поэтому тРНК - долгоживущие, в отличие от мРНК).





Третичная структура в проекции на плоскость имеет форму бумеранга.

*Разнообразие первичных структур tRNA - 61+1 - по количеству кодонов (соответственно числу антикодонов в tRNA) + формилметиониновая tRNA, у которой антикодон такой же, как у метиониновой tRNA.*

*Разнообразие третичных структур - 20 (по количеству аминокислот).*

**В) рибосомальная РНК** состоит из 3-5 тыс. нуклеотидов (около 85% РНК). Вместе с белками образует структуру рибосом. Обеспечивает пространственное расположение иРНК и тРНК.

Большинство клеток содержат много малых цитоплазматических РНК (мцРНК), а в клетках эукариот присутствуют малые ядерные РНК (мяРНК).

#### *Малые ядерные РНК*

Все эукариотические клетки содержат множество малых ядерных РНК (мяРНК) — коротких стабильных молекул РНК, большинство которых в составе нуклеопротеидных частиц присутствуют в ядре. Они обнаружены в составе сплайсингосом млекопитающих. Эти РНК называют U-РНК из-за необычайно большого содержания урацила и его модифицированных форм. Нуклеотидные последовательности всех U-РНК позвоночных совпадают на 95 %.

#### *Малые цитоплазматические РНК*

Функции малых цитоплазматических РНК (мцРНК), за исключением 7SL-РНК сигнал-распознающих частиц, не установлены. Известно, что большинство этих РНК ассоциированы с крупными семействами последовательностей, содержащими как гены, так и псевдогены.

### **3. Гибридизация ДНК-РНК.**

Вторичная структура нуклеиновых кислот образуется за счет слабых взаимодействий – водородных и гидрофобных. При нагревании раствора ДНК такие связи разрушаются, и полинуклеотидные цепи расходятся. Этот процесс называют **денатурацией**. При денатурации снижается вязкость раствора, а также наблюдается увеличение его оптической плотности – **гиперхромный эффект**. Этот эффект вызван тем, что при денатурации экранированность азотистых оснований уменьшается, и они более интенсивно поглощают свет с  $\lambda=260$  нм.

Если же раствор, содержащий денатурированную ДНК, медленно охладить, могут вновь сформироваться двухспиральные структуры, идентичные исходным. Такой процесс получил название **ренатурации**. На явлении денатурации и ренатурации основан метод, называемый **молекулярной гибридизацией**. Процесс гибридизации может осуществляться между двумя любыми цепями нуклеиновых кислот (ДНК – ДНК, ДНК – РНК) при условии, что они содержат комплементарные последовательности нуклеотидов (рис. 15).

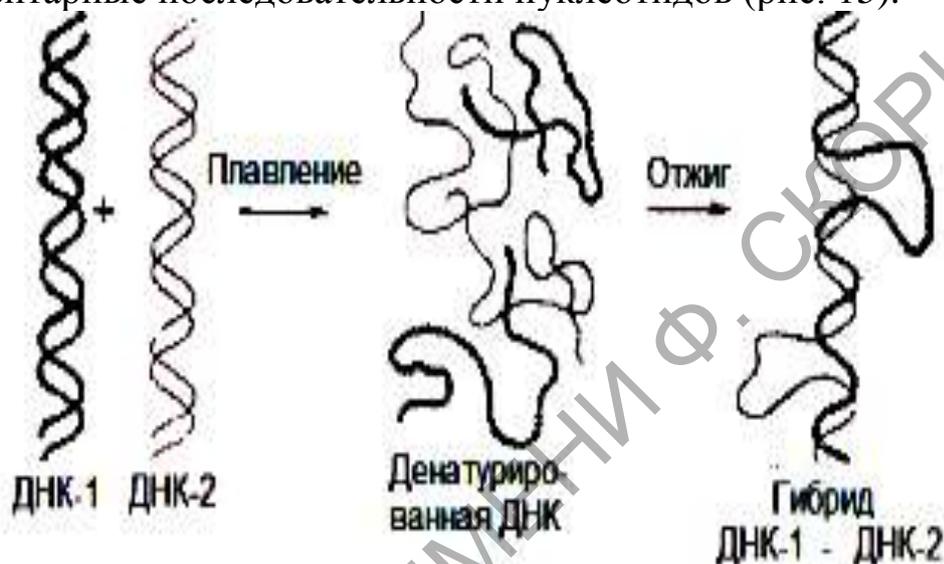


Рисунок 15 – Гибридизация молекул ДНК.

Гибриды могут быть совершенными (полная комплементарность цепей) и несовершенными (частичная комплементарность цепей). Методом молекулярной гибридизации можно установить сходство и различие первичной структуры разных образцов нуклеиновых кислот. Это используется для выделения генов и РНК, изучения первичной структуры нуклеиновых кислот, определения степени родства, а также для получения рекомбинантных ДНК.

## ЛЕКЦИЯ 3

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. Рестрикционный анализ ДНК. Клонирование ДНК.
2. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК.
3. Полимеразная цепная реакция.

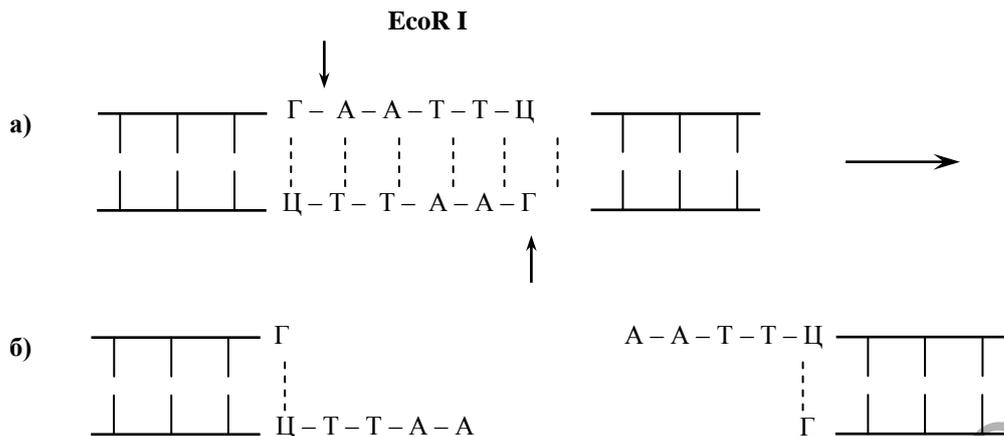
#### 1. Рестрикционный анализ ДНК. Клонирование ДНК.

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**, 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, какую ДНК разрезать – человека или растения, бактерии или вируса, лишь бы в ней были **распознаваемые участки**. Это значит, что две несхожих между собой последовательности ДНК при обработке одной и той же рестриктазой легко можно сшить друг с другом.

**Виды рестриктаз.** 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**, 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. 15). 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.



**Рисунок 15 - 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 “липкие концы”. Скрепить липкие концы двух молекул ДНК помогает другой фермент - ДНК-лигаза. Он “сшивает” между собой сахарофосфатные остовы двух фрагментов с образованием полной структуры ДНК.

В настоящее время известно более 500 различных рестриктаз, способных разрезать ДНК примерно в 120 различных местах. Некоторые из них представлены в таблице 2.

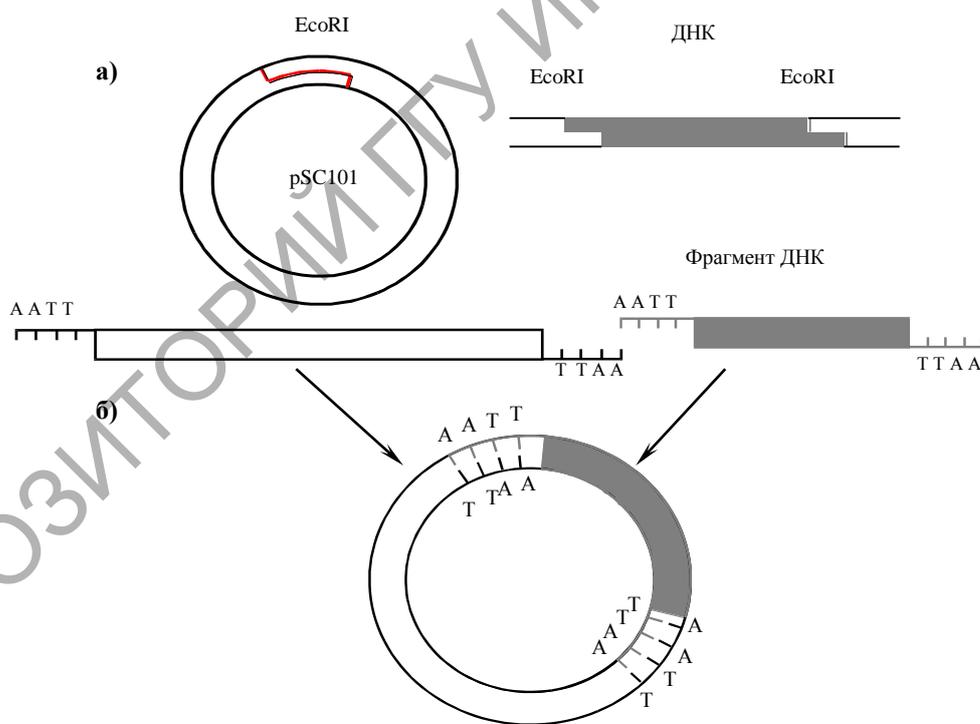
**Таблица 2.** Некоторые рестриктазы и расщепляемые ими последовательности.

Рестриктазы	Участки распознавания и места разреза ДНК
Vam I	$  \begin{array}{c}  \downarrow \\  5' \text{-Г-Г-А-Т-Ц-Ц-3}' \\  3' \text{-Ц-Ц-Т-А-Г-Г-5}'  \end{array}  $
EcoR I	$  \begin{array}{c}  \downarrow \\  5' \text{-Г-А-А-Т-Т-Ц-3}' \\  3' \text{-Ц-Т-Т-А-А-Г-5}'  \end{array}  $
Hind III	$  \begin{array}{c}  \downarrow \\  5' \text{-А-А-Г-Ц-Т-Т-3}' \\  3' \text{-Т-Т-Ц-Г-А-А-5}'  \end{array}  $
Hae III	$  \begin{array}{c}  \downarrow \\  5' \text{-Г-Г-Ц-Ц-3}' \\  3' \text{-Ц-Ц-Г-Г-5}'  \end{array}  $
Hpa II	$  \begin{array}{c}  \downarrow \\  5' \text{-Ц-Ц-Г-Г-3}' \\  3' \text{-Г-Г-Ц-Ц-5}'  \end{array}  $
Sma I	$  \begin{array}{c}  \downarrow \\  5' \text{-Ц-Ц-Ц-Г-Г-Г-3}' \\  3' \text{-Г-Г-Г-Ц-Ц-Ц-5}'  \end{array}  $

С помощью ферментов рестриктаз и лигаз конструируют гибридные ДНК путём сшивки фрагментов разных видов *in vitro*.

Для доставки чужеродных генов в различные организмы применяются 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. Идеальными векторными молекулами являются **плазмиды**, представляющие собой небольшие **кольцевые молекулы ДНК**, самостоятельно живущие в цитоплазме бактерий. Плазмиды способны к автономной репликации, обладают **генами устойчивости** к различным антибиотикам, 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.

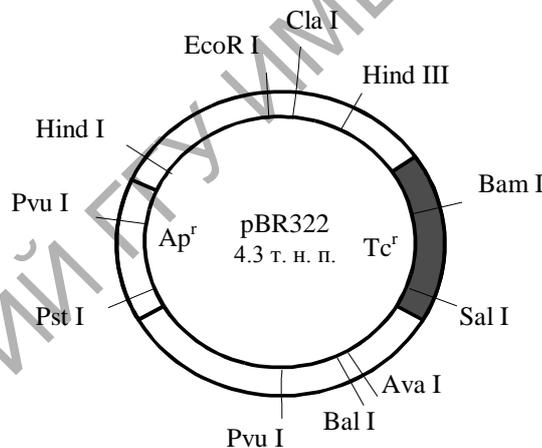
Первым успешным вектором, который начали использовать в генной инженерии, стала кольцевая плаزمида pSC101 (рис. 16).



**Рисунок 16 - Введение фрагмента рекомбинантной молекулы ДНК в плазмидный вектор pSC101 с помощью рестриктазы EcoRI, образующей «липкие» концы: а) — разрезание молекул ДНК рестриктазой и образование фрагментов с «липкими» концами; б) — гибридизация и сшивание ферментом лигазой фрагментов ДНК.**

Она несет только один участок расщепления (сайт рестрикции) рестриктазой *EcoR*I 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.

По мере развития методов генной инженерии совершенствовались и плазмидные вектора. Широкое распространение получила плаزمид ***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 плазмид кодировала еще устойчивость к ампициллину (рис. 17).

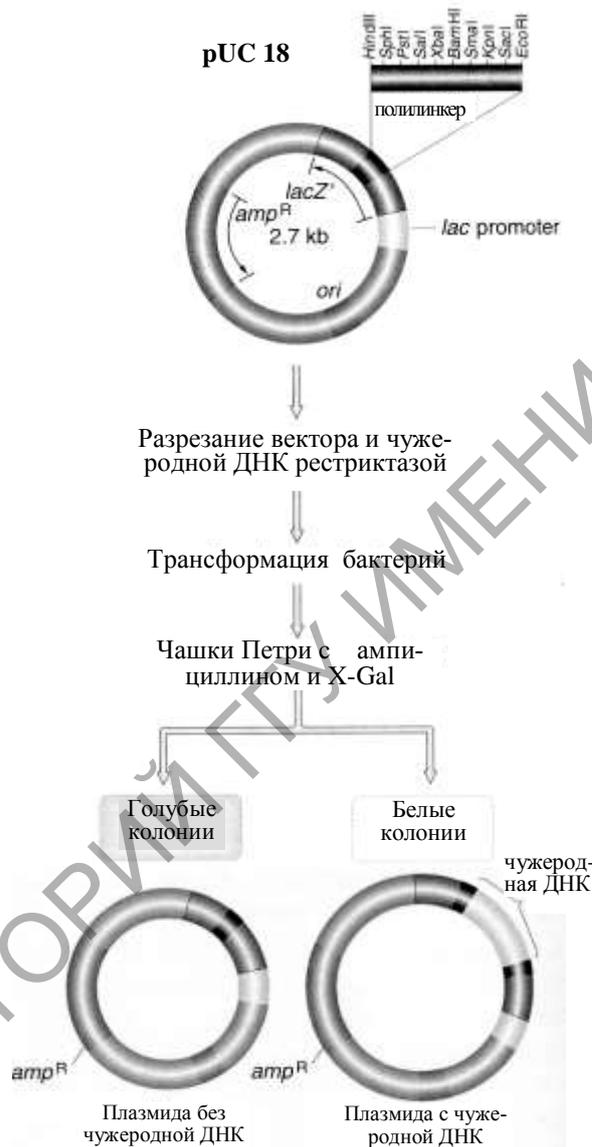


**Рисунок 17 - Вектор *pBR322*, схема расположения сайтов рестрикции. *Ap<sup>r</sup>* и *Tc<sup>r</sup>* – гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину.**

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 введенные в бактериальные клетки кишечной палочки *E. coli* при помещении их на твердую питательную среду с антибиотиками ампициллином 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.

Многие годы успешно применяется еще один класс плазмидных векторов, относящихся к типу **pUC**. На рисунке 18 представлена схема использования плазмиды **pUC18**.



**Рисунок 18 - Схема использования плазмиды pUC18 в ходе клонирования фрагмента чужеродной ДНК**

У этой плазмиды величиной 2,7 кб селекционным маркером 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., содер-

жащий 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  $\beta$ -галактозидазой (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 размножиться и наследоваться в потомстве.

## **2. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК.**

В середине 70-х гг. XX в. были предложены два метода определения нуклеотидной последовательности (секвенирования) небольших фрагментов ДНК. Первый прямой метод определения последовательности ДНК был предложен Ф. Сэнгером и Д. Коулсоном в 1975 г. (рис. 19). Этим способом была секвенирована короткая ДНК фага  $\phi$ x174 (5,4 кб). Вторым методом секвенирования ДНК был разработан А. Максамом и У. Гилбертом в 1977 г. и с его помощью установлена последовательность ДНК для вируса sv-40 (5,2 кб) и плазмиды pBR322 (4,3 кб). В основе метода Сенгера лежит ферментативное копирование с помощью фрагмента Кленова ДНК полимеразы I из *E.coli*.

В качестве праймеров используются синтетические олигонуклеотиды. Специфическую терминацию синтеза обеспечивают добавлением в реакционную смесь помимо четырех типов dNTP (один из которых радиоактивно мечен по  $\alpha$  положению фосфата) еще и одного из 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddATP, ddTTP, ddCTP или

ddGTP), способного включаться в растущую цепь ДНК, но не способного обеспечивать дальнейшее копирование из-за отсутствия 3'-ОН группы. Соотношение концентраций dNTP/ddNTP подбирается экспериментально так, чтобы в итоге получить набор копий ДНК различной длины. Таким образом, для определения первичной структуры исследуемого фрагмента ДНК требуется провести четыре реакции копирования: по одному типу терминаторов в каждой реакции. После этого полученные продукты разгоняются в полиакриламидном геле (ПААГ) на соседних дорожках и по расположению полос определяется последовательность нуклеотидов.

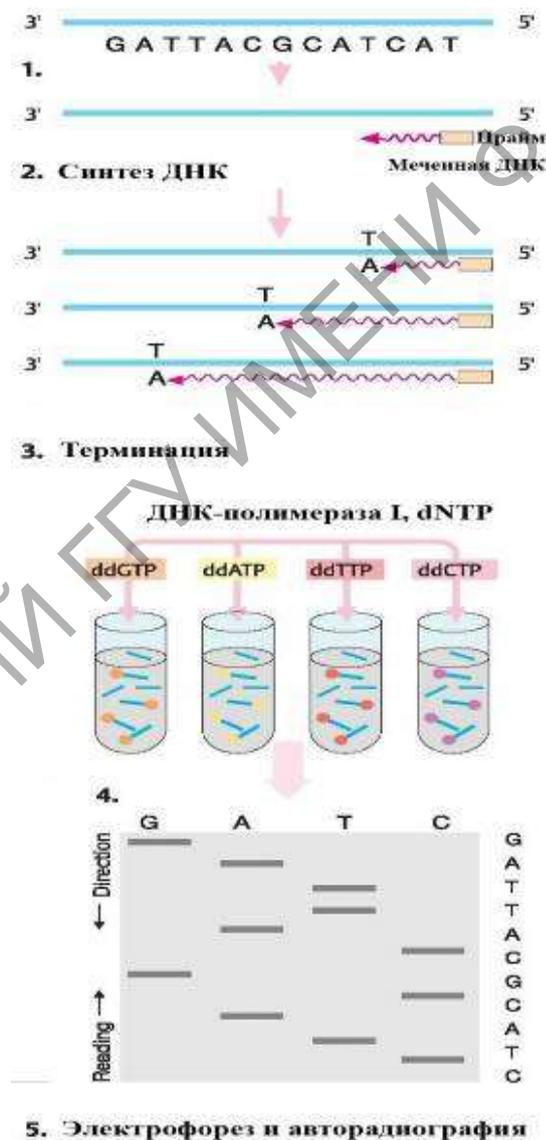


Рисунок 19- Этапы секвенирования по Сэнгеру.

**Метод Максама-Гилберта** основан на химической деградации фрагмента ДНК, радиоактивно меченного с одного конца (рис. 20).

Препарат меченной ДНК разделяют на четыре части (или аликвоты) и каждую обрабатывают реагентом, модифицирующим одно или два из четырех оснований. А. Максам и У. Гилберт предложили модифицировать *пуриновые основания (А,Г)* диметилсульфатом. При этом происходит метилирование адениновых остатков по азоту в положении 3, а гуаниновых – по азоту – в положении 7. Обработка образца ДНК HCl (0° С) приводит к выщеплению метиладенина. Последующая инкубация в щелочной среде (90 °С) вызывает разрыв сахарно-фосфатной цепи ДНК в местах выщепления оснований.

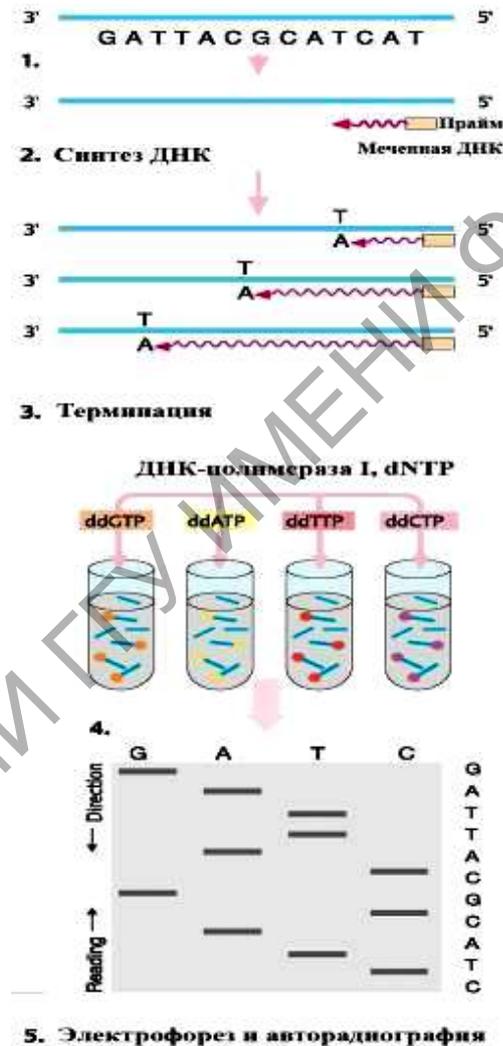


Рисунок 20 – Этапы секвенирования по Максиму-Гилберту.

Обработка пиперидином приводит к гидролизу образца по остаткам метилгуанина. *Пиримидиновые основания (Ц,Т)* модифицируют гидразином. Если реакцию вести в бессолевой среде, то модифицируются как цитозин, так и тимидин; если обработку вести в присутствии NaCl, то модифицируется лишь цитозин. Расщепление цепи ДНК на фрагменты и в этом случае осуществляется пиперидином. Условия подбирались таким образом, чтобы в итоге получить полный

набор фрагментов разной длины. Последующий электрофорез в полиакриламидном геле позволяет восстановить полную структуру исследуемого фрагмента.

В 1986 году Лерой Худ с сотрудниками провел автоматизацию процесса секвенирования. Был усовершенствован метод Сэнгера и вместо радиоактивных меток стали использовать флуоресцентные красители разного цвета для четырех дидезоксинуклеотидов. Флуоресцентный анализ позволил все четыре смеси электрофорезировать вместе, что дало возможность определять последовательность ДНК автоматически и выводить результат на экран компьютера.

В основу автоматического секвенирования (рис. 21, 22) заложен уже упоминавшийся метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих ddNTP (\*).

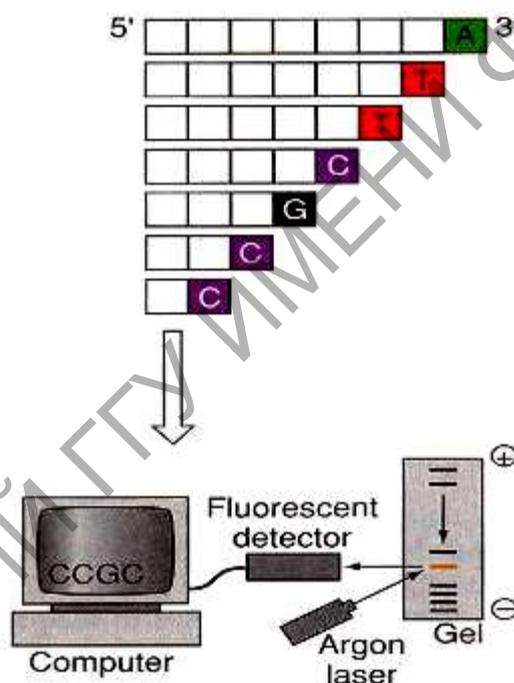


Рисунок 21 – Автоматическое секвенирование.

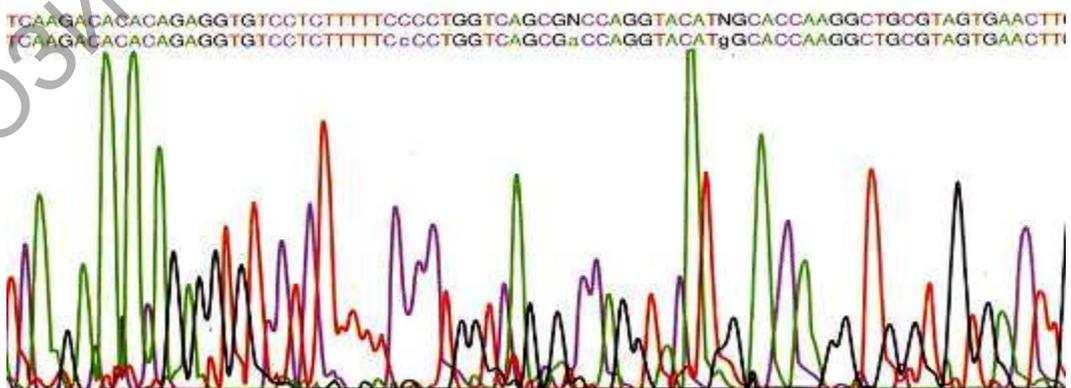


Рисунок 22 – Отображение спектра, полученного в результате секвенирования

Как и классический вариант Сэнгера, автоматическое секвенирование включает две стадии: проведение терминирующих реакций и разделение их продуктов с помощью электрофореза. Как правило, автоматизирована лишь вторая стадия, т.е. разделение меченных фрагментов ДНК в ПААГ, получение спектра эмиссии флуорофоров и последующая обработка собранных данных.

Таким образом, автоматическое секвенирование отличается от ручного секвенирования только типом используемой метки.

Обычно флуоресцентную метку включают либо в праймер, либо в терминатор транскрипции согласно следующим схемам: меченный праймер (четыре разных красителя) и немеченные терминаторы; меченный праймер (один краситель) и немеченные терминаторы; меченные терминаторы (каждый тип терминатора своим красителем) и немеченный праймер. Использование меченных праймеров предполагает проведение четырех независимых реакций (отдельно с каждым из терминаторов) для каждого секвенируемого образца. Использование меченных терминаторов позволяет совместить все четыре реакции в одной пробирке. Если используется единственный краситель, то разделение продуктов секвенирования в геле проводят на четырех разных дорожках. Использование четырех разных красок позволяет разгонять продукты реакции на одной дорожке.

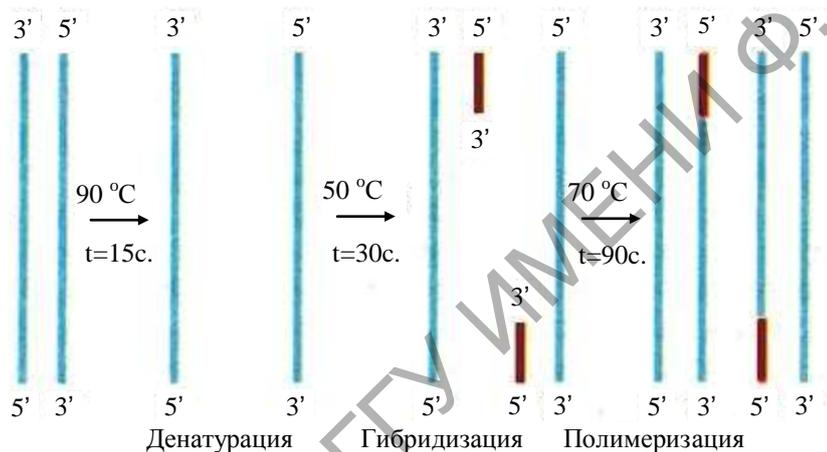
### **3. Полимеразная цепная реакция.**

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 (размножить)** 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 (**Таg-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 Таг-ДНК-полимеразой, присоединяющейся к **3'-концам праймеров** и достраивающие их до заданной длины. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) протекает в три стадии (рис. 23).

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.



**Рисунок 23 - 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 Таг-полимераза удлиняет оба праймера с их 3'-концов. Праймеры дорастают до размеров матрицы. Этот процесс протекает в течении 90 секунд. В результате **количество ДНК удваивается**. Фермент Таг-полимераза была выделена из термофильных бактерий *Thermus aquaticus*, и отличается устойчивостью к высокой температуре. При температуре 70°С гибрид праймер-ДНК не денатурирует, а Таг-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 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.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРНИНЫ

## ЛЕКЦИЯ 4

### ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА ПРО- И ЭУКАРИОТ

1. Определение нуклеотидных последовательностей в геномах
- 2 Аннотация расшифрованной последовательности.
- 3 Характеристика геномов прокариот.
- 4 Характеристика геномов эукариот.
- 5 Минимальный геном необходимый для жизни.

С начала 20 века основные силы генетиков были сосредоточены на идентификации и картировании генов различных организмов. Для этого проводили поиск спонтанных мутаций или мутаций, возникших в результате физических или химических воздействий. Однако процесс получения мутаций довольно долгий и трудоемкий. Кроме того, возникшие мутации часто приводят к гибели организма, и это делает невозможным картирование мутантного гена.

В последние десятилетия генетика сделала мощный рывок, перейдя от классических подходов мутагенеза и картирования к методам рекомбинантных ДНК. Для этого были созданы коллекции генных клонов – **геномные библиотеки**. Анализируя перекрывающиеся области последовательностей ДНК из различных клонов, генетики начали определять последовательность всех генов в геномах некоторых видов. Это направление получило название **геномики**.

Анализ геномов представляет собой крупномасштабное исследование, требующее координированной работы многих лабораторий. Самый большой и широкоизвестный проект «Геном человека» (The Human Genome Project) был инициирован в 1988 году Национальным Институтом Здоровья, США. В ходе запланированных работ проанализированы геномы человека (*H. sapiens*), бактерий (*E. coli*), дрожжей (*S. cerevisiae*), круглых червей (*S. elegans*), плодовой мушки (*D. melanogaster*) и мыши (*M. musculus*).

#### **1. Определение нуклеотидных последовательностей в геномах.**

Первым разработанным методом определения нуклеотидных последовательностей в генах, составляющих геном был **метод «клон за клоном»**. На первом этапе создаются геномные (хромосомные) библиотеки фрагментов, которые покрывают всю геномную ДНК организма (геномные клоны). Извлеченные из библиотек клоны анализируют, чтобы создать **генетические и физические карты** на основе

наследования генетических маркеров (RFLPs, STSs) в гетерозиготных семьях. После этого в клонах ищут перекрывающиеся друг с другом последовательности. Таким образом, перекрывают всю хромосому. На последнем этапе определяют нуклеотидную последовательность каждого клона, и, связывая их вместе, составляют последовательность ДНК всей хромосомы (генома). Основные этапы определения нуклеотидных последовательностей генома методом «клон за клоном» представлены на рисунке 24.

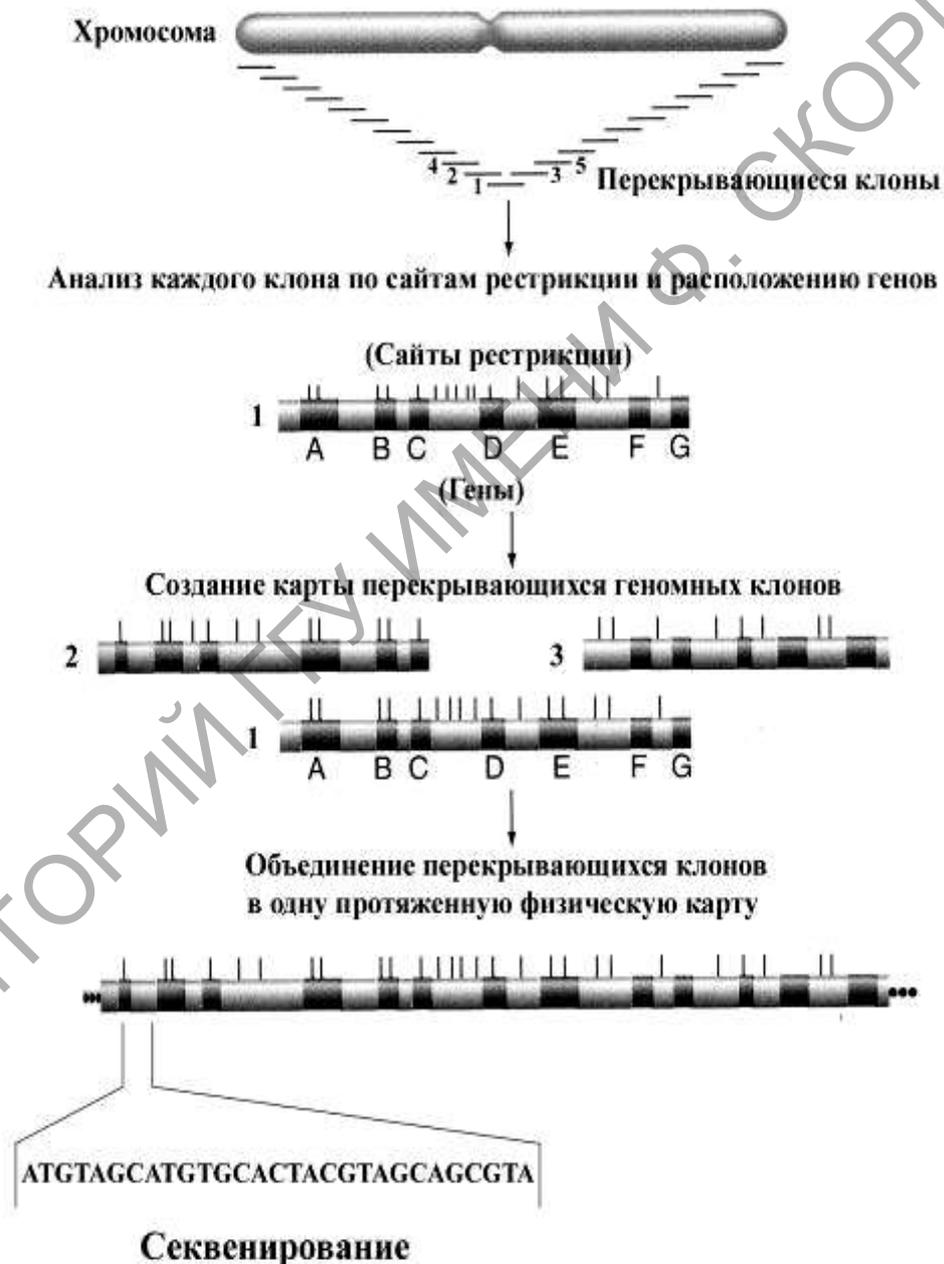


Рисунок 24 – Этапы анализа перекрывающихся клонов, создание протяженной физической карты молекулярных маркеров по длине хромосомы и последующее секвенирование клонов для составления последовательности ДНК всей хромосомы.

При использовании второго метода, названного методом дробовика

или «шот-ган» (shotgun) клоны из геномных библиотек отбираются случайным образом. В отобранных клонх проводят определение последовательности нуклеотидов на основе секвенирования ДНК фрагментов с обоих концов. Аналогичным образом поступают до тех пор, пока все клоны библиотеки не будут проанализированы. Специально разработанные компьютерные программы позволяют проанализировать перекрывающиеся ДНК-последовательности клонов и связать их вместе. Таким образом, удается получить информацию о последовательности генома (хромосомы) в целом. Этот метод, разработанный К. Вентором в Институте исследования генома, был использован для определения последовательности генома *Haemophilus influenzae* в 1995 г. После усовершенствования метода Вентор организовал компанию Celera, чтобы определять последовательности геномов эукариот, включая человека.

Для исключения ошибок в нуклеотидной последовательности, составляющей геном, работы по секвенированию ДНК проводятся многократно. Так применяя метод дробовика при исследовании генома бактерии *Pseudomonas aeruginosa* ( $6,3 \times 10^6$  н.п.) ученые определяли последовательность нуклеотидов 7 раз. Но даже после этого в результате компьютерной обработки данных было выявлено 1604 участка ДНК, для которых были нужны дополнительные исследования. На заключительном этапе полученные методом «шот-ган» данные по двум участкам генома длиной 82 тыс. н.п. сравнили с данными, полученными стандартным методом и результаты полностью совпали.

В частном проекте компании Celera Genomics для определения последовательности ДНК человека ( $3,2 \times 10^9$  н.п.), используя метод дробовика, последовательность генома была перекрыта 35 раз. В черновом варианте расшифровка генома завершена, но необходимо провести коррекцию ошибок, заполнение пробелов размером 150 Мб, а также расшифровку 15% генома гетерохроматиновых районов.

## **2. Аннотация расшифрованной последовательности.**

После определения нуклеотидной последовательности встает следующая задача по ее аннотации, которая заключается в идентификации всех генов и кодируемых белков, мобильных элементов и семейств повторов, которые могут присутствовать в геноме.

Гены, кодирующие белки, обнаруживаются при анализе нуклеотидной последовательности самим исследователем или при помощи компьютерных программ. Гены, кодирующие белки, содержат так

называемую **открытую рамку считывания**, которая начинается с **инициирующего кодона АТГ** и заканчивается одним из трех **терминирующих кодонов** - ТАА, ТАГ или ТГА. Сканирование последовательности ДНК для обнаружения открытой рамки считывания, ограниченной АТГ с одной стороны и стоп-кодоном с другой, является одной из стратегий поиска генов. Однако этот метод высоко эффективен только для аннотации бактериальных геномов. В случае же геномов эукариот продуктивность метода резко снижается, поскольку большинство эукариотических генов состоят из **экзонов** (кодирующих участков гена) и **интронов** (некодирующих участков гена), и программа часто интерпретирует экзоны, как отдельные гены, т. к. стоп-кодона часто встречаются в интронах.

Следует отметить, что последние версии программ настроены на поиск специфических черт открытых рамок: интрон-экзонных сочленений, 3'полиА-сигналов и **преимущественных кодонов**. Например, аланин может кодироваться четырьмя кодонами, но в геноме человека кодон ГЦЦ встречается в 41% аланиновых кодонов, а ГЦГ только в 11%. Наиболее часто встречающиеся кодоны присутствуют в экзонах, но не встречаются в интронах и пространствах между генами.

После обнаружения предполагаемых открытых рамок считывания для определения гена проводят поиск гомологичных последовательностей среди расшифрованных генов других организмов в базах данных (например, в Genbank).

### 3. Характеристика геномов прокариот.

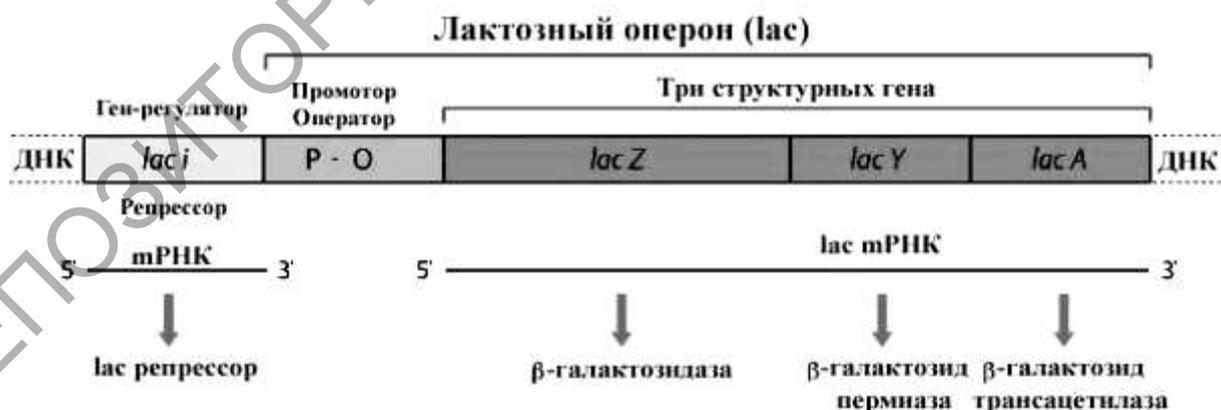
На сегодняшний день завершена расшифровка последовательностей нескольких десятков геномов прокариот и эукариот. Поскольку прокариоты имеют маленький геном, подходящий для клонирования генов методом дробовика, то для более **50 видов геномы уже расшифрованы** и анализ более 200 находится в стадии завершения. Размеры геномов и количество генов у некоторых прокариот приведены ниже в таблице 3.

**Таблица 3.** Размер генома и количество генов у некоторых прокариот.

Виды	Размеры генома (Mb)	Количество генов
<i>Escherichia coli</i>	4,64	4397
<i>Bacillus subtilis</i>	4,21	4212
<i>Haemophilus influenza</i>	1,83	1791
<i>Rickettsia provaseki</i>	1,11	834
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0,82	710
<i>Mycoplasma genitalum</i>	0,58	503

На основе полученных результатов установлено, что размеры геномов простейших относительно малы (в основном менее 5 мегабаз), но широко варьируют от больших геномов бактерий (30 мегабаз у *Bacillus megaterum*) до маленьких геномов эукариот (12 мегабаз у дрожжей). Большинство исследованных геномов прокариот организованы в **кольцевые молекулы ДНК**. Однако, *Borrelia burdoferi* – возбудитель болезни Лайма у человека и некоторые виды *Streptomyces* имеют геномы в виде линейной ДНК.

Еще одной характерной чертой геномов бактерий оказалась очень **высокая плотность генов**, которая составила в среднем 1 на 1000 пар оснований (табл. 3). Причем, такая плотность присуща и *E. coli* с относительно большим геномом 4,6 мегабаз (4397 генов) и *M. genitalum* с самым маленьким геномом 0,6 мегабаз (503 гена). Плотно расположенные гены у бактерий обуславливают высокую пропорцию ДНК, кодирующую белки (85-90 %). Интересно, что **только 1%** бактериальной ДНК является **некодирующей** и чаще всего она представлена в форме **транспозонов** – элементов, которые могут перемещаться по геному. **Интроны** в бактериальных геномах **практически отсутствуют**. Необходимо подчеркнуть важное свойство бактериальных геномов, связанное с тем, что большая часть генов у них локализуется совместно и являются **полицистронными транскрипционными единицами**, имеющими **общий промотор и регулятор**. Такая структура регуляции была открыта в ходе исследования метаболизма лактозы у *E. coli* еще в начале 60-х и получила название **оперона**. Упрощенная схема **лактозного оперона**, его структурных и регуляторных генов представлена на рисунке 25.



**Рисунок 25** – Упрощенная схема **lac-оперона** – структурных и регуляторных генов, контролирующих метаболизм лактозы у *Escherichia coli*. Структурные гены *lac-Z*, *lac-Y*, *lac-A* транскрибируются в одну полицистронную м-РНК, с которой одновременно транслируется сразу три фермента ( $\beta$ -галактозидаза, пермиаза и трансацетилаза).

В настоящее время установлено, что в геноме *E. coli* около 600 транскрипционных единиц являются оперонами.

#### 4. Характеристика геномов эукариот.

Эукариоты по сравнению с прокариотами имеют **низкую плотность генов**. Причем, более сложные эукариоты имеют менее компактные геномы и меньший уровень плотности генов (табл. 4). Если сравнить участки длиной 50 килобаз хромосомы 3 дрожжей и хромосомы 7 человека, то можно выявить несколько различий.

**Таблица 4.** Размер генома и количество генов у некоторых эукариот.

Виды	Размеры генома (Mb)	Количество генов
<i>S. cerevisiae</i> (дрожжи)	12	6548
<i>P. falciparum</i> (плазмодий)	30	ок 6500
<i>C. elegans</i> (нематода)	97	> 20000
<i>A. thaliana</i> (арабидопсис)	120	20000
<i>D. melanogaster</i> (дрозофила)	170	ок 16000
<i>O. sativa</i> (рис)	415	ок 20000
<i>Z. mays</i> (кукуруза)	2500	ок 20000
<i>H. sapiens</i> (человек)	3200	ок 35000
<i>H. vulgare</i> (ячмень)	5300	ок 20000

Во-первых, у дрожжей на таком участке расположено 20 генов, а у человека только - 6. Кроме того, ни один из генов дрожжей не содержит **интронов**, тогда как почти все гены человека их содержат. В некоторых генах имеется **более 100 интронов**. Ниже в качестве примера представлена схема  $\beta$ -глобинового гена, содержащего 2 интрона (рис. 26). Во-вторых, большой размер геномов эукариот обусловлен наличием так называемых **ДНК-повторов**. Например, у кукурузы более 80% суммарной ДНК представляет собой ДНК-повторы, что и обуславливает очень низкую плотность генов в геноме этого растения.

Хотя не вся нуклеотидная последовательность генома человека расшифрована, очевидно, что наши гены являются типичными эукариотическими. Суммарная ДНК составляет более 3 000 мегабаз длиной и распределена по 24 хромосомам, размеры которых варьируют от 55 до 250 мегабаз. Хромосома 19 имеет наибольшую плотность генов, а хромосома 13 и Y - наименьшую. Сначала предполагалось, что человеческий геном содержит от 80000 до 100000 генов. Однако, в результате проведенных исследований в рамках проекта «Геном человека» стало ясно, что число генов вряд ли превысит 35000 – 40000.

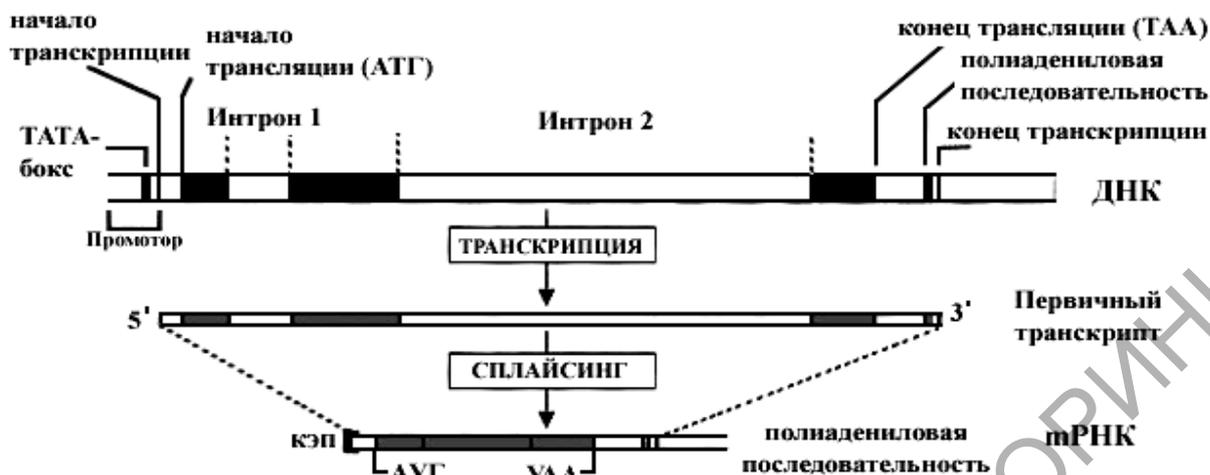


Рисунок 26 – Упрощенная схема  $\beta$ -глобинового гена человека и матричной мРНК после процесса транскрипции и сплайсинга. Этот ген состоит из более чем 2 тыс. н.п. Однако из них только около 450 н.п. несут информацию об аминокислотной последовательности  $\beta$ -глобина. Кроме трех кодирующих участков (экзонов), ген включает два некодирующих (интроны 1 и 2). В левой части гена располагается промотор (200 н.п.), к которому присоединяется РНК-полимераза II осуществляющая процесс транскрипции. Образующийся первичный транскрипт РНК состоит из ~1600 н.п. Во время сплайсинга РНК интроны, удаляются и оба конца РНК модифицируются.

Геном человека по размеру больше чем геном дрозофилы (см. табл. 4) и содержит больше интронов. Средний размер генов у человека вместе с интронами составляет 27 килобаз. Самый большой ген у человека кодирует белок дистрофин (рис. 27.).

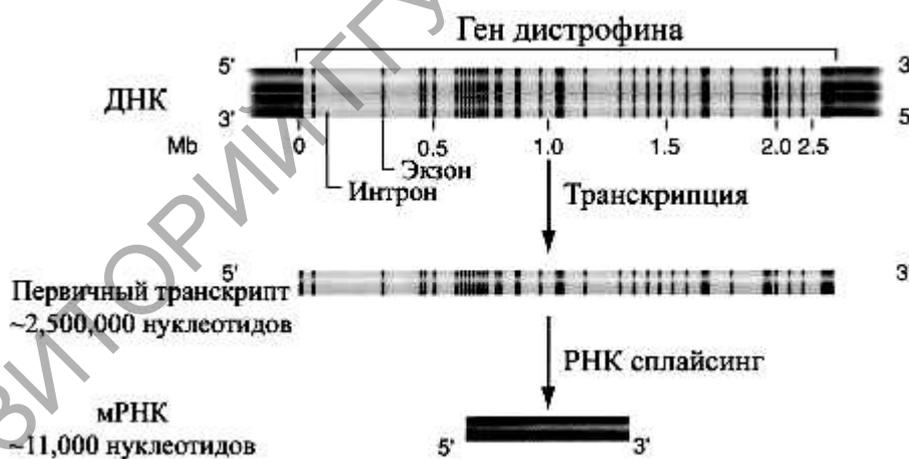


Рисунок 27 – РНК сплайсинг на примере человеческого гена дистрофина. Несмотря на то, что размер гена составляет 2500 килобаз, после процесса сплайсинга размер мРНК изменяется до 14 килобаз, так как более чем 80 интронов удаляются из первичного транскрипта.

Этот ген составляет 2,5 мегабазы и превосходит геномы многих бактерий. Единицы транскрипции в гене **дистрофина** разделены интронами. Мутации в этом гене вызывают развитие мышечной дис-

трофии. В ряде генов человека обнаружено 30, 40 и даже 50 интронов. В целом доля ДНК, кодирующая белки в геноме человека составляет только 5%. По крайней мере 50% генома приходится на транспозон подобные области ДНК представленные семейством *Alu* и *L1*-повторов.

### 5 Минимальный геном необходимый для жизни.

Какое минимальное количество генов необходимо для того, чтобы организм был жизнеспособным? Абсолютно точно на этот вопрос ответить пока нельзя, так как еще не все функции генов, обнаруженных в геномах, известны. Тем не менее, основываясь на информации, полученной для генов с известной функцией, можно предположить, какое минимальное число генов необходимо для выполнения основных клеточных функций.

Очевидно, что клетки должны содержать гены, кодирующие продукты, необходимые для репликации и репарации ДНК, для транскрипции и трансляции, транспорта белков и выполнения общих клеточных процессов, включая деление клеток и секрецию, а также для множества биохимических реакций, вовлеченных в клеточный метаболизм. В таблице 5 приведена итоговая информация о функциях генов трех видов бактерий.

Если сравнить число необходимых для жизнедеятельности генов у различных бактерий, то видно, что *E. coli* имеет 131 ген для метаболизма аминокислот, *H. influenza* – 68, а *M. genitalum* – только 1. Несмотря на то, что общее количество генов у *H. influenza* почти в 4 раза больше, чем у *M. genitalum*, физиологические способности у этих видов очень сходны.

**Таблица 5.** Функциональные классы генов в трех видах бактерий.

Функциональный класс	<i>E. coli</i>	<i>H. influenza</i>	<i>M. genitalum</i>
Гены, кодирующие белки	4288	1727	470
Репликация и репарация ДНК	115	87	32
Транскрипция	55	27	12
Трансляция	182	141	101
Регуляторные белки	178	64	7
Биосинтез аминокислот	131	68	1
Биосинтез нуклеиновых кислот	58	53	19
Обмен липидов	48	25	6
Энергетический обмен	243	112	31
Распознавание, транспорт белков	427	343	123

Большая часть генов *H. influenza* входит в категорию необходи-

ных для биосинтеза. Эта более сложная бактерия имеет 68 генов, необходимых для биосинтеза аминокислот, в то время как микоплазма – только 1 такой ген. Обладая очень низкой способностью к биосинтезу аминокислот, микоплазмы должны использовать ряд метаболитических продуктов клеток хозяина. В целом результаты проведенного сравнительного анализа двух микоплазм - *M. genitalum* и *M. pneumoniae* и некоторые эксперименты по мутагенезу у *M. genitalum* указывают на то, что необходимых для жизнедеятельности организма генов должно быть **не менее 250-350**.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

## ЛЕКЦИЯ 5 РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

1. Характеристика репликации. Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК.
2. Репликация кольцевых молекул ДНК.
3. Репликация теломерных концов ДНК.
4. Этапы биосинтеза ДНК на РНК-матрице. Репликация геномов ретровирусов.

### 1. Характеристика репликации. Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК.

**Репликация** – это сложный процесс копирования (удвоения) ДНК, который обеспечивается генами самой ДНК. Репликация играет важную роль в протекании репарации, рекомбинации и транспозиции. Даже существование вирусов было бы не возможно без удвоения их нуклеиновых кислот. От слаженности этого процесса в конечном итоге зависит продолжительность жизни всех организмов.

Прежде чем приступить к рассмотрению процесса репликации ДНК необходимо сформировать понятие репликона. Независимо от того, содержит клетка одну хромосому (как у прокариот) или много (эукариоты) за период времени, соответствующий одному клеточному делению, весь геном может быть прореплицирован только один раз. Единица, с помощью которой клетка контролирует отдельные акты репликации, получила название репликона. Каждый репликон в процессе клеточного деления активизируется один раз. Репликон должен обладать необходимыми для репликации контролируемыми структурными элементами. Такими элементами являются:

а) точка начала репликации Ori (origin), в которой инициируется процесс удвоения ДНК (нуклеотидная последовательность точки начала репликации отличается у разных организмов, но у всех это АТ-богатая и потому легкоплавкая последовательность);

б) точка окончания репликации (terminus), в которой процесс удвоения ДНК останавливается.

Т.о. репликон – участок молекулы ДНК от точки начала одной репликации до точки начала другой. В бактериальную хромосому входит один репликон. У эукариот их много.

В результате репликации НК образуются дочерние молекулы, нуклеотидные последовательности которых идентичны как между со-

бой, так и с материнской молекулой НК. Репликации может подвергаться как ДНК, так и РНК (у РНК-содержащих вирусов). В основе репликации лежит принцип комплементарности.

**Типы репликации.** В 1953г. Уотсон и Крик, сразу после создания модели ДНК, высказали предположение, что удвоение ДНК должно происходить путем разрыва водородных связей между двумя комплементарными цепями, и при этом каждая цепь является матрицей для синтеза новой дочерней цепи. При делении клетки надвое, в каждую половинку попадает ДНК, состоящая из 1 старой и 1 новой цепи. Такой механизм репликации называется **полуконсервативным**. Учеными было предложено на рассмотрение еще 2 других механизма репликации: **консервативный** и **дисперсионный** (рис. 1).

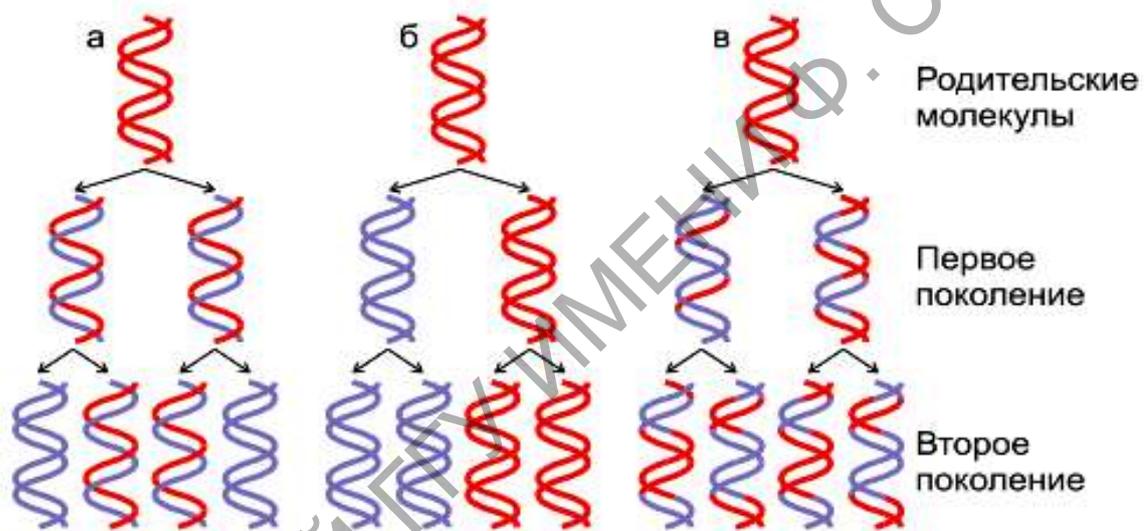


Рисунок 1 – Модели репликации ДНК: а – полуконсервативная, б – консервативная, дисперсионная. Родительские цепи изображены в виде красных лент, вновь синтезированные показаны синим цветом.

**Консервативный механизм** предполагал следующее: на одной из материнских цепей осуществляется синтез дочерней цепи, а образованная дочерняя цепь служит матрицей для синтеза еще одной дочерней цепи. Но после деления клетки в одну половинку попадает 2 старых цепи ДНК, а в другую – 2 новых. Этот механизм довольно случаен и почти не встречается в природе, т.к. невыгоден из-за возможного накопления мутаций в половине клеток популяции.

**Дисперсионный механизм** подразумевал возможность рекомбинаций. После такой репликации в дочерних клетках должны оказаться ДНК, состоящие из фрагментов старого и нового материала (у эукариот это происходит в результате кроссинговера, но не репликации).

В 1957 г. Мезелсон и Сталь экспериментально доказали наличие у *E.coli* полуконсервативного механизма репликации. Для прокариот и эукариот характерен полуконсервативный тип репликации. У вирусов встречаются все три типа репликации.

### **Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК.**

Репликация – высококоординированный процесс, который обслуживается большим количеством ферментов и белков (более 30). Изучены гены, кодирующие эти продукты. Они обозначаются: *dna A*, *dna B*, *dna C*, *dna D*, *dna E*, *dna I*, *dna L*, *dna M*, *dna N* и т.д. Кроме этих генов есть еще гены со специфическими названиями: *lig* (ген лигазы), *hcr* (ген хеликазы), *top* (гены топоизомераз) и другие. Рассмотрим основные белки и ферменты, принимающие участие в репликации.

**Белок-инициатор** – продукт гена *dna A*, узнаёт на ДНК точку начала репликации - *origin center (ori C)*.

**Топоизомеразы** снимают напряжения, возникающее в результате расплетения двойной спирали в ДНК, за счет разрыва и последующего воссоединения цепи ДНК.

**ДНК-хеликаза (геликаза)** – фермент, денатурирующий ДНК путем разрыва водородных связей между основаниями за счет энергии гидролиза АТФ. Для начала “работы” хеликазы требуется одноцепочечный участок ДНК, т.е. хеликаза не может начать плавление нативной ДНК без дефектов. В результате ее действия возникает «репликационная вилка» (Y), состоящая из двуцепочечного участка ДНК и двух одноцепочечных ветвей (рис. 2).

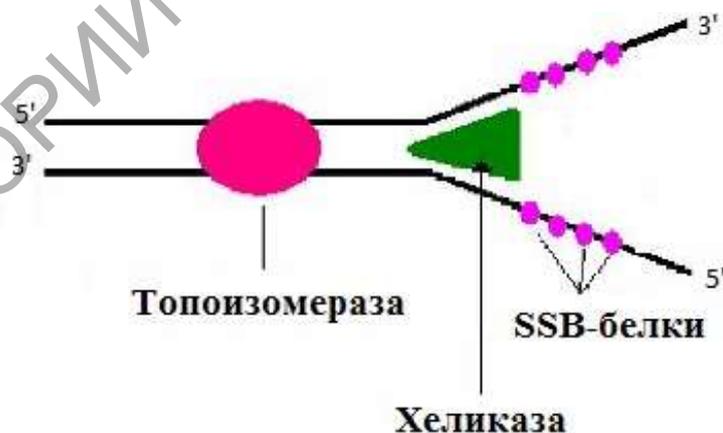


Рисунок 2 - Действие фермента хеликазы и SSB-белков.

**SSB-белки (single-strand DNA-binding proteins)** - белки, которые связываются с одноцепочечными ДНК, стабилизируют их и препятствуют образованию двойной спирали. Более 200 молекул этого белка присутствуют в каждой репликативной вилке (рис. 14).

**Праймаза** катализирует матричный синтез короткой РНК-затравки (праймера) в направлении  $5' \rightarrow 3'$ . Свободный 3'-конец праймера используется ДНК-полимеразой для инициации синтеза ДНК (рис. 3).

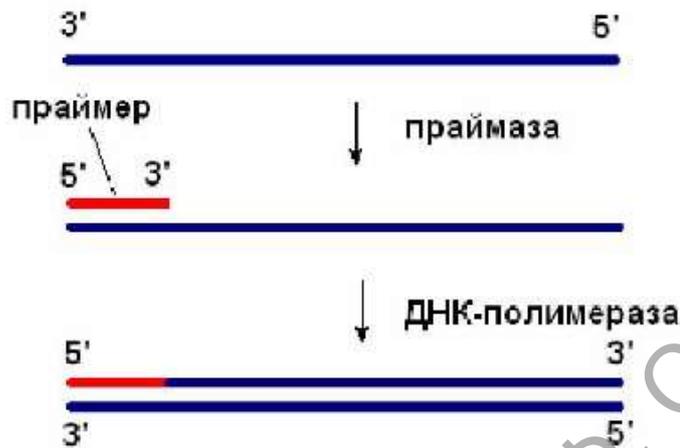


Рисунок 3 - Работа фермента праймазы.

**ДНК-полимеразы III** осуществляют синтез ДНК. Субстратом для этих ферментов являются дезокси-нуклеозидтрифосфаты (дНТФ). Уравнение реакции, катализируемой ДНК-полимеразами, в общем виде выглядит так:



ДНК-полимераза способна присоединять нуклеотиды только к 3'-ОН группе предыдущего нуклеотида и для синтеза новой цепи ей требуется затравка (праймер) со свободным 3'-концом (синтез новой цепи происходит в направлении от 5'-конца к 3'-концу). Нуклеотиды присоединяются к затравке в соответствии с принципом комплементарности, напротив аденина матричной цепи всегда будет встраиваться тимин, а напротив гуанина – цитозин. ДНК-полимеразы способны копировать любую цепь ДНК, т.е. они не специфичны к последовательности нуклеотидов матрицы. Скорость ДНК-полимеразной реакции колеблется в пределах от 50 нуклеотидов в секунду у эукариот до 500 нуклеотидов в секунду у прокариот.

Главной задачей ДНК-полимераз является снятие точной копии с матрицы, в связи с этим они проверяют комплементарность каждого нуклеотида дважды: перед включением его в состав растущей цепи и перед тем как включить следующий нуклеотид. Очередная фосфодиэфирная связь образуется, если последний нуклеотид комплементарен матрице. Если включен некомплементарный нуклеотид, то он удаля-

ется за счет 3' → 5'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы, и только после удаления некомплементарного нуклеотида ДНК-полимераза продолжит наращивать цепь ДНК. ДНК-полимераза удаляет некомплементарный нуклеотид и затем продолжает синтез ДНК.

**ДНК-полимераза I** на стадии элонгации осуществляет вырезание РНК-нуклеотидных праймеров и замену их на ДНК-овые последовательности. Этот фермент играет важную роль не только в репликации, но и в репарации.

**ДНК-полимераза II.** В клетке его приблизительно в 4 раза меньше, чем ДНК-полимеразы I (около 100 молекул). Этот фермент может дублировать функции ДНК-полимеразы I и так же играет роль в репарации.

**ДНК-лигаза** осуществляет «сшивание» соседних фрагментов ДНК, образуя межнуклеотидную (фосфодиэфирную) связь). Реакция сопряжена с гидролизом молекулы АТФ.

#### 4. Инициация репликации

Репликация ДНК иницируется в определенном месте – в точке начала репликации и может происходить в одном (рис. 4А) или двух направлениях (рис. 4Б).

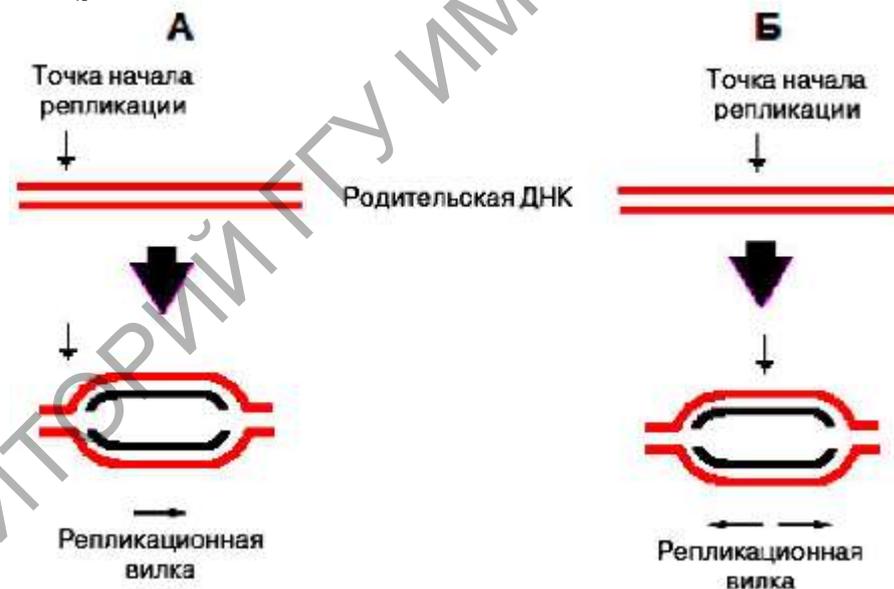


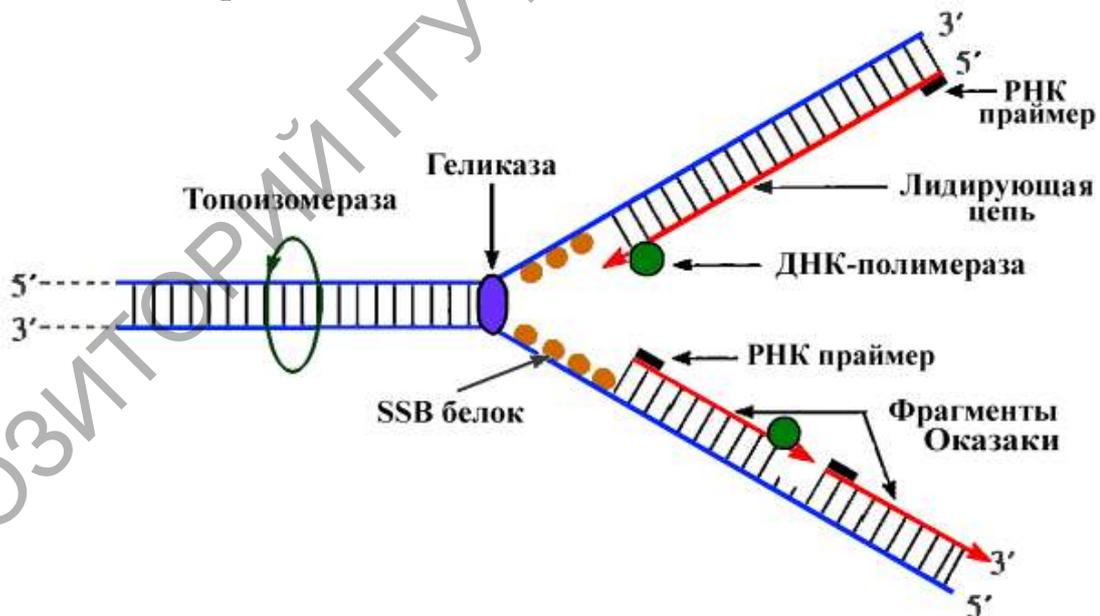
Рисунок 4 - Точка начала репликации.

Бактериальная хромосома имеет одну точку начала репликации, т.е. представляет собой единицу репликации, получившее название репликон, иначе говоря, бактериальная хромосома представлена одним репликоном. ДНК эукариот имеет множество точек начала репликации, т.е. она имеет полирепликонную организацию. Репликация ДНК эукариот продолжается до тех пор, пока репликативные вилки двух соседних точек начала репликации не сольются. Размеры репли-

конов и скорость движения репликативной вилки у эукариот значительно меньше, чем у прокариот.

Репликация начинается с проверки ДНК на целостность путем отрицательного суперскручивания с помощью топоизомеразы. Если в ДНК есть хоть 1 разрыв, суперскручивание не происходит и необходима репарация ДНК. Для перевода ДНК в релаксированное состояние (это важно для раскручивания), топоизомераза делает двуцепочечные разрывы в ДНК и распутывает петли. Далее белок-инициатор (dna A) прикрепляет богатую АТ-парами область ориджина к выросту ЦПМ. Топоизомераза делает одноцепочечный разрыв вблизи *ori* C, прикрепляется к 5'-концу разрыва, а 3'-конец начинает раскручиваться относительно интактной цепи и, с помощью хеликазы, которая разрывает водородные связи между цепочками, окончательно деспирализуется с образованиями репликативной вилки Корнберга.

Репликация начинается с образования РНК-праймеров (затравок, состоящих из 10-200 пар нуклеотидов РНК), к которым присоединяется реписома (ферменты и белки, обеспечивающие процесс репликации). Топоизомеразы раскручивают двойную цепочку ДНК, образовавшаяся структура, получившая название репликационной вилки, постепенно движется вдоль молекулы ДНК от ее стартовой точки до точки окончания (рис. 5).



**Рисунок 5 - Репликационная вилка Корнберга с указанием лидирующей и запаздывающей цепей вновь синтезированной ДНК.**

Движение ДНК-полимеразы связано с двумя процессами – считыванием информации и синтезом новой цепи, которые происходят в разных направлениях (считывание – в направлении  $3' \rightarrow 5'$ , а синтез новой цепи – в направлении  $5' \rightarrow 3'$ ). Т.к. ДНК-полимераза может

считывать информацию только в направлении  $3' \rightarrow 5'$ , то в каждой репликативной вилке она может постепенно и непрерывно строить лишь одну (*лидирующую*) новую цепь молекулы ДНК. Другая дочерняя цепь (*отстающая*) по мере расплетения материнской молекулы синтезируется отдельными короткими участками по 100-200 нуклеотидов (*фрагменты Оказаки*) под действием фермента ДНК-полимеразы, движущейся в противоположном направлении. Эти короткие участки вновь синтезируемой полинуклеотидной цепи одного репликона сшиваются ферментом лигазой. Такой принцип синтеза новых цепей ДНК называется прерывистым. Участки дочерних молекул ДНК, синтезированные в соседних репликонах, также сшиваются ферментом лигазой.

**Модель работы димерной полимеразы («модель тромбона»).**

Сейчас известно, что ключевые белки репликации тесно ассоциированы и формируют репликационную машину (реплисому) с определенным расположением цепей ДНК и ферментов. Отстающая цепь изгибается на  $180^\circ$  так, что ее ДНК-полимераза III комплексирует с ДНК-полимеразой III лидирующей цепи. Этот изгиб подводит  $3'$ -конец каждого уже синтезированного фрагмента Оказаки к участку, в котором начинается синтез нового фрагмента Оказаки. ДНК-полимераза III на отстающей цепи используется вновь и вновь, продвигаясь вместе с вилкой. Т.о., ДНК синтезируется одинаково эффективно на обеих матричных цепях (рис. 6).

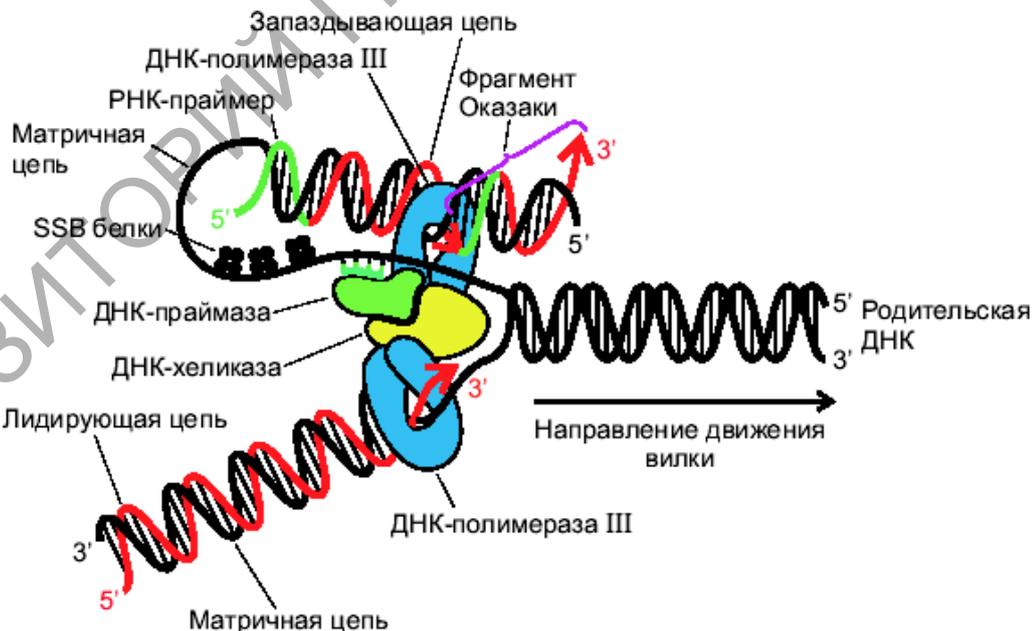


Рисунок 6 – Модель работы димерной полимеразы.

## 2. Репликация кольцевых молекул ДНК.

Кольцевые молекулы прокариот могут реплицироваться двумя путями. Синтез дочерних цепей по первому пути осуществляется с помощью механизма репликации типа  $\theta$ . Из точки *ori* направляются две репликационные вилки, что приводит к образованию структуры, похожей на греческую букву  $\theta$  (тета) (рис.7).

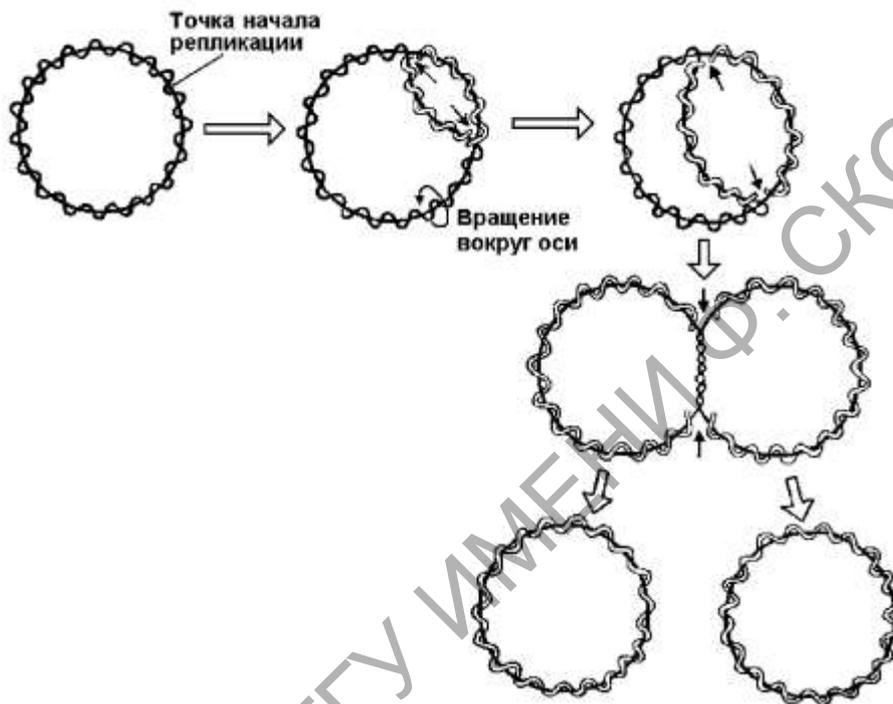


Рисунок 7 - Репликация типа  $\theta$  у прокариот.

Второй путь, по которому может осуществляться репликация кольцевых молекул ДНК, получил название «**катящегося кольца**» (репликация типа  $\sigma$ ) (рис. 8). Так образуется много новых молекул вирусных ДНК. Нуклеаза разрывает одну цепь и образовавшийся при этом свободный 3'-ОН конец наращивается с помощью ДНК-полимераз. Точка роста "скользит" по кольцу матричной цепи. 5'-конец отдалается от кольцевой молекулы и служит матрицей для синтеза второй цепи ДНК.

Синтез на кольцевой нити может идти на протяжении нескольких оборотов молекулы, в результате чего появляется линейная нить, содержащая несколько повторов одного и того же генома. Эта нить разрезается специфическими эндонуклеазами на равные длине генома куски, каждый из которых замыкается в кольцевую хромосому.

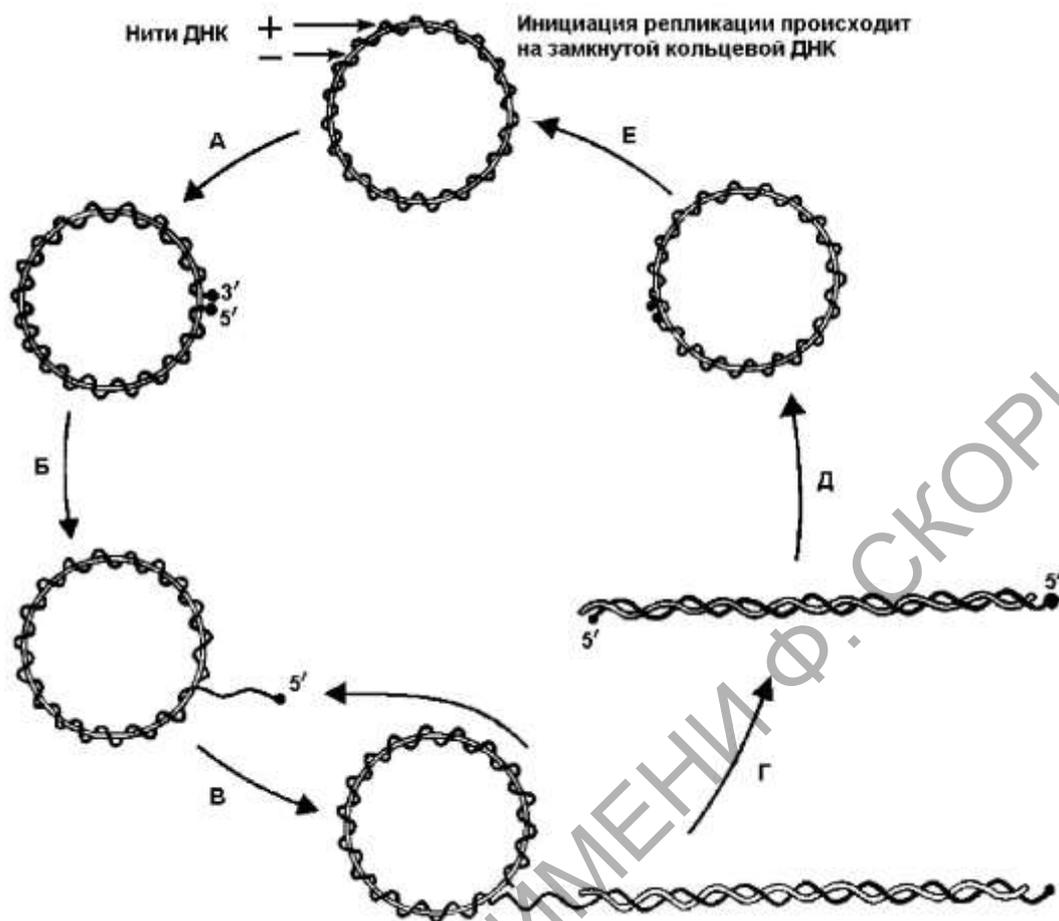


Рисунок 8 - Репликация типа «катящегося кольца» у прокариот.

### 3. Репликация теломерных концов ДНК.

Соматические клетки могут делиться ограниченное число раз, например, эмбриональные клетки могут делиться до 80 раз, клетки 70-летнего человека – только 20 – 30 раз. Способность клеток делиться ограниченное число раз носит название **лимита Хейфлика**. В ряде случаев клетки способны преодолеть лимит Хейфлика и начать делиться неограниченно. Это явление называется **иммортиализация клеток**.

Ограничение числа делений клеток определяется наличием особых структур на концах хромосом – **теломер**, состоящих из повторяющихся коротких последовательностей ДНК. У многих видов они представлены высококонсервативными повторами ТТАГГГ. ДНК теломер не кодирует белки. У человека размер теломер может составлять от 2000 до 20 000 п.н. В процессе развития организма размер теломер уменьшается, что связано с недорепликацией концов хромосом. Недорепликация концов хромосом определяется тем, что в про-

цессе репликации используется РНК-затравка и синтез ДНК протекает в направлении  $5' \rightarrow 3'$  (рис. 9).

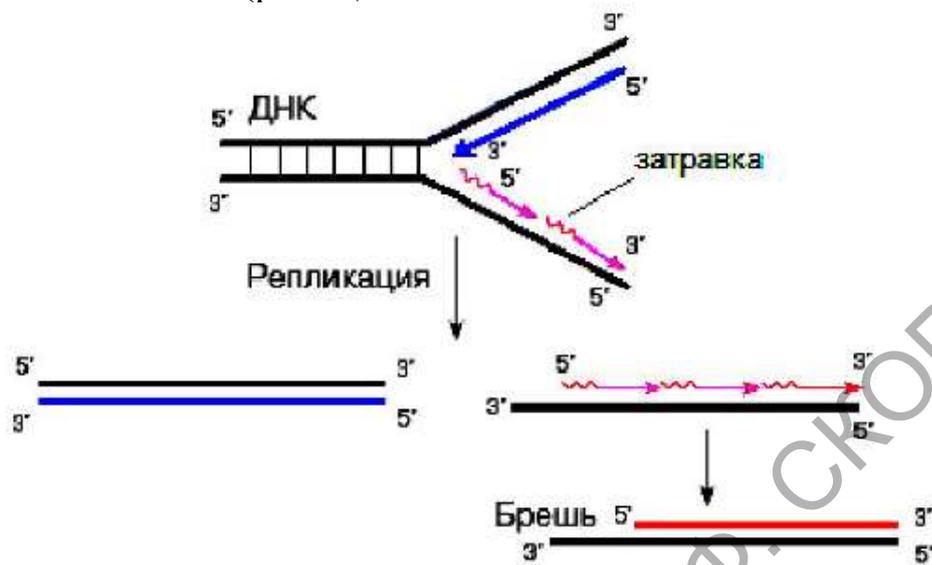


Рисунок 9 - Недорепликация хромосом.

В журнале «Наука» («Science») Джери Шей опубликовал статью об открытии фермента – **теломеразы**, способном производить удлинение недостающего фрагмента, т.е. синтезировать теломеры. Оказалось, что этот фермент работает постоянно в раковых клетках и обеспечивает их потенциальное бессмертие. Также он был обнаружен в половых и стволовых клетках, обеспечивающих обновление клеток крови. В соматических клетках теломераза не работает, поэтому с каждой репликацией теломеры уменьшаются приблизительно на 50 нуклеотидов.

Теломераза является РНК-содержащим ферментом. В составе РНК-компонента теломеразы имеется тринуклеотид, комплементарный соответствующему участку повторяющейся последовательности теломеры (рис. 10). В результате их комплементарного взаимодействия образуется матричная область, которую использует фермент для синтеза фрагмента теломеры. После завершения синтеза этого фрагмента происходит перемещение (транслокация РНК-компонента теломеразы в направлении  $3'$ -конца, синтезируемой цепи. Теломераза вновь способна продолжить синтез ДНК. Этот циклический процесс повторяется многократно до тех пор, пока не завершится синтез соответствующей цепи ДНК. После того как теломераза завершит синтез цепи ДНК в направлении  $3'$ -конца, при участии ДНК-полимеразы и других белков происходит синтез комплементарной ей цепи. Так происходит образование теломер.

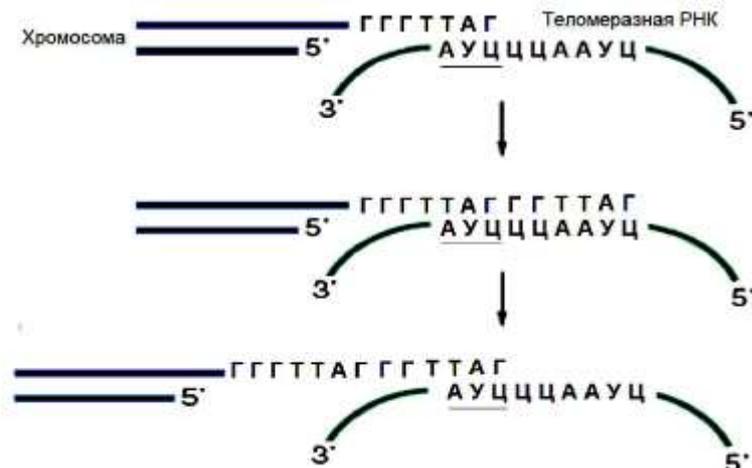


Рисунок 10 - Механизм действия теломеразы.

Таким образом, воспроизведение генетической информации является сложнейшим биологическим процессом, в котором участвуют многочисленные факторы.

#### 4. Этапы биосинтеза ДНК на РНК-матрице. Репликация генов ретровирусов.

Долгое время считалось, что передача генетической информации в обратном направлении невозможна. В 1975 г. Дульбеко, Тимин и Балтимор описали явление обратной транскрипции, т.е. передачи генетической информации от и-РНК к ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы (ревертазы). Ревертаза была открыта у РНК-содержащих вирусов в 1970 г. Тиминим и Музатани. Наличие ревертазы в нормальных клетках свидетельствует о возможности передачи информации от РНК к ДНК. Было установлено, что на определенных стадиях эмбриогенеза в клетках амфибий резко возрастает число генов, кодирующих рРНК (амплификация генов). При этом происходит увеличение числа копий генов рРНК методов обратной транскрипции.

Обратная транскриптаза (ревертаза или РНК-зависимая ДНК-полимераза) — фермент, катализирующий синтез ДНК на матрице РНК в процессе, называемом обратной транскрипцией.

Называется так потому, что большинство процессов транскрипции в живых организмах происходит в другом направлении, а именно, с молекулы ДНК синтезируется РНК-транскрипт.

Обратная транскрипция необходима, в частности, для осуществления жизненного цикла ретровирусов, например, вирусов иммунодефицита человека и Т-клеточной лимфомы человека типов 1 и 2. После попадания вирусной РНК в клетку обратная транскриптаза, содержащаяся в вирусных частицах, синтезирует комплементарную ей

ДНКф, а затем на этой цепи ДНК, как на матрице, достраивает вторую цепь.

Ретротранспозоны эукариот кодируют обратную транскриптазу, которая используется ими для встраивания в геном хозяина подобно тому, как это происходит у вирусов. Обратной транскриптазой является также теломераза.

В генетической инженерии обратную транскриптазу используют для получения кДНК — копии эукариотического гена, не содержащей интронов. Для этого из организма выделяют зрелую мРНК, кодирующую соответствующий генный продукт (белок, РНК) и проводят с ней в качестве матрицы обратную транскрипцию. Полученную кДНК можно трансформировать в клетки бактерий для получения трансгенного продукта.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОБЫ

## ЛЕКЦИЯ 6 ТРАНСКРИПЦИЯ ДНК

1. Молекулярные механизмы транскрипции.
2. Контроль экспрессии генов прокариот. Позитивная и негативная регуляция оперона. Регуляция транскрипции у эукариот.
3. Структура хроматина как специфический регулятор экспрессии генов эукариот.

### 1. Молекулярные механизмы транскрипции.

#### Открытие процесса транскрипции

Э.Волкин и Л.Астрахан в 1956 г. обнаружили, что при заражении бактериальных клеток бактериофагом T2, последние начинают синтезировать новые типы РНК, сходные по нуклеотидному составу с ДНК бактериофага.

С. Бреннер, Ф. Жакоб и М. Мезельсон в 1961 г. поставили эксперимент, показывающий, что после инфицирования бактерий *E. coli* бактериофагом T2 происходит синтез большого количества нового типа РНК, которая была названа матричной или информационной.

РНК-полимераза у бактерий была открыта независимо Сэмом Вайссом и Джерардом Хурвицем в 1960 г.

*Транскрипция* – синтез РНК на матрице ДНК, протекающий в соответствии с принципом комплементарности. В результате транскрипции образуется РНК, комплементарная одной из цепей (матричной) ДНК (рис. 38).

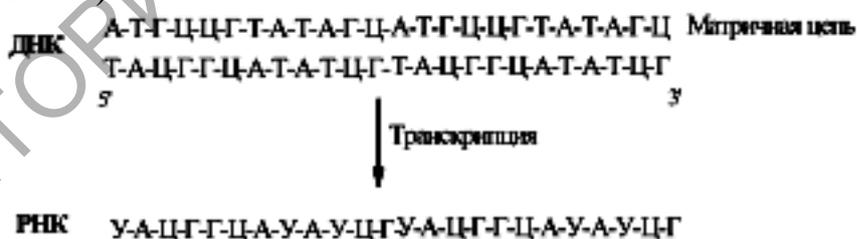


Рисунок 38 - Схема транскрипции.

Катализирует матричный синтез РНК фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза, осуществляя копирование не всей, а только части матричной цепи ДНК. Транскрибируемый фрагмент ДНК ограничен со стороны 3'-конца промотором – участком, с которым связывается РНК-полимераза и затем начинает синтез, а со стороны 5'-конца – терминатором – участком, в котором заканчивается синтез РНК.

Последовательность ДНК, ограниченная промотором и терми-

натором, представляет собой единицу транскрипции – **транскриптон**.

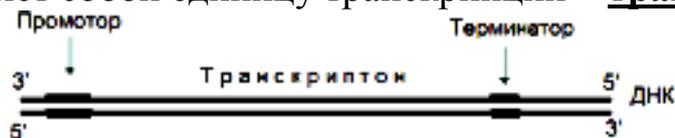


Рисунок 39 - Структура транскриптона.

Транскриптон прокариот называют также опероном. Транскриптон эукариот, как правило, содержит только один ген, в то время как в составе оперона прокариот присутствуют обычно несколько генов.

В процессе транскрипции выделяют три стадии: инициацию, элонгацию и терминацию (рис. 40).

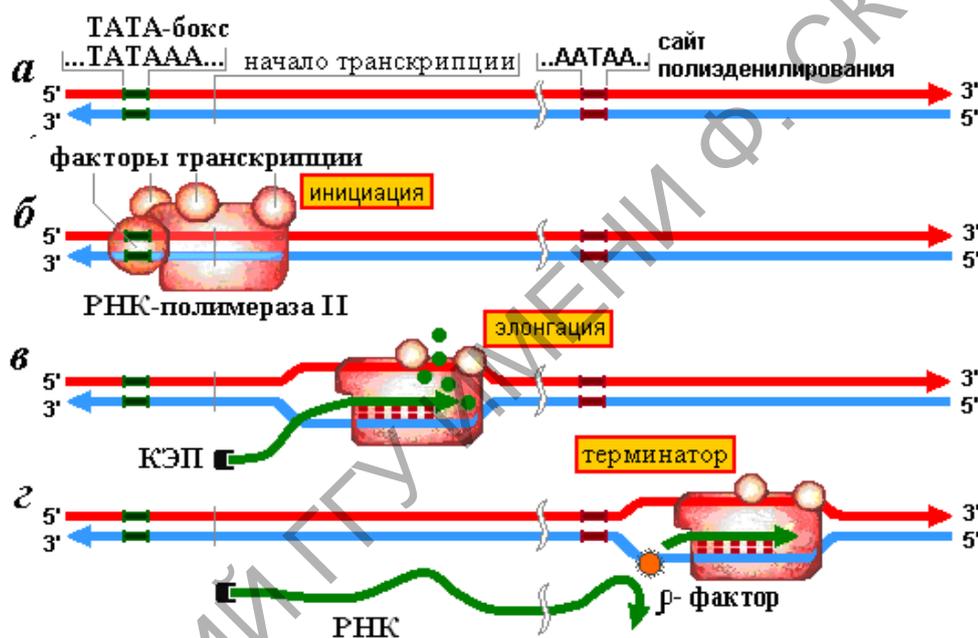


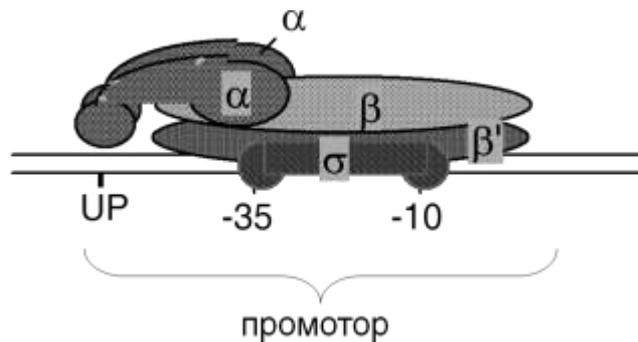
Рисунок 40 – Схематическое изображение этапов транскрипции.

На стадии инициации РНК-полимераза взаимодействует с промотором. В этом участке происходит раскручивание и плавление ДНК и РНК-полимераза начинает синтез молекулы РНК. После образование первых фосфодиэфирных мостиков между рибонуклеотидами стадия инициации заканчивается.

В процессе следующей стадии – элонгации – происходит удлинение цепи РНК. При этом новосинтезированная цепь РНК образует короткие отрезки гибридной двойной спирали ДНК-РНК, которые необходимы для правильного копирования матричной цепи ДНК.

Как только РНК-полимераза приблизится к терминатору, начинается последняя стадия – терминация, в результате которой завершается транскрипция и освобождается вновь синтезированная молекула РНК – транскрипта.

**Строение РНК-полимеразы прокариот.** Прокариоты содержат одну РНК-полимеразу, состоящую из нескольких субъединиц, обозначаемых буквами греческого алфавита  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  и  $\sigma$  (рис. 41).



**Рисунок 41 – РНК-полимераза прокариот.**

РНК-полимераза может существовать в двух формах – в форме холофермента, его субъединичный состав выражается формулой  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ , и кор-фермента –  $\alpha_2\beta\beta'$ . Только холофермент может инициировать синтез РНК. После инициации транскрипции  $\sigma$ -субъединица отделяется и элонгацию осуществляет корфермент. Таким образом,  $\sigma$ -субъединица, или ее еще называют  $\sigma$ -фактор, необходима для узнавания промотора.  $\beta$ -субъединица участвует в связывании НТФ,  $\beta'$ -субъединица взаимодействует с ДНК, комплекс  $\alpha_2\beta'$  специфически связывается с промоторными нуклеотидными последовательностями. При взаимодействии с ДНК РНК-полимераза «закрывает» участок размером 60 п.н.

В клетке *E. coli* присутствуют несколько  $\sigma$ -факторов, они ответственны за узнавание РНК-полимеразой различных промоторов. Как правило  $\sigma$ -факторы узнают блоки, отстоящие от точки начала транскрипции приблизительно на 10 и 35 нуклеотидов. Эти блоки имеют консервативные (общие для всех в пределах одной группы промоторов) нуклеотидные последовательности (рис. 42).



**Рисунок 42 – Организация промотора.**

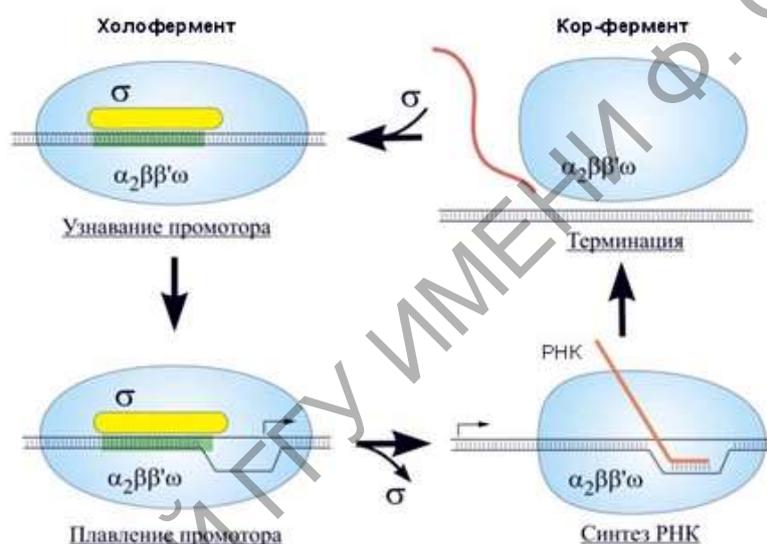
Номером +1 обозначается нуклеотид матричной цепи, с которого начинается транскрипция. Нуклеотиды, стоящие перед ним, имеют отрицательные номера, после него – положительные. Последовательность ТАТААТ называется ТАТА-блоком или Прибнов-блоком. По-

следовательность ТТГАЦА называется блоком -35. Различные б-факторы отвечают за узнавание различных групп промоторов и обеспечивают транскрипцию определенных генов (табл. 6).

**Таблица 6.** Последовательности, узнаваемые сигма-факторами.

σ-факторы <i>E. coli</i>	Последовательность -35	Последовательность -10
σ70	TTGACA	TATAAT
σ32	TCTC-CCCTTGAA	CCCCAT-TA
σ54	(-24)CTGG-A	(-12)TTGCA

Инициация транскрипции включает образование комплекса РНК-полимеразы (холофермент)-ДНК, после чего происходит синтез коротких олигорибонуклеотидов (рис. 43).



**Рисунок 43 – Схема транскрипционного цикла прокариот.**

После того, как синтезируется фрагмент РНК более 9 нуклеотидов, б-фактор холофермента необратимо диссоциирует и транскрипция вступает в стадию элонгации. Элонгацию осуществляет кор-фермент – α<sub>2</sub>ββ'.

В процессе элонгации транскрипции образуется дуплекс РНК-ДНК, размер которого составляет около 12 пар нуклеотидов.

Кор-фермент способен синтезировать РНК со скоростью около 40 нуклеотидов в секунду.

При достижении терминатора кор-фермент завершает синтез РНК. У прокариот существует два типа терминаторов: ро-зависимые и ро-независимые. На ро-зависимых терминаторах терминация осуществляется в присутствии белкового ро-фактора.

Такая терминация носит название ро-зависимой терминации. Терминация транскрипции на независимых от ро-фактора терминато-

рах называется ро-независимой терминацией. Ро-независимая терминация обеспечивается образованием шпильки на РНК в процессе транскрипции и следующей за ней олигоуридиловой последовательностью (рис. 44).

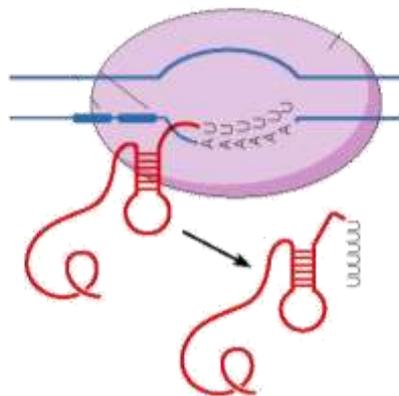


Рисунок 44 – Ро-независимая терминация транскрипции.

Шпилька приводит к паузе в транскрипции, а олигоуридил-олигоадениловый дуплекс, как наименее стабильный, диссоциирует во время паузы.

В случае ро-зависимой терминации на синтезируемой РНК находится участок, с которым взаимодействует ро-фактор (рис. 45).

Ро-фактор является НТФазой и способен использовать энергию гидролиза НТФ для движения по молекуле РНК от места посадки, расположенного в области 5'-конца РНК, в сторону ее 3'-конца. Как только ро-фактор «догонит» работающую РНК-полимеразу, происходит терминация транскрипции.

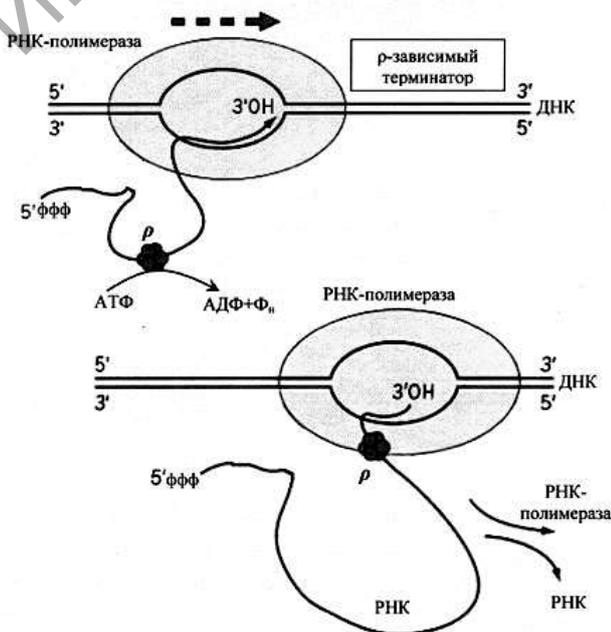


Рисунок 45 – Ро-зависимая терминация транскрипции.

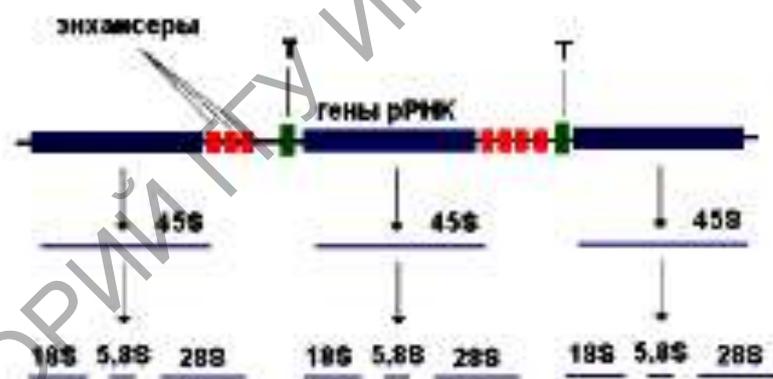
**Строение РНК-полимераз эукариот.** В клетках эукариот синтез РНК осуществляют три ядерных РНК-полимеразы:

- а) РНК-полимераза I транскрибирует гены рРНК – 18S, 28S и 5,8S;
- б) РНК-полимераза II транскрибирует гены иРНК; 56
- с) РНК-полимераза III транскрибирует гены тРНК, 5S рРНК и мяРНК.

РНК-полимеразы эукариот в отличие от РНК-полимераз прокариот не способны самостоятельно инициировать синтез РНК. Только при наличии особых белков – факторов транскрипции – они приобретают способность осуществлять данный процесс. Кроме ядерных РНК-полимераз у эукариот в митохондриях и хлоропластах присутствуют другие РНК-полимеразы.

**РНК-полимераза I** эукариот является большим ферментом, состоящим не менее чем, из 11 субъединиц, и транскрибирующим гены рРНК. Гены рРНК представлены в геноме клетки большим числом копий и кодируют три наиболее крупных рРНК – 18S, 5,8 S и 28S.

Гены рРНК расположены в виде серии тандемных повторов, отделенных друг от друга спейсером (рис. 46).



**Рисунок 46 – Строение гена рРНК.**

В конце спейсера находится сайт терминации (T), он же отвечает и за реинициацию синтеза нового транскрипта. После освобождения транскрипта в сайте терминации РНК-полимераза I остается связанной с ДНК, и затем при участии белкового фактора начинает синтез нового транскрипта. В спейсере имеются энхансеры (40 – 60 п.н.), активирующие транскрипцию в десятки раз. Степень активации пропорциональна числу энхансеров. Рибосомные гены транскрибируются в ядрышках в виде единого 45S-РНК транскрипта (13000 нуклеотидов). После синтеза 45S-РНК расщепляется с образованием 28S-РНК (около 5000 нуклеотидов), 18S-РНК (около 2000 нуклеотидов) и 5,8S-

рНК (около 160 нуклеотидов). Транскрипция генов рНК соответствует 50 – 70 % от общего объема клеточной транскрипции. У человека гаплоидные клетки содержат около 200 генов рНК, которые распределены в виде небольших кластеров по пяти хромосомам. 5S рНК кодируется другими генами и транскрибируется рНК-полимеразой III.

**рНК-полимераза II** ответственна за синтез ирНК и состоит из более, чем 10 субъединиц. Тем не менее, она не в состоянии самостоятельно осуществлять транскрипцию. Для ее работы требуется дополнительно десятки белковых молекул, так называемых факторов транскрипции.

В узнаваемом рНК-полимеразой II промоторе в пределах 100-200 п.н. перед стартом транскрипции обнаружены канонические нуклеотидные последовательности: ТАТА, СААТ, GC -блоки и др. В различных промоторах могут присутствовать разные блоки, расположенные в различном порядке относительно друг друга и на разных расстояниях от точки начала транскрипции. Неодинаковая структура промоторов обуславливает различия в экспрессии генов (рис. 47).



Рисунок 47 – Условная схема расположения нуклеотидных последовательностей в промоторах для рНК-полимеразы II.

**рНК-полимераза III** транскрибирует гены 5S рНК, трНК и нескольких мярНК. Эти три класса генов используют свои собственные классы промоторов. Промоторы, узнаваемые рНК-полимеразой III, находятся внутри генов трНК и 5S рНК. В случае генов трНК промоторы состоят из двух блоков: 1-й блок начинается через 8 – 30 п.н. после точки начала транскрипции и представлен в усредненном виде последовательностью TGGC<sub>n</sub>NAGTGG, 2-й блок находится на расстоянии +51...+72 и его усредненная последовательность – GGTTCGAN<sub>n</sub>CC (N – любой нуклеотид).

Что касается генов, кодирующих мярНК, то их промоторы расположены перед точкой начала транскрипции. У большинства генов этого класса промоторы состоят из ТАТА-блока с центром в положении -30 и из второго блока с центром в положении -60.

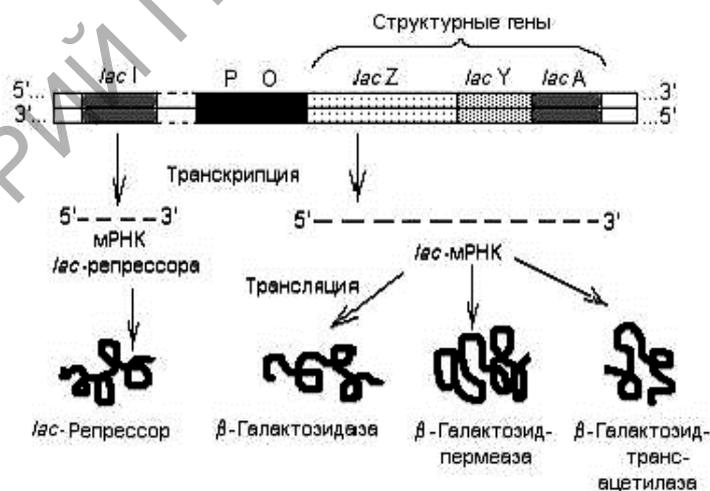
## 2. Контроль экспрессии генов прокариот. Позитивная и негативная регуляция оперона. Регуляция транскрипции у эукариот.

Среди нескольких уровней регуляции экспрессии генов наиболее существенной и часто используемой является регуляция синтеза ферментов, которая осуществляется на уровне транскрипции. Суть такого типа регуляции сводится к ускорению или замедлению процессов транскрипции определенных генов, что в конечном итоге отражается на скорости синтеза их продуктов. У **прокариот** различают позитивную и негативную регуляцию транскрипции.

Негативная регуляция предусматривает торможение инициации транскрипции за счет связывания с операторной областью белков-репрессоров; позитивная регуляция — наоборот, охватывает события «включения» транскрипции, которые также обуславливаются присоединением к **оператору** специфических белков (в данном случае их называют **активаторами**).

*Схема негативной регуляции транскрипции у прокариот на примере лактозного оперона.*

Лактозный оперон *E.coli* содержит регуляторную область (промотор и оператор) и три структурных гена: *lacZ* (кодирует структуру б-галактозидазы), *lacY* (определяет структуру б-галактозидпермеазы) и *lacA* (структура б-галактозидтранс-ацетилазы) (рис. 48).



**Рисунок 48 – Лактозный оперон *E. coli* (*lac*) и тесно сцепленный с ним ген *lac*-репрессора (*lac I*): P – промотор, O – оператор.**

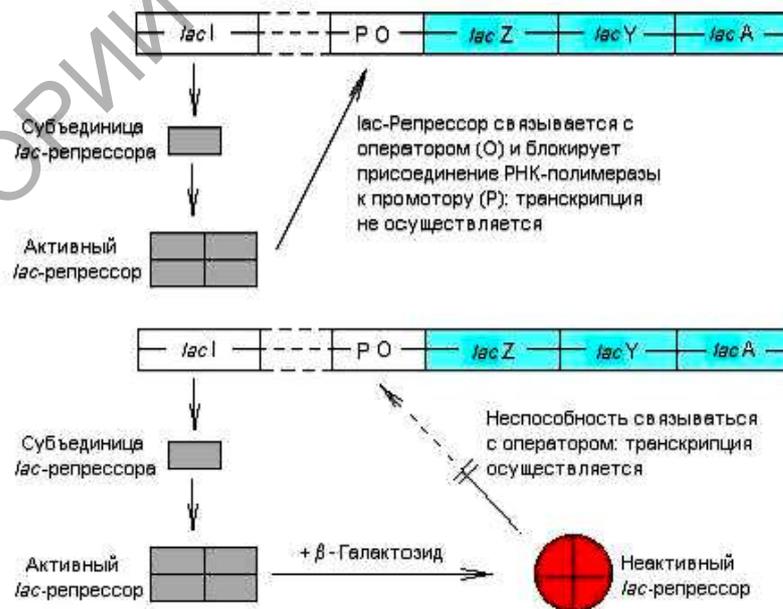
Названные ферменты обуславливают перенос в клетку дисахарида лактозы и расщепление ее на глюкозу и галактозу. Транскрипция структурных генов лактозного оперона осуществляется согласованно: гены *lacZ*, *lacY* и *lacA* транскрибируются в одну полицистронную

мРНК, которая транслируется с образованием почти одинаковых количеств каждого из ферментных белков. Недалеко от лактозного оперона на хромосоме *E. coli* располагается ген I, кодирующий структуру **белка-репрессора**. Этот белок в свободном состоянии имеет сродство к операторной области *lac*-оперона.

Когда клетки кишечной палочки выращиваются на среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода, они содержат очень мало белков — продуктов структурных генов лактозного оперона: примерно по 10 молекул на клетку. В присутствии лактозы и других β-галактозидов концентрация этих белков возрастает до 10 000 и более молекул на клетку. В этом случае лактоза (β-галактозиды) служит **индуктором** синтеза названных ферментов, и это означает, что соответствующий оперон регулируется по типу индукции, т. е. кодируемые им ферменты синтезируются только в присутствии индуктора.

Ген-регулятор, находящийся обычно на некотором расстоянии от оперона, постоянно активен, и на основе его информации синтезируется особый белок-репрессор (рис. 49). Последний способен блокировать ген-оператор, вступая с ним в химическое взаимодействие, и тогда считывание информации со структурных генов не происходит, т.е. оперон «не работает».

Если в клетку поступает индуктор (вещество, которое расщепляется под действием ферментов, закодированных в данном опероне), то он связывает белок-репрессор, освобождая ген-оператор.



**Рисунок 49 – Схема негативной регуляции транскрипции на примере лактозного оперона.**

РНК-полимераза разрывает связи между двумя цепочками ДНК, начиная с промотора, и по принципу комплементарности генетическая информация (порядок нуклеотидов) с кодирующей цепочки структурных генов переписывается на и-РНК – происходит *транскрипция*. Затем иРНК, поступает в рибосомы, где синтезируются ферменты, разлагающие индуктор. Когда последние молекулы индуктора будут разрушены, освобождается белок-репрессор, который снова блокирует ген-оператор. Работа оперона прекращается, а при поступлении нового индуктора возобновляется.

Для каждого оперона имеется свой специфический индуктор (корепрессор). Например, для лактозного оперона индуктором является лактоза.

В случае *репрессии* белок, кодируемый геном-регулятором приобретает способность блокировать ген-оператор только в соединении с корепрессором (оперон перестает «работать») (рис. 50). В опероне синтеза триптофана у *E. coli* имеется 5 цистронов, которые кодируют ферменты последовательной цепи реакций синтеза триптофана. В норме оперон включен. Белок - репрессор неактивен (в форме апо-репрессора), он не способен садиться на оператор. Клетке нужно N молекул триптофана. N+1-ая молекула взаимодействует с апо-репрессором. Он меняет конформацию, садится на оператор и синтез РНК прекращается.

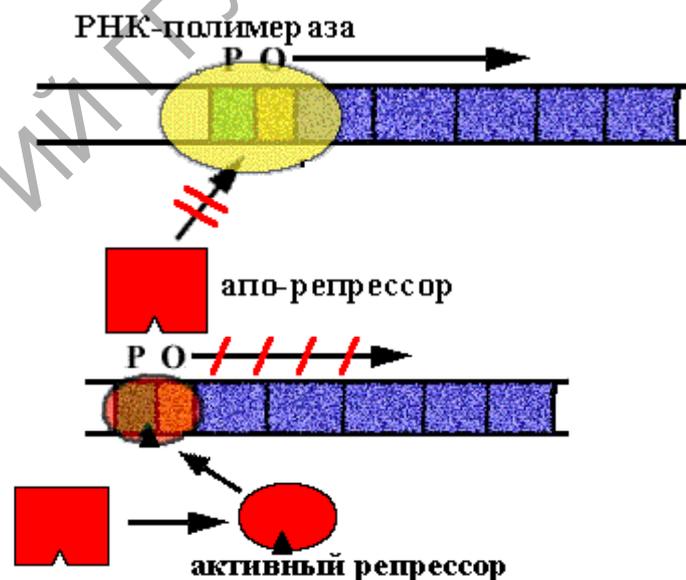


Рисунок 50 – Схема негативной репрессии на примере триптофанового оперона.

Особую роль в регуляции скорости транскрипции у *эукариот* играют полинуклеотидные последовательности – энхансеры и сай-

ленсеры. С энхансерами взаимодействуют белки-активаторы, которые, контактируя с РНК-полимеразой, активируют ее, в результате транскрипция генов усиливается. С сайленсерами же взаимодействуют белки-ингибиторы, оказывающие тормозящее действие на активность РНК-полимеразы и снижающие скорость транскрипции (рис. 51).

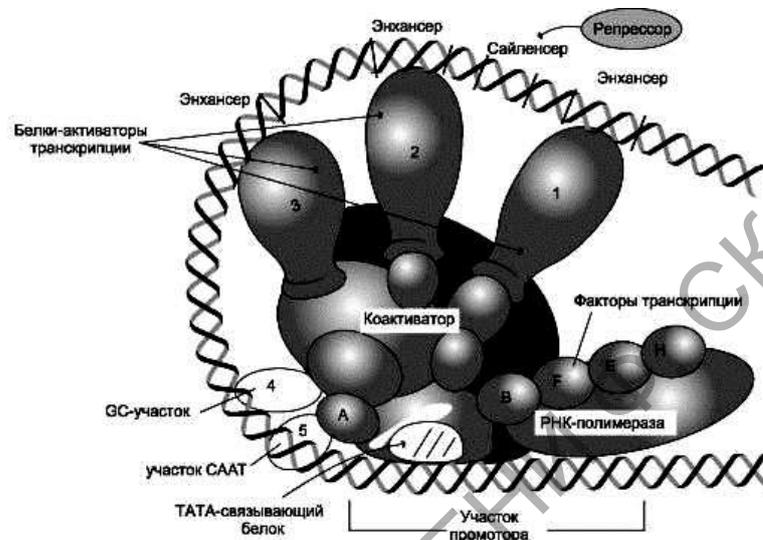


Рисунок 51 – Регуляция транскрипции у эукариот.

Энхансеры могут занимать различное положение относительно гена. Чаще они располагаются перед геном за несколько сот и даже за несколько тысяч п.н. В то же время энхансеры обнаружены в интронах. Иногда они находятся за геном. Свойствами энхансера могут обладать и кодирующие последовательности. В некоторых случаях интенсивность транскрипции гена может контролироваться несколькими энхансерами. Граница энхансера бывает размыта – удаление нуклеотидных последовательностей постепенно снижает его активность. Однако энхансеры могут содержать блоки, мутации в которых резко снижают их активность. Энхансеры можно переносить от одного гена к другому. Энхансеры в зависимости от регуляторного фактора могут вести себя как сайленсеры. Организация сайленсеров имеют много общего с организацией энхансеров.

#### 4. Структура хроматина как специфический регулятор экспрессии генов эукариот.

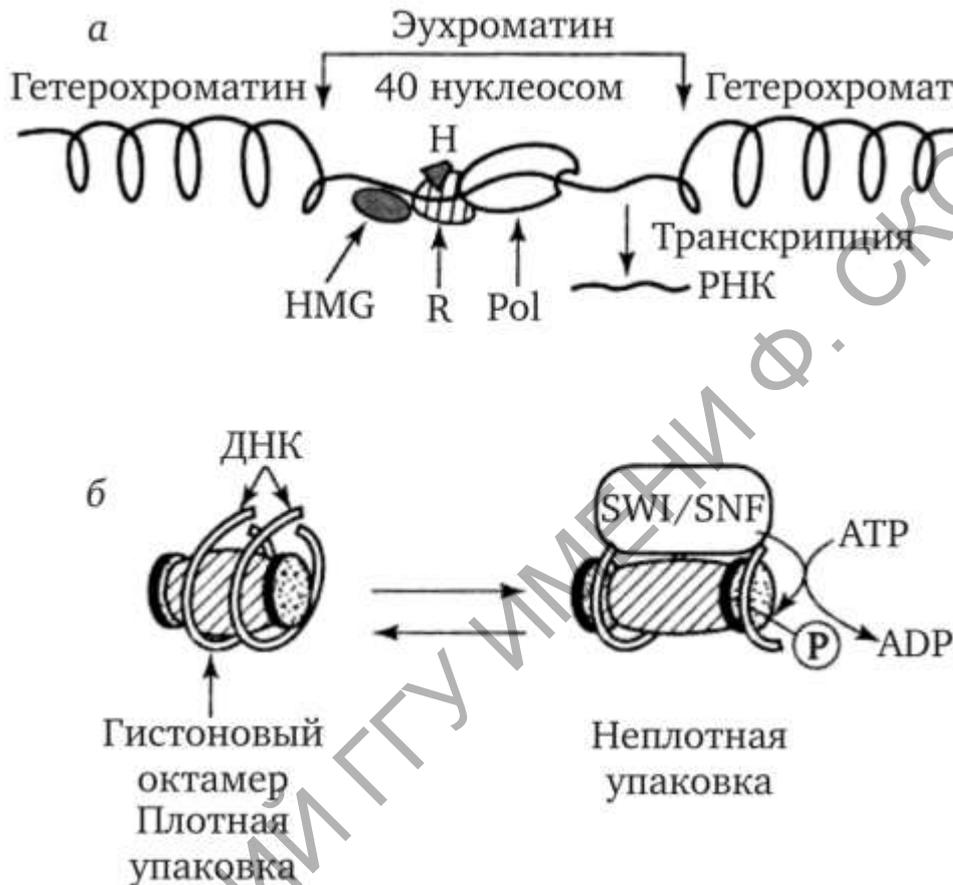
На регуляцию транскрипции у эукариот большое влияние оказывает упаковка ДНК в составе хроматина – белково-нуклеинового комплекса, в состоянии которого постоянно пребывает ДНК высших организмов. Хроматин представляет собой комплекс ДНК с белками

(гистонами и негистоновыми белками), который обеспечивает компактную упаковку гигантских, достигающих длины несколько метров, молекул ДНК эукариот в ядрах их клеток. Линейный четырехбуквенный генетический код, «словами» в котором являются тройки нуклеотидов (кодоны), позволяет хранить огромную информацию в малом объеме. Вся генетическая информация, содержащаяся в гаплоидном геноме человека, закодированная в 3-10<sup>9</sup> н. п., теоретически может быть упакована в кубик с ребром – 1,5 мкм. Различают плотно организованный (конденсированный) хроматин – гетерохроматин, и менее компактный эухроматин, с большей активностью транскрипции.

В составе хроматина присутствуют пять белков-гистонов, называемых H1, H2A, H2B, H3 и H4. Гистоны представляют собой небольшие белки с молекулярной массой от 11,3 кДа (H4) до 23 кДа (H1) с высоким содержанием основных аминокислот (Lys и Arg), благодаря чему они электростатически взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК.

В изображениях, полученных методом электронной микроскопии, хроматин напоминает нитку бус, в которой каждая бусинка представляет собой октамер гистонов (включает по две молекулы гистонов H2A, H2B, H3 и H4), называемый нуклеосомным кором (см. лекцию 2). Таким образом, гистоны помогают ДНК организоваться в структурные единицы, которые называются нуклеосомами. Вокруг октамера коровых гистонов обвивается участок спирали ДНК длиной 145 н. п., совершая 13/4 оборота и образуя сверхспираль. Молекулы гистона H1 не входят в состав нуклеосомного кора; они соединяют между собой отдельные октамеры, контактируя с линкерной ДНК, расположенной между нуклеосомными корами. Центральная глобулярная часть гистона H1 присоединяется к поверхности нуклеосомного кора, а N- и C-концевые участки образуют вытянутые области («плечи»), которые взаимодействуют с линкерной ДНК и с соседней нуклеосомой. Субнуклеосомные частицы, содержащие нуклеосомный кор, гистон H1 и 168 н. п. ДНК, получили название хроматосомы. Цепочка нуклеосом («нитка бус»), имеющая диаметр —11 нм, может конденсироваться с образованием фибриллы толщиной 30 нм (рис. 9.21), в которой наблюдаются промежутки, содержащие неплотно упакованную ДНК. В этих местах, вероятно, к ДНК присоединяются негистоновые белки хроматина, которые в последнее время относят к группе сайт-специфических ДНК-связывающих белков, узнающих особые последовательности в ДНК. Среди негистоновых белков вы-

деляют так называемые белки высокоподвижной (при электрофорезе) группы (HMG-белки). Известно, что некоторые из них (HMG-14 и HMG-17) присоединяются к ДНК в тех участках, где идет активная транскрипция генов. По-видимому, присоединение этих белков предшествует и способствует связыванию гормон-рецепторных комплексов с ДНК, что приводит к активации транскрипции (рис. 52).



**Рисунок 52 – Деконденсация хроматина в зоне активной транскрипции:**  
**а** – белки, связанные с ДНК в области эухроматина; **б** – изменение степени (прочности) связывания гистонов с ДНК по АТФ-зависимому механизму; R – рецептор стероидного гормона; Н – стероидный гормон; Pol – РНК-полимеразный комплекс; SWI/SNF – белковый комплекс, фосфорилирующий гистоны.

В составе хроматина гены эукариот включены в петельные домены различного размера (длиной от 20 до 200 тыс. н. п.). Эти петли представляют собой функционально независимые домены, содержащие один или несколько генов. Петли отделены друг от друга особыми последовательностями – инсуляторами (от англ. insulate – изолировать), с которыми взаимодействуют особые узнающие их белки. Инсуляторы препятствуют влиянию регуляторных последовательностей одной петли на экспрессию генов другой петли (домена) и спо-

способствуют целенаправленному воздействию энхансеров на транскрипцию генов определенного домена. Некоторые подвижные генетические элементы содержат в себе нуклеотидные последовательности инсуляторов, и их внедрение в определенные участки хроматина влияет на экспрессию генов. Перемещение таких подвижных элементов может изменять границы доменов, экспрессия которых контролируется определенным энхансером, а внедрение между промотором и оператором может вообще блокировать транскрипцию.

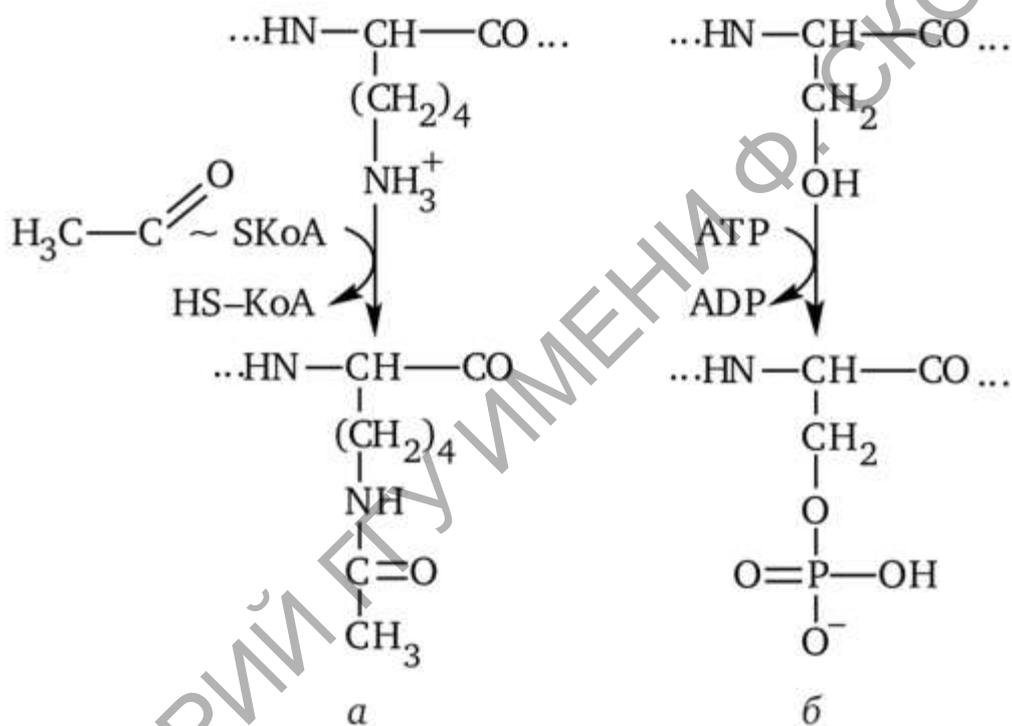
При активации эукариотических генов происходит избирательная деконденсация хроматина. Это продемонстрировано в экспериментах с ДНКазой I – ферментом, способным атаковать ДНК вне суперспирализованных участков. Обработка ДНКазой I вызывает деградацию только тех участков ДНК, которые составляют транскрибируемую часть генома эукариот (10 %). В гене лизоцима курицы выявлено семь гиперчувствительных к ДНКазе I участков в области активного эухроматина протяженностью 20 000 н. п. Полностью механизм активации хроматина еще не выяснен, однако постепенно накапливаются определенные представления об этом процессе. Установлено, например, что при декомпактизации хроматина ослабевает прежде всего связь гистона H1 с ДНК. Свободные от гистона H1 области подвергаются интенсивной транскрипции, так как возрастает число доступных участков для связывания РНК-полимеразы.

Если ранее полагали, что коровые гистоны только способствуют регулярной упаковке ДНК в составе нуклеосом, то в настоящее время считают, что они участвуют в регуляции инициации транскрипции. Установлено, что избирательное включение ТАТА-боксов в нуклеосомы блокирует работу РНК-полимеразы, однако если образование нуклеосом происходит в кодирующей области генов, то транскрипция не блокируется, хотя интенсивность ее все же снижается. Предполагают, что гистоны предотвращают связывание основных белковых факторов транскрипции (так называемых базальных факторов) с ДНК.

Белки-активаторы транскрипции конкурируют с гистонами за связь с ДНК. Ослабление связи гистонов с ДНК происходит скорее всего в результате взаимодействия между белком-активатором и одним из доменов гистона H4. Этот домен, видимо, не участвует в сборке нуклеосом, имеет нитевидную (неспирализованную) форму и способен к взаимодействию с окружающими молекулами. Ацетилирование этого (N-концевого) домена гистона H4 ведет к снижению его положительного заряда, изменению его конформации и, как следствие, - к временному отсоединению от гистонов H2A и H2B. Далее происхо-

дит раскручивание ДНК вокруг оставшихся гистонов и ДНК становится доступной для базальных факторов транскрипции.

Особую роль для тотальной регуляции транскрипции генов эукариот играют ковалентные модификации гистонов, ослабляющие их связь с ДНК. Среди ковалентных модификаций ацетилирование гистонов, по всей видимости, наиболее важно. Этот процесс катализируется гистонацетилтрансферазой (НАТS)-ферментом, способным переносить ацетильные остатки с молекулы ацетил-коэнзима А на остатки лизина в молекулах гистонов и тем самым снижать их положительный заряд (рис. 53).



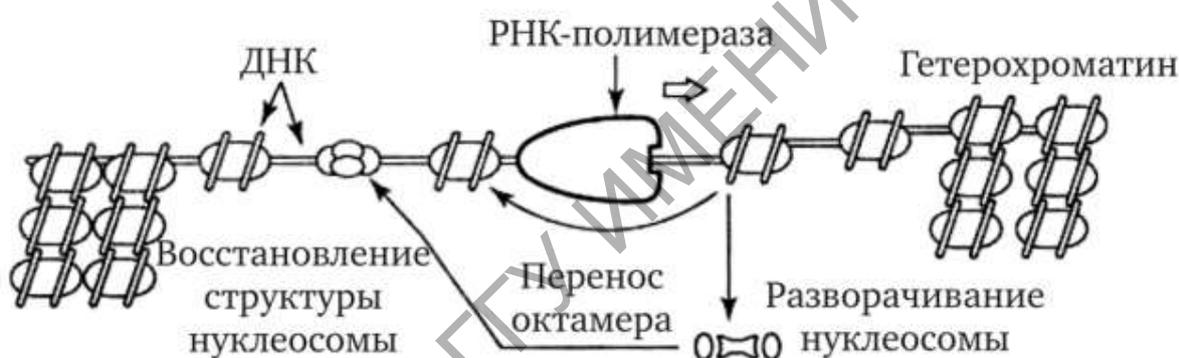
**Рисунок 53 - Ковалентные модификации гистонов, ослабляющие их связь с ДНК: а — ацетилирование, снимающее положительный заряд с остатков лизина; б — фосфорилирование радикалов серина с образованием отрицательно заряженного остатка фосфосерина**

Установлена тесная взаимосвязь между ацетилированием гистонов, их взаимодействием с ДНК и транскрипцией. Один из компонентов белкового комплекса TFIID у человека содержит белок TAFII250, обладающий ацетилтрансферазной активностью, что указывает на необходимость ацетилирования для начала транскрипции. Ацетилирование гистонов имеет обратимый характер: для их деацетилирования, вероятно, необходим особый белковый комплекс деацетилирования. Само ацетилирование также стимулируется особым белковым

комплексом (НАТ-комплекс), связывающимся с линкерной ДНК вблизи сайта присоединения РНК-полимеразы.

Фосфорилирование гистонов представляет собой еще один путь активации транскрипции. Этот АТР-зависимый механизм, в основе которого, очевидно, лежит фосфорилирование радикалов серина коровых гистонов.

В фосфорилировании гистонов принимает участие специфический белковый комплекс, итог работы которого состоит в ослаблении связи гистонов с ДНК. Менее плотная упаковка ДНК в составе нуклеосом после фосфорилирования гистонов создает условия для успешной инициации и элонгации транскрипции. В ходе элонгации транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II, нуклеосомы располагаются перед и после работающей полимеразы, что указывает на возможность перемещения нуклеосом либо их разрушение (разворачивание) и реконструкцию после прохождения фермента (рис. 54).



**Рисунок 54 – Гипотетическая модель, иллюстрирующая изменения в нуклеосомной организации хроматина в период транскрипции.**

В последние годы установлено, что у дрожжей, растений и млекопитающих модификации гистонов могут регулироваться с участием малых интерферирующих РНК. Эти РНК способны также направлять процесс метилирования ДНК, что приводит к образованию гетерохроматина и репрессии транскрипции определенных генов.

## ЛЕКЦИЯ 7 ПРОЦЕССИНГ И СПЛАЙСИНГ

1. Сплайсинг молекул РНК
2. Процессинг иРНК
3. Процессинг тРНК
4. Процессинг рРНК

Процессингу подвергаются различные виды РНК: иРНК, рРНК, тРНК и др. Наиболее ярко постранскрипционные модификации РНК выражены у эукариот. У прокариот процессинг РНК необходим при образовании зрелых молекул рРНК и тРНК.

### 1. Сплайсинг молекул РНК.

Многие гены эукариот состоят из экзонов (кодирующих последовательностей) и интронов (некодирующих) последовательностей. При транскрипции таких генов РНК, содержащая в своем составе как экзоны, так и интроны. Образовавшийся первичный транскрипт подвергается процессу, в результате которого интроны вырезаются, а экзоны, сшиваясь, образуя зрелую РНК. Данный процесс получил название сплайсинг (рис. 55).

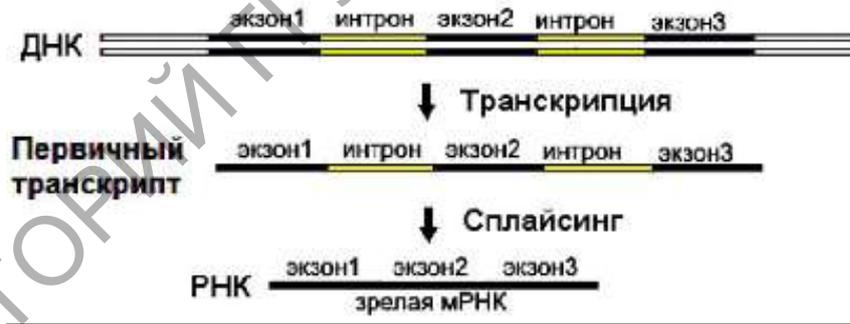


Рисунок 55 - Сплайсинг молекул РНК.

Сплайсингу подвергаются предшественники различных эукариотических РНК: иРНК, тРНК, рРНК. У эукариот в предшественниках иРНК (пре-РНК) интроны вырезаются в сплайсосомах – комплексах, состоящих из мяРНК и белков. Интроны на границах с экзонами имеют канонические последовательности на 5'-конце – ГУ, на 3'-конце – АГ. Они также содержат последовательности, необходимые для удаления: акцепторный сайт, донорный сайт и бранч-сайт. мяРНК в соответствии с правилом комплементарности и белки, взаимодействуя с этими сайтами, обеспечивают удаление интронов (рис. 56).



Рисунок 56 – Строение интрона.

Процесс удаления интронов включает:

- а) разрыв молекулы РНК на границе интрон-экзон со стороны 5'-конца интрона;
- б) образование сложноэфирных связей между фосфатной группой первого нуклеотида интрона (Г) и гидроксильной группой рибозы (у 2' атома углерода) аденозина, входящего в состав бранч-сайта. Сформировавшаяся структура напоминает лассо;
- в) удаление и последующее разрушение интрона;
- г) воссоединение экзонов посредством образования фосфоэфирных связей (рис. 57).

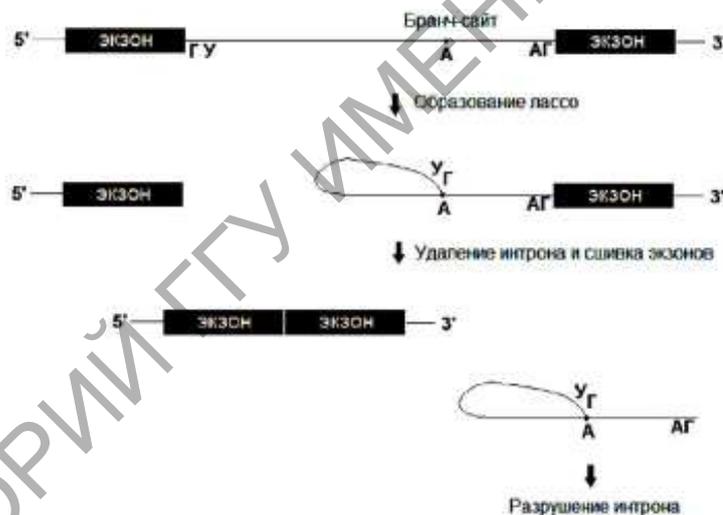


Рисунок 57 – Удаление интронов из мРНК.

Следует также отметить, что у первичных транскриптов в митохондриях и хлоропластах, а также у предшественников дрожжевых тРНК канонические последовательности ГУ– АГ на границе интрон-экзон отсутствуют

#### *Альтернативный сплайсинг*

Определенные полинуклеотидные последовательности РНК в одних случаях могут выступать в качестве интрона, в других – в качестве экзона. В связи с этим сплайсинг РНК может осуществляться альтернативными путями. Образовавшиеся в результате альтернативного сплайсинга зрелые РНК будут отличаться друг от друга первичной структурой (рис. 58).



Рисунок 58 – Альтернативный сплайсинг.

Такие РНК будут иметь, как идентичные, так и свои собственные фрагменты полинуклеотидных последовательностей.

Альтернативный сплайсинг обеспечивает образования разнообразных белков с одного и того же первичного транскрипта. Например, в клетках щитовидной железы в результате транскрипции определенного гена и последующего сплайсинга образуется иРНК, служащая матрицей для синтеза гормона кальцитонина, ответственного за регуляцию обмена кальция. В мозге же из первичного транскрипта, считанного с этого же гена, вследствие альтернативного варианта сплайсинга образуется иРНК, кодирующая белок, отвечающий за восприятие вкуса. В случае альтернативного сплайсинга экзоны обычно выстраиваются в той же ориентации, в какой они располагались в гене.

*Транс-сплайсинг* – форма сплайсинга, при которой соединяются экзоны разных РНК (рис. 59).

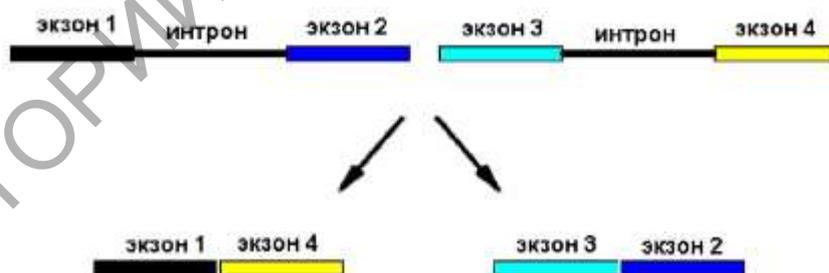


Рисунок 59 – Транс-сплайсинг.

Аутосплайсинг (самосплайсинг) – сплайсинг первичного транскрипта РНК, происходящий без участия каких-либо ферментов, т.е. РНК сама является катализатором этого процесса. Так у инфузории *Tetrachytena thermophyla* образуется 35S предшественник рРНК (пре-рРНК) длиной 6400 нуклеотидов. Без участия белков из этой пре-рРНК вырезается интрон длиной 414 нуклеотидов. При этом два экзона сшиваются с образованием 26S рРНК (рис. 60).

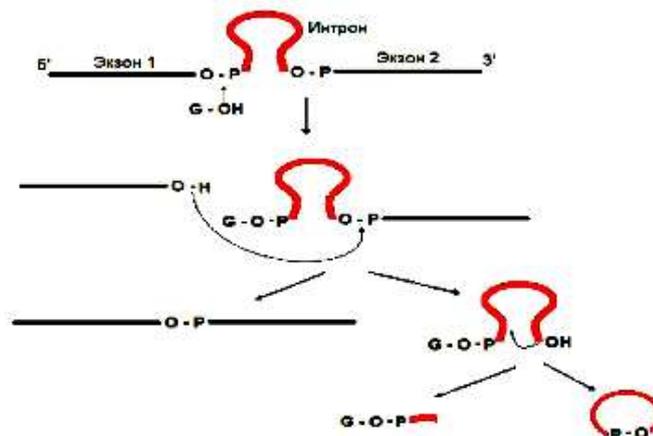


Рисунок 60 - Аутосплайсинг рРНК у *Tetrachymena thermophyla*

Для протекания сплайсинга необходимо присутствие нуклеотида содержащего гуанин (ГТФ, или ГДФ, или ГМФ, или гуанозин). На 3'-гидроксильную группу этого гуанинового нуклеотида переносится фосфатная группа 5'-конца интрона. Затем образовавшаяся на конце первого экзона 3'-гидроксильная группа используется для присоединения к 5'-концу второго экзона посредством фосфодиэфирной связи. Вырезание интрона сопровождается его циклизацией и удалением из его состава небольшого фрагмента, содержащего тот гуаниновый нуклеотид, который использовался для инициации сплайсинга

Интроны, аналогичные интронам *Tetrachymena thermophyla*, встречаются в пре-рРНК митохондрий, хлоропластов, грибов.

## 2. Процессинг иРНК.

**Процессинг РНК**— это комплекс последовательных процессов образования зрелых, функционально активных молекул РНК в клетке.

Прокариотическая иРНК, как правило, процессингу не подвергается, потому что процессы транскрипции и трансляции у них сопряжены. Еще до завершения транскрипции с иРНК, синтезируемой РНК-полимеразой, взаимодействуют рибосомы, которые и начинают синтез полипептидных цепей – таким образом транскрипция и трансляция в прокариотах могут происходить одновременно.

В эукариотических клетках эти процессы пространственно разделены (транскрипция в ядре, а трансляция в цитоплазме клетки), а первичный транскрипт (про-иРНК) для получения функционально зрелой иРНК должен быть подвергнут процессингу. Только после этого иРНК транспортируется в цитоплазму из ядра.

Процессинг иРНК включает в себя несколько операций. Помимо

сплайсинга, которому подвергается 95% иРНК, обязательными являются кэпирование иРНК (100%) и полиаденилирование (95%) иРНК.

*Процессинг 5'-конца – кэпирование* – заключается в том, что как только 5'-конец растущей РНК выходит из РНК-полимеразы, он немедленно кэпируется особыми ферментами.

**Кэп** (от англ. cap, "шапочка") образуются в результате присоединения метилированного гуанозинтрифосфата (ГТФ) (7-метилгуанилат) в необычной 5'–5' позиции к 5'-концу иРНК.

Функции кэпа:

- 1) защищает иРНК в цитоплазме от действия экзонуклеаз;
- 2) помогает связыванию молекулы иРНК с малой субъединицей рибосомы в процессе трансляции.

*Процессинг 3'-конца про-иРНК – полиаденилирование* – заключается в разрезании её специфической эндонуклеазой вблизи поли(А)-точки – **ААУАА-последовательности** и присоединении к освобожденному 3'-ОН концу поли(А)-цепочки из 100–250 адениннуклеотидов с помощью фермента *поли(А)-полимеразы*. Время жизни иРНК коррелирует с длиной поли(А)-хвоста. По мере участия иРНК в процессах трансляции, длина полиА фрагмента уменьшается. Критическим для стабильности считается 30 адениловых нуклеотидов.

Финальный этап процессинга про-иРНК – это сплайсинг.

Зрелая иРНК транспортируется из ядра в цитоплазму клетки, где она служит матрицей для синтеза белка (рис. 61).

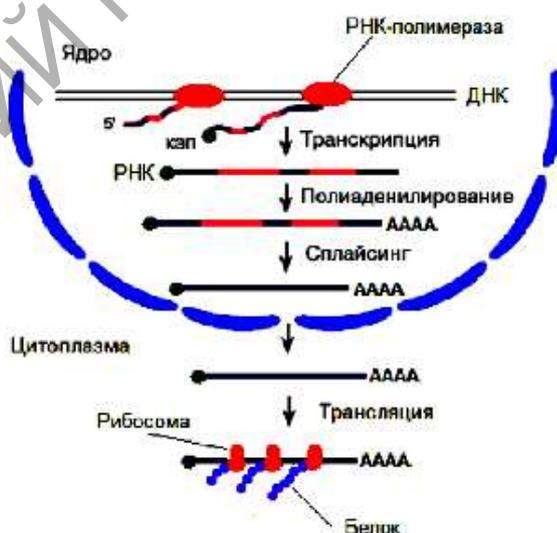


Рисунок 61 – Процессинг иРНК прокариот.

**3. Процессинг тРНК.** Почти все тРНК синтезируются в виде предшественников – более длинных молекул (пре-тРНК). В результате процессинга происходит удаление нуклеотидных последователь-

ностей с флангов пре-тРНК (рис. 62). С 5'-конца фрагмент нуклеотидной цепи отщепляет фермент, называемой РНКазой Р. РНКазой Р является рибонуклеопротеином, каталитическую функцию в котором осуществляет РНК-компонент, белок же выполняет структурную роль.

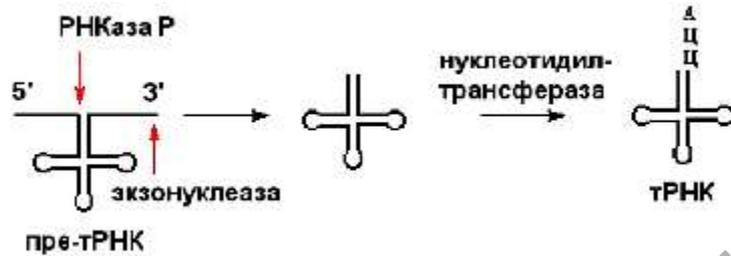


Рисунок 62 – Общая схема процессинга тРНК.

В бактериальной РНКазе Р есть участок, комплементарный ЦЦА участку тРНК. Эукариотическая РНКаза Р узнает другие элементы предшественника тРНК. С 3'-конца пре-тРНК действует экзонуклеаза, укорачивающая РНК постепенно, удаляя по одному нуклеотиду. На заключительных стадиях созревания тРНК к 3'-концу полинуклеотидилтрансфераза присоединяет последовательность ЦЦА.

У эукариот ЦЦА-последовательность не кодируется в генах тРНК, она добавляется посттранскрипционно.

#### 4. Процессинг рРНК.

Процессинг необходим для созревания как прокариотических рРНК, так и эукариотических.

##### *Прокариоты*

Образование рРНК у прокариот происходит в результате процессинга первичного транскрипта (30 S), содержащего в своем составе нуклеотидные последовательности всех трех 16S, 23S и 5S рРНК, а также тРНК. При созревании из первичного транскрипта происходит вычленение индивидуальных рРНК и тРНК (рис. 63).

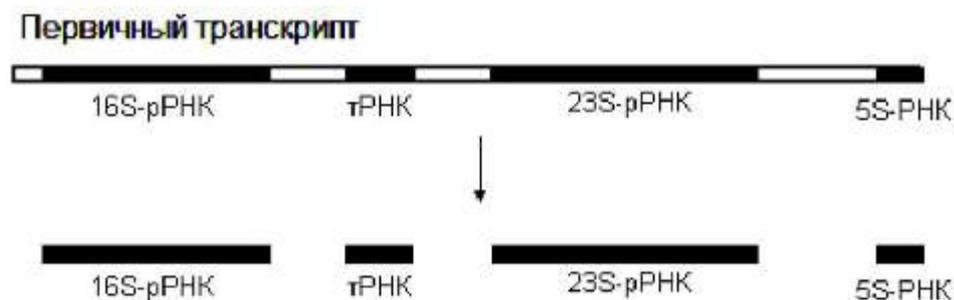


Рисунок 63 – Процессинг рРНК прокариот.

### Эукариоты

Большие рРНК млекопитающих 18S, 5,8S и 28S синтезируются в составе единого первичного транскрипта, обозначаемого 45S-РНК. 45S-РНК во время транскрипции метилируется. Метилированию подвергаются главным образом остатки рибозы. Из 45S-РНК вырезаются индивидуальные рРНК, которые затем при участии 5S рРНК формируют рибосомы (рис. 64).

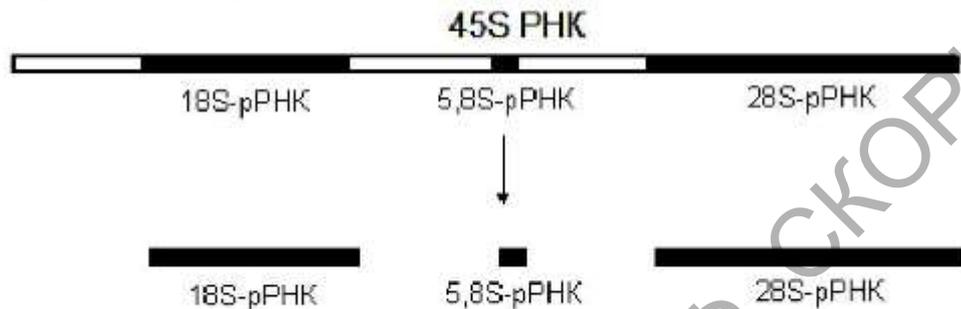


Рисунок 64 – Процессинг рРНК млекопитающих.

У некоторых примитивных эукариот в составе первичного транскрипта нуклеотидные последовательности, соответствующие 26S РНК, содержат интрон. В результате процессинга из первичный транскрипта не только вырезаются индивидуальные рРНК, но и удаляется интрон посредством аутосплайсинга (рис. 65).

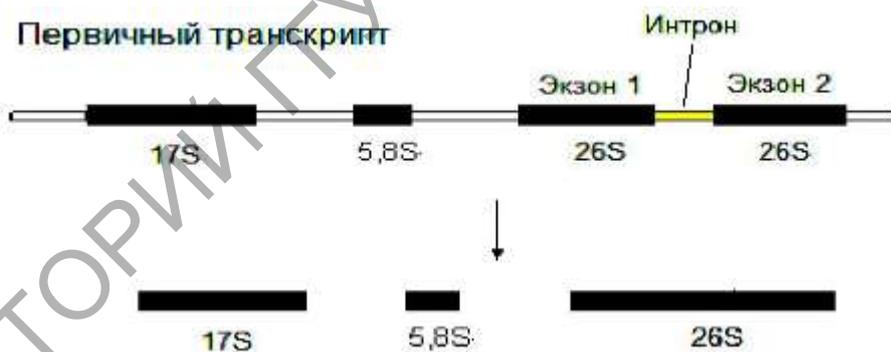


Рисунок 65 - Процессинг рРНК *Tetrachyena thermophyla*.

Таким образом, существование различных видов РНК в клетках живых существ обуславливает протекание важнейших биологических процессов, связанных, прежде всего, с реализацией генетической информации закодированной в ДНК. Для приобретения функциональной активности РНК в большинстве случаев должна подвергнуться сложнейшим посттранскрипционным модификациям. Только иРНК прокариот для проявления своих биологических свойств, как правило, не нуждается в процессинге.

## ЛЕКЦИЯ 8 ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД. ТРАНСЛЯЦИЯ

1. Генетический код и его свойства.
2. Аминоацилирование тРНК.
3. Строение рибосом
4. Этапы трансляции. Инициация.
5. Элонгации и терминация трансляции.

### 1. Генетический код и его свойства.

Многообразие жизни обусловлено разнообразием белковых молекул, выполняющих различные биологические функции. Структура белков определяется набором и порядком расположения аминокислот в пептидных цепях. Набор и порядок аминокислот в пептидных цепях зашифрованы в молекуле ДНК с помощью генетического кода. **Генетический код** – это единая система записи наследственной информации в виде последовательности нуклеотидов в ДНК или мРНК, которая определяет последовательность аминокислот в белке.

После открытия Уотсона и Крика нужно было понять, как последовательность из 4-х азотистых оснований в ДНК, из которых состоит ген, кодирует последовательность из 20 аминокислот в белке. Можно предположить, что генетический код не может состоять из одного или двух нуклеотидов, так как их только четыре и сочетаний из двух нуклеотидов (4<sup>2</sup>) может быть только 16, а аминокислот 20.

Мысль о том, что генетический код должен быть триплетным впервые в 1954 г высказал физик-теоретик Гамов Георгий Антонович. В этом случае получается 64 триплетных сочетания, и их вполне достаточно для кодирования всех аминокислот.

**Триплет** – три рядом стоящих нуклеотида, кодирующих одну аминокислоту получил название кодона.

Начало экспериментальному анализу по расшифровке генетического кода положили в 1961 г. М. Ниренберг и Дж. Генрих Матеи. Они создали простейшую искусственную иРНК, содержащую только урацил. Затем вводили полиУ РНК в бесклеточную среду из кишечной палочки *E. coli*. В результате был получен полипептид, состоящий только из фенилаланина. Таким образом, кодон для фенилаланина был расшифрован как УУУ. Затем в течение нескольких лет в лабораториях М. Ниренберга и Северо Очоа был определен состав большинства кодонов. Однако требовалось установить последовательность нуклеотидов в кодонах.

Г. Корана с сотрудниками разработал метод химического синте-

за фрагментов ДНК с заданной последовательностью нуклеотидов, что позволяло получить иРНК также с известной последовательностью и использовать ее в бесклеточной системе белкового синтеза.

Второй метод предложили М. Ниренберг и П. Ледер. Так как одного триплета иРНК достаточно для связывания с рибосомой и тРНК, ученые использовали триплеты с известной последовательностью нуклеотидов для того, чтобы определить, какую аминокислоту доставит тРНК.

Уже к 1966 г. на основе методов, разработанных Кораной, Ниренбергом и Ледером, были определены все триплеты, кодирующие ту или иную аминокислоту и следовательно генетический код был полностью расшифрован (таблица 7).

**Таблица 7 - Структура генетического кода по иРНК.**

Основания кодонов					
первое	второе	Третье			
		У	Ц	А	Г
У	У	Фен	Фен	Лей	Лей
	Ц	Сер	Сер	Сер	Сер
	А	Тир	Тир	–	–
	Г	Цис	Цис	–	Три
Ц	У	Лей	Лей	Лей	Лей
	Ц	Про	Про	Про	Про
	А	Гис	Гис	Гли	Гли
	Г	Арг	Арг	Арг	Арг
А	У	Иле	Иле	Иле	Мет
	Ц	Тре	Тре	Тре	Тре
	А	Асп	Асп	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

Оказалось, что 61 триплет кодирует аминокислоты, а 3 триплета УАА, УГА и УАГ являются «стоп кодоны» и соответственно останавливают процесс трансляции.

Генетический код обладает следующими свойствами:

**1. Триплетность** - каждая аминокислота кодируется последовательностью из 3-х нуклеотидов.

Код не может быть моноплетным, поскольку 4 (число разных нуклеотидов в ДНК) меньше 20. Код не может быть дуплетным, т.к. 16 (число сочетаний и перестановок из 4-х нуклеотидов по 2) меньше 20. Код может быть триплетным, т.к. 64 (число сочетаний и перестановок из 4-х по 3) больше 20.

**2. Вырожденность** - все аминокислоты, за исключением метио-

нина и триптофана, кодируются более чем одним триплетом.

**3. Наличие межгенных знаков препинания** - в конце каждого гена, кодирующего полипептид, находится, по меньшей мере, один из 3-х терминирующих кодонов, или стоп-сигналов: UAA, UAG, UGA. Они терминируют трансляцию.

**4. Однозначность** - каждый триплет кодирует лишь одну аминокислоту или является терминатором трансляции. Исключение составляет кодон AUG. У прокариот в первой позиции (заглавная буква) он кодирует формилметионин, а в любой другой - метионин.

**5. Компактность, или отсутствие внутригенных знаков препинания** - внутри гена каждый нуклеотид входит в состав значащего кодона.

**6. Универсальность** - генетический код един для всех живущих на Земле существ.

**7. Неперекрываемость** – каждый нуклеотид входит в состав лишь одного кодона.

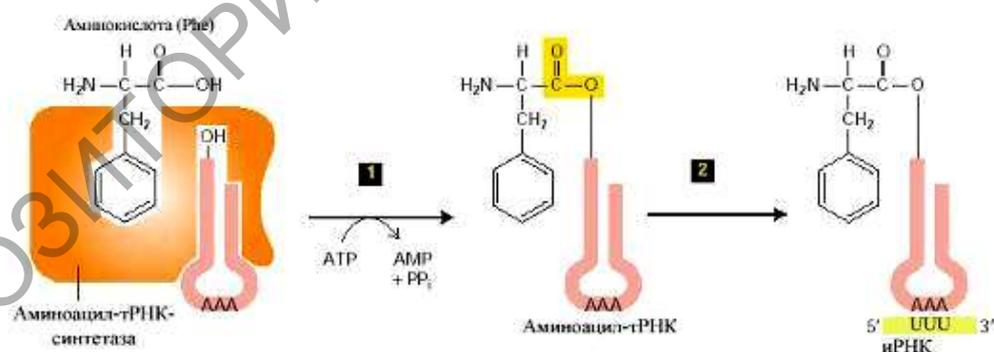
### 1. Аминоацилирование тРНК.

**Аминоацилирование** – это подготовительный этап трансляции, на котором образуется ковалентная связь между тРНК и соответствующей аминокислотой.

Состоит из двух стадий:

1. Активирование аминокислоты.
2. Присоединение аминокислоты к тРНК.

Обе стадии осуществляются ферментом аминоксил-тРНК-синтетазой (АРС-азой, кодазой) (рис. 66).



**Рисунок 66 – Присоединение аминокислоты фенилаланина к терминальному аденозину соответствующей тРНК с помощью фермента аминоксил-тРНК-синтетазы (1 этап) и соединение антикодона AAA аминоксил-тРНК<sup>Phe</sup> с соответствующим кодоном УУУ мРНК (этап 2).**

Существует 20 вариантов аминоксил-тРНК-синтетаз (по числу аминокислот). У каждой аминоксил-тРНК-синтетазы 3 центра связывания: для аминокислоты, тРНК и АТФ. Сначала осуществляется

связь аминоксилтРНК-синтетазы с определенной аминокислотой, а затем активированная с помощью АТФ аминокислота присоединяется к аденину акцепторного триплета ЦЦА тРНК.

Каждая АРС-аза узнает третичную структуру тРНК. тРНК, имеющие разную первичную, но одинаковую третичную структуру, акцептируют одну и ту же аминокислоту и называются изоакцепторными тРНК.

Следующий этап трансляции - собственно синтез полипептидов, происходит на рибосомах.

### 3. Строение рибосом.

**Рибосомы** - немембранные самые мелкие клеточные органеллы, при этом они едва ли не самые сложные. В клетке *E. coli* присутствует около  $10^3$ - $5 \times 10^3$  рибосом. Линейные размеры прокариотической рибосомы 210 x 290Å. У эукариот - 220 x 320Å.

Выделяют четыре класса рибосом:

1. Прокариотические 70S.
2. Эукариотические 80S.
3. Рибосомы митохондрий (55S - у животных, 75S - у грибов).
4. Рибосомы хлоропластов (70S у высших растений).

S - коэффициент седиментации или константа Сведберга. Отражает скорость осаждения молекул или их компонентов при центрифугировании, зависящую от конформации и молекулярного веса.

Рибосома состоит из трёх (в бактериях) или четырёх (в эукариотах) различных молекул рРНК и нескольких десятков (до 83-х) белков, которые организованы в две субъединицы – большую и малую (табл. 8).

**Таблица 8.** Структура про- и эукариотических рибосом.

<i>Прокариотическая рибосома</i>		<i>Эукариотическая рибосома</i>	
70S		80S	
50S	30S	60S	40S
5S рРНК 23SrРНК	16S рРНК	5S рРНК 5.8S рРНК 28S рРНК	18S рРНК
34 молекулы белков, из них 31 разные	21 белок	не менее 50 разных белков	не менее 33 разных белков

Малая субъединица рибосомы содержит одну молекулу рРНК, которую называют малой рРНК. Большая субъединица включает молекулу большой рРНК и молекулу 5S-рРНК, а у позвоночных ещё одну молекулу 5,8S-рРНК дополнительно. Длина молекул рРНК, количество белков в каждой субъединице и, следовательно, размер субъединиц различен в бактериальных и эукариотических клетках. Собранная рибосома представляет собой 70S в бактериях и 80S у позвоночных.

*Характеристика рРНК:*

1. рРНК выполняют не только функцию каркасов субъединиц рибосом, но и принимают непосредственное участие в синтезе полипептидов.

2. 23S рРНК входит в каталитический пептидилтрансферазный центр, 16SpРНК необходима для установки на 30S субъединице иницирующего кодона мРНК, 5SpРНК - для правильной ориентации аминоацил-тРНК на рибосоме.

3. Все рРНК обладают развитой вторичной структурой: около 70% нуклеотидов собрано в шпильки.

4. рРНК в значительной степени метилированы (CH<sub>3</sub>-группа во втором положении рибозы, а также в азотистых основаниях).

Порядок сборки субъединиц из рРНК и белков строго определен. Субъединицы, не соединенные друг с другом, представляют собой диссоциированные рибосомы. Соединенные субъединицы – это ассоциированные рибосомы. Для ассоциации нужны не только конформационные изменения, но и ионы магния Mg<sup>2+</sup> (до 2x10<sup>3</sup> ионов на рибосому). Магний нужен для компенсации отрицательного заряда рРНК. Все реакции матричного синтеза (репликация, транскрипция и трансляция) связаны с ионами магния Mg<sup>2+</sup> (в меньшей степени - марганца Mn<sup>2+</sup>).

Каталитические центры рибосом.

*Acp - центр специфического узнавания.* Здесь происходит взаимодействие кодон-антикодон.

*P-центр - пептидильный, донорный.* Он является донором формилметионина при инициации, или пептидила при элонгации трансляции.

*A-центр - аминоацильный, акцепторный.* Акцептирует формилметионин в самом начале или пептидил при элонгации трансляции.

*K-центр - каталитический (фермент пептидилтрансфераза).* В K-центре задействована 23S рРНК и несколько белков большой субъединицы

#### 4. Этапы трансляции. Инициация.

Процесс синтеза белка на рибосомах подразделяется на три стадии: инициация, элонгация и терминация (рис. 67).

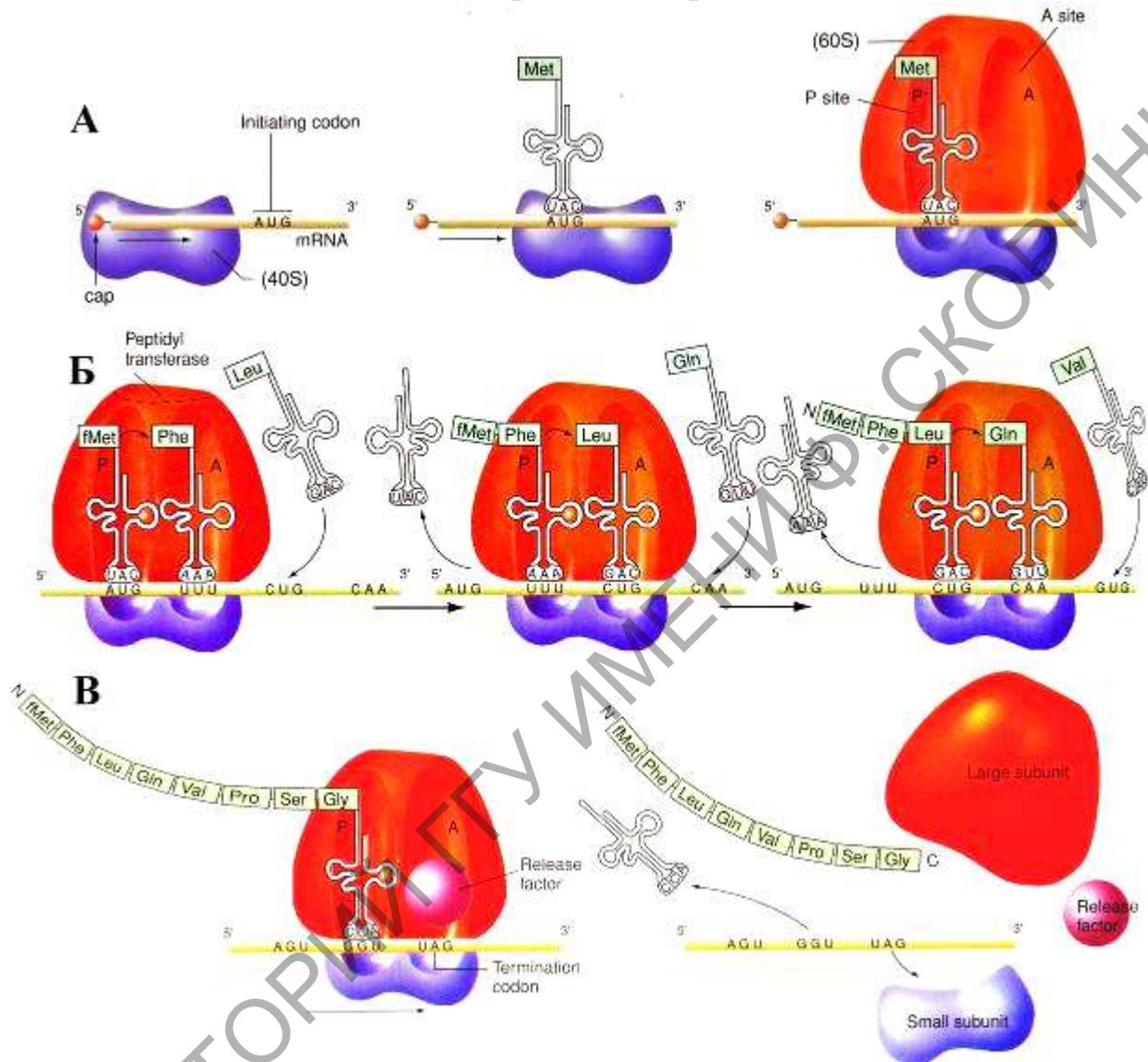


Рисунок 67 – Схематическое изображение основных этапов трансляции на рибосомах (А - инициация, Б - элонгация, В - терминация).

**Инициация у прокариот.** У прокариот для начала трансляции необходим иницирующий кодон мРНК, соответствующая ему инициаторная аминокислот-тРНК и белковые факторы инициации (IF – Initiation Factors). Один из таких факторов (IF-2) обладает ГТФазной активностью и участвует в присоединении инициаторной аминокислот-тРНК. Стартовым кодоном как правило является AUG (формилметионин (fmet)), но в некоторых случаях он может быть заменен на GUG (валин).

В связывании мРНК главную роль играет взаимодействие определенного участка, богатого пуриновыми основаниями (последова-

тельность Шайна-Дальгарно). Эта последовательность комплементарна 3'-концевому участку 16S рРНК. Данная последовательность представляет собой сайт связывания рибосом, она находится на расстоянии 3-10 нуклеотидов от иницирующего кодона.

Таким образом, в первую очередь присоединяется малая субъединица рибосомы (рис. 68).

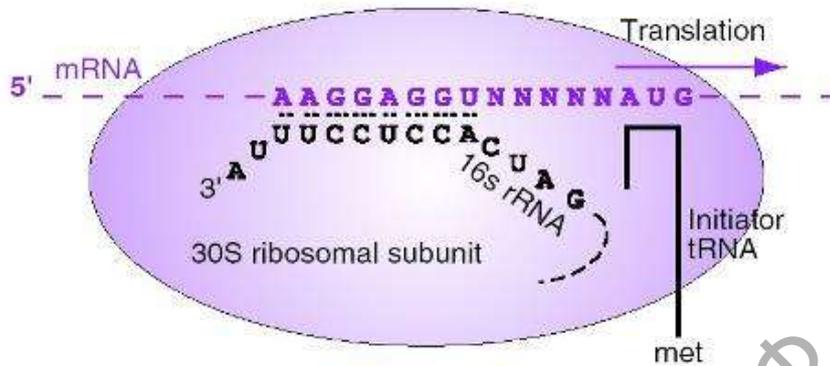


Рисунок 68 – Инициация трансляции у прокариот.

На рисунке 63 видно, что взаимодействуют три типа РНК (мРНК, 16S рРНК, тРНК<sup>fMet</sup>). Это позволяет установить рамку считывания в нужное место, предопределить аминокислотную последовательность синтезируемого белка.

После этого происходит присоединение большой субъединицы и образуются двакаталитических центра: А- и Р-центр. Первый центр участвует в присоединении следующей молекулы аминоксил-тРНК. В Р-центре происходит стабилизация тРНК<sup>fMet</sup> с затратой молекулы ГТФ. На этом стадия инициации заканчивается.

*Инициация у эукариот.* Вместо комплементарного РНК-РНК узнавания, в которое вовлечена прединицирующая последовательность Шайна-Дальгарно прокариотических мРНК, эукариотические мРНК узнаются эукариотическими рибосомами по кэпированному 5'-концу с обязательным участием белка, например, eIF-4F инициаторного фактора. Предполагается, что этот белок участвует в расплавлении вторичных структур 5'- областей мРНК, облегчая их связывание с малыми субчастицами рибосом. В отличие от прокариот, эукариотическая мРНК образует комплексы с белками (мРНКП, или мессенджер-рибонуклеопротеиды, или информосомы), что обуславливает ее метаболическую стабильность. Вследствие этого у эукариот отсутствует постоянная интенсивная дегградация и интенсивный ресинтез мРНК, которые, как правило, моноцистронны и имеют специфически модифицированный (кэпированный) 5'-конец. Все это обуславливает целый ряд особенностей инициации трансляции и ее регуляции у эукариотических организмов.

## 5. Элонгации и терминация трансляции.

У прокариот и эукариот нет существенных отличий в протекании стадии элонгации. В свободный *аминоацильный центр* рибосомы со второй аминокислотой поступает следующая аа-тРНК, которая своим антикодоном соединяется со строго с комплементарным кодоном иРНК (рис. 69).

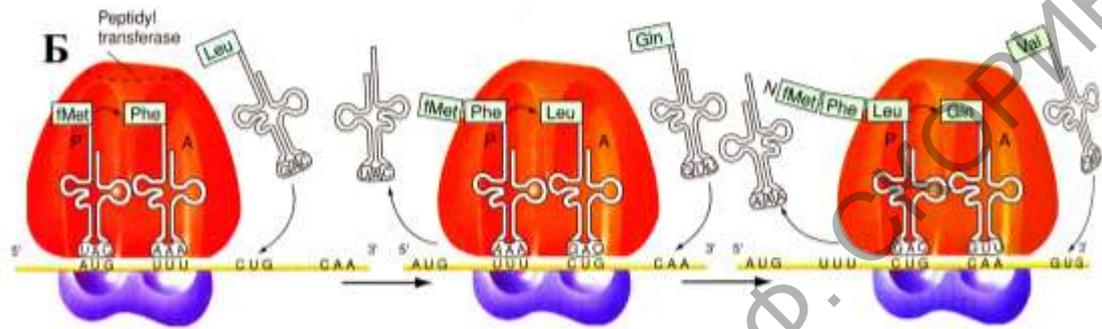


Рисунок 69 – Стадия элонгации.

В этот момент при помощи фермента **пептидилтрансферазы** предшествующая аминокислота (метионин) своей карбоксильной группой (COOH) соединяется с аминогруппой (NH<sub>2</sub>) вновь пришедшей аминокислоты. Между ними образуется пептидная связь (–CO–NH–). В результате тРНК, принеся метионин, освобождается, а в аминоацильном центре к тРНК присоединен уже дипептид. Дипептидил-тРНК благодаря перемещению рибосомы на один кодон при участии фермента **транслоказы** и белкового **фактора элонгации** продвигается из аминоацильного центра в пептидилный. Освободившаяся тРНК и связанный с ней кодон иРНК АУГ выходят из рибосомы (рис. 67, Б). Следующая аа-тРНК приносит новую аминокислоту в освободившийся аминоацильный центр в соответствии с поступившим туда кодоном. Эта аминокислота при помощи пептидной связи соединяется с предыдущей. При этом рибосома снова продвигается еще на один кодон, и процесс повторяется (рис. 67, Б).

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

Финальная стадия трансляции требует специфических молекулярных сигналов, которые превращают стоп-сигнал стоп-кодона в

диссоциацию комплекса мРНК–рибосома–тРНК–полипептид.

Были обнаружены два особых белковых фактора терминации, которые называются факторами высвобождения (или отделения) полипептидной цепи от рибосомы (release factors, RF). Эукариотический eRF1, чья форма подобна форме тРНК, действует, по-видимому, просто связываясь с А-центром и непосредственно распознавая стоп-кодон. Подобно некоторым из факторов инициации и элонгации, фактор высвобождения eRF3 связан с GTP. Связывание комплекса (eRF3–GTP) с eRF1 и гидролиз АТФ обеспечивают отделение полипептида от тРНК и завершение синтеза белка (рис. 70).

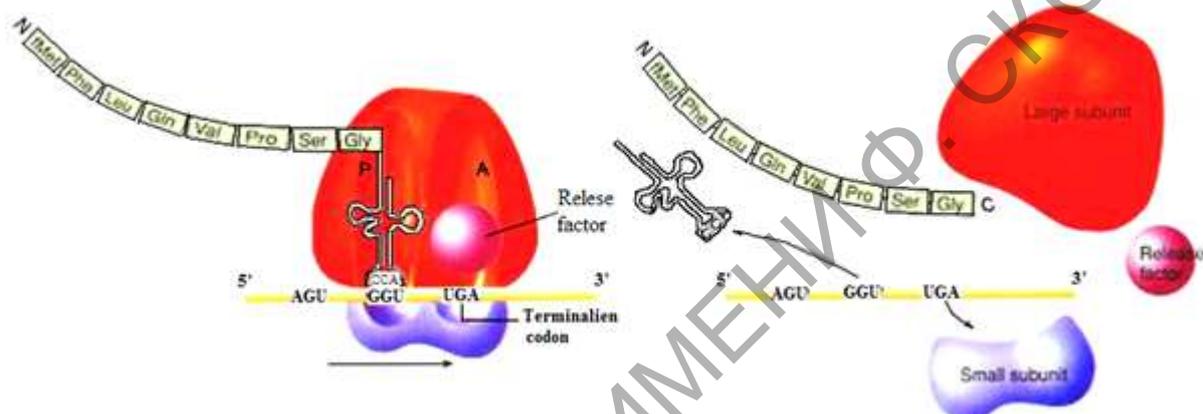


Рисунок 70 – Терминация трансляции у эукариот.

Бактерии, в отличие от эукариот, имеют два фактора высвобождения RF1 и RF2 (которые функционально аналогичны эукариотическому фактору eRF1) и GTP-связанный фактор RF3, аналогичный eRF3.

После высвобождения из рибосомы вновь синтезированный белок с помощью специальных белков шаперонов сворачивается в свою нативную трёхмерную конформацию.

Белковые факторы терминации eRF3 обеспечивают

- 1) диссоциацию рибосомы,
- 2) разъединение субъединиц, мРНК и последней тРНК, которые теперь вновь готовы участвовать в новом цикле синтеза нового белка.

## ЛЕКЦИЯ 9 МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС

1. Мутагенез. Классификация мутаций.
2. Молекулярные механизмы возникновения генных мутаций.
3. Гены-мутаторы и “горячие точки мутаций”.

### 1. Мутагенез. Классификация мутаций.

**Мутация** – это скачкообразное стойкое ненаправленное изменение генетического материала.

Термин «мутация» впервые был предложен Г. Де Фризом в его классическом труде «Мутационная теория» (1901-1903).

Основные положения теории:

1. Мутация возникает скачкообразно (внезапно), без переходов.
2. Образовавшиеся новые формы наследуются, т.е. являются стойкими.
3. Мутации ненаправленны (т. е. могут быть полезными, вредными или нейтральными).
4. Мутации – редкие события.
5. Одни и те же мутации могут возникать повторно.

Мутационная изменчивость, или мутации, – внезапное изменение генетического материала под влиянием факторов среды.

**Мутагены** – факторы, вызывающие мутации. Выделяют: а) экзомутагены – факторы внешней среды; б) эндомутагены – метаболиты организма человека.

Мутагенные факторы подразделяют на *физические, химические и биологические*.

**Физические мутагены** – различные виды излучений, температура, влажность и другие. Они вызывают:

- нарушения структуры генов и хромосом;
- образование свободных радикалов, реагирующих с ДНК;
- разрывы нитей веретена деления;
- образования димеров соседних пиримидиновых оснований одной цепи ДНК (Т–Т, Т–Ц) и другие.

**Химические мутагены:**

- природные органические и неорганические соединения (алкалоиды, нитриты, нитраты);
- продукты промышленной переработки угля и нефти;
- синтетические вещества, не встречающиеся ранее в природе (бытовая химия, химические соединения для сельского хозяйства,

пищевые консерванты);

- различные лекарства (некоторые антибиотики, наркотические вещества, гормональные препараты), способные вызывать у человека врожденные пороки развития.

**Супермутагены (иприт, этиленимин)** – вещества химической природы, которые действуют сильнее проникающей радиации.

**Химические мутагены** действуют в период репликации ДНК и обычно являются причиной генных мутаций. Они вызывают дезаминирование и алкилирование нуклеотидов, замену азотистых оснований их аналогами, ингибируют синтез предшественников нуклеиновых кислот.

**Биологические мутагены** – это продукты метаболизма различных паразитических агентов:

- паразиты невирусной природы (риккетсии, бактерии и т. д.);
- вирусы краснухи, гриппа, кори, оспы;
- метаболиты протистов или многоклеточных паразитов.

Невирусные и вирусные агенты являются причиной инфекционного мутагенеза. Они вызывают нарушения синтеза ДНК, процесса кроссинговера, расхождения хромосом и хроматид в анафазе мейоза и митоза. Продукты жизнедеятельности паразитов действуют как химические мутагены. Они разрушают теломеры хромосом, нарушают процесс кроссинговера.

Процесс образования мутаций называется **мутагенезом**. Мутагенез может быть спонтанным и индуцированным.

**Спонтанный, или самопроизвольный**, мутагенез возникает при ошибках репликации и репарации ДНК и под действием метаболитов организма (например, перекиси и альдегиды).

**Индукцированный, или направленно вызванный**, мутагенез происходит под действием определенного мутагена – ультрафиолетового или ионизирующего излучения.

### **Классификация мутаций**

**По мутировавшим клеткам** мутации могут быть соматические (например, разный цвет глаз у одного человека) и генеративные (или гаметические). Генеративные мутации передаются потомству, соматические проявляются у самой особи. Они передаются по наследству только при вегетативном размножении.

**По исходу (значению)** для организма выделяют мутации положительные, нейтральные и отрицательные.

*Положительные* мутации появляются редко. Они повышают жизнеспособность организма и имеют значение для эволюции

(например, мутации, приводящие к появлению четырехкамерного сердца в процессе эволюции хордовых).

*Нейтральные мутации* практически не влияют на процессы жизнедеятельности (например, мутации, приводящие к наличию веснушек).

*Отрицательные мутации* делят на полулетальные и летальные. Полулетальные мутации снижают жизнеспособность организма, сокращают срок его жизни (например, мутации, приводящие к болезни Дауна). Летальные мутации вызывают смерть организма до рождения или в момент рождения (например, мутации, приводящие к отсутствию головного мозга).

**По изменению фенотипа** мутации бывают *морфологические* (например, уменьшенные глазные яблоки, шесть пальцев на руке) и *биохимические* (например, альбинизм, гемофилия).

**По изменению генотипа** выделяют мутации *геномные, хромосомные и генные*.

*Геномные мутации* – это изменение числа хромосом под действием факторов среды. Гаплоидия – набор хромосом  $1n$ . В природе она встречается у трутней (самцов) пчел. Жизнеспособность таких организмов снижена, так как у них проявляются все рецессивные гены. Полиплоидия – увеличение гаплоидного набора хромосом ( $3n, 4n, 5n$ ). Полиплоидия используется в растениеводстве. Она приводит к повышению урожайности. Для человека гаплоидия и полиплоидия это летальные мутации. Анеуплоидия – это изменение числа хромосом в отдельных парах ( $2n \pm 1, 2n \pm 2$  и так далее). Трисомия: например, если к паре половых хромосом женского организма добавляется X-хромосома, развивается синдром трисомии X ( $47, XXX$ ), если она добавляется к половым хромосомам мужского организма, развивается синдром Клайнфельтера ( $47, XXY$ ). Моносомия: отсутствие одной хромосомы в паре –  $\text{♀}45, X0$  – синдром Шерешевского-Тернера. Нулисомия: отсутствие пары гомологичных хромосом (для человека – летальная мутация).

*Хромосомные мутации* (или хромосомные аберрации) – это изменения структуры хромосом (межхромосомные или внутривхромосомные). Перестройки внутри одной хромосомы называются инверсии, делеции, дупликации; межхромосомные перестройки называются транслокации: инверсия (отрыв участка и его поворот на  $180^\circ$ ); делеция (выпадение участка); дупликация (удвоение участка); транслокация (перенос участка на негомологичную хромосому).

*Генные мутации* называются точковые, или трансгенации. Они

связаны с изменениями структуры генов и вызывают развитие болезней обмена веществ (их частота 2-4%).

## **2. Молекулярные механизмы возникновения генных мутаций.**

**Генные мутации** разделяют на две категории: **мутации типа замены пар оснований** и **типа сдвига рамки считывания**.

**Мутации типа замены азотистых оснований.** Существует два типа замен: **транзиции** - замены пурина на пурин или пиримидина на пиримидин, и **трансверсии** - замена пурина на пиримидин. Появление этих мутаций связано с явлениями таутомеризации, внедрением в ДНК аналогов азотистых оснований, дезаминированием цитозина и метилированием оснований. К этой категории относятся **миссенс мутации** - это изменения нуклеотидной последовательности гена, которые приводят к изменению кодона и сопровождается заменой аминокислоты в синтезируемом белке. Например, в 6-ом триплете гена **0-цепи гемоглобина** происходит замена тимина на аденин, в результате которой в синтезируемом белке происходит замена глутаминовой аминокислоты на валин. У гомозиготных носителей мутантного гена ( $Hb^s$ ) развивается серповидноклеточная анемия.

**Мутации со сдвигом рамки считывания** появляются в результате делеции (потери) или инсерции (вставки) нуклеотида в цепь ДНК. Причиной мутаций этого типа являются разрывы цепи ДНК, образование тиминовых димеров и потеря основания в цепи ДНК (апуринизация). Сюда относятся **нонсенс мутации** – сопровождаются изменением нуклеотидной последовательности гена, которая приводит к появлению стоп-кодона и трансляция заканчивается до полного синтеза зрелого белка. Появляется нефункциональный белок.

**Еще один тип генных мутаций – динамические мутации** (мутации экспансии тринуклеотидных повторов) обнаружены относительно недавно. Эти мутации появляются в результате увеличения числа триплетных повторов, расположенных в кодирующей части гена. Этот тип мутаций пока обнаружен только у человека и не зарегистрирован у других видов животных. Например, хорея Хантингтона обусловлена вставкой дополнительных триплетов ЦАГ в последовательность гена *хантингтина*, которая приводит к синтезу аномального белка с добавочными аминокислотами. Нефункциональный белок приводит к апоптозу (гибели) клеток мозга и разрушению ЦНС.

Механизмы возникновения генных мутаций представлены в таблице 9.

**Таблица 9 . Молекулярные механизмы генных мутаций**

Тип мутации	Причина повреждений	Молекулярные механизмы
Апуринизация	Спонтанно или при повышении температуры	Разрыв гликозидной связи между пурином и дезоксирибозой
Дезаминирование	Спонтанно или под действием $\text{HNO}_2$	Потеря аминогруппы ( $\text{NH}_2$ ) цитозином и аденином. Цитозин превращается в урацил, аденин - в гипоксантин
Алкилирование (мети-лирование)	Действие на ДНК алкилирующих агентов - этилметансульфат	Присоединение метильной группы ( $\text{CH}_3$ ) к гуанину, образуется метилгуанин
Образование тиминовых димеров	Действие УФ-излучения	Образование циклобутановых колец между двумя тиминами в цепи ДНК
Включение в цепь ДНК аналогов азотистых оснований (5'-БУ - аналог тимина)	Ошибки репликации, нарушение корректирующей активности ДНК-полимеразы	5'-БУ в редкой енольной форме может образовывать связь с гуанином, что приводит к замещению в ДНК пары А - Т на пару Г - Ц
Таутомеризация	Существование органических соединений в разных формах	Мутации типа замены
Разрывы цепи ДНК	Рентгеновские лучи, ионизирующее излучение	Делеции, транслокации, сдвиг рамки считывания, образование кольцевых молекул ДНК
Сдвиг рамки считывания	Встраивание интеркалирующих агентов в ДНК или ошибки репликации	Вставка дополнительного нуклеотида в следующем цикле репликации
Экспансия тринуклеотидов	Ошибки репликации	Вставка дополнительных повторов из трех нуклеотидов в последовательность гена

Генные мутации могут возникать **спонтанно** или **под действием мутагенов**.

**Спонтанные мутации** - это повреждения ДНК, которые проис-

ходят с определенной скоростью на фоне естественных условий среды и вызваны эндогенными факторами. Частота спонтанных мутаций у млекопитающих в среднем составляет  $1 \times 10^5$  (одна мутация на 100 тыс. гамет), в некоторых локусах эта частота выше. Например, для гена гемофилии она составляет  $3 \times 10^5$ , ретинобластомы -  $6 \times 10^6$ , миодистрофии Дюшена -  $8 \times 10^5$ .

**Индукцированные мутации** вызваны действием мутагенных факторов, которые повреждают структуру ДНК.

Различают мутагены физические, химические и биологические (вирусы и транспозоны). **Физические мутагены:**

**УФ-лучи** - вызывают образование пиримидиновых (тиминовых) димеров (рис. 71), **рентгеновские лучи** - одно- и двухцепочечные разрывы ДНК, **ионизирующее излучение** - размыкание гетероциклов азотистых оснований или образование кольцевых хромосом.

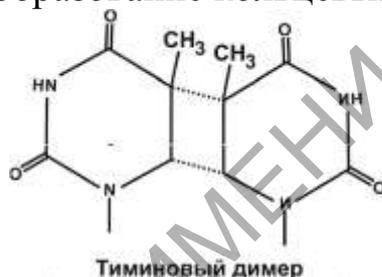


Рисунок 71 – Образование ковалентных связей между двумя соседними остатками тимина в цепи ДНК под действием УФ-лучей.

**Химические мутагены:**

**Азотистая кислота и ее соли** - вызывают дезаминирование оснований (происходит потеря аминогруппы). При дезаминировании цитозин превращается в урацил, аденин в гипоксантин (рис. 72).

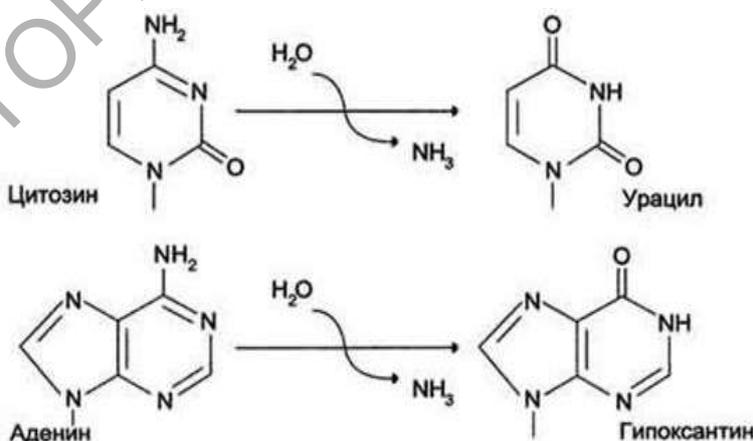
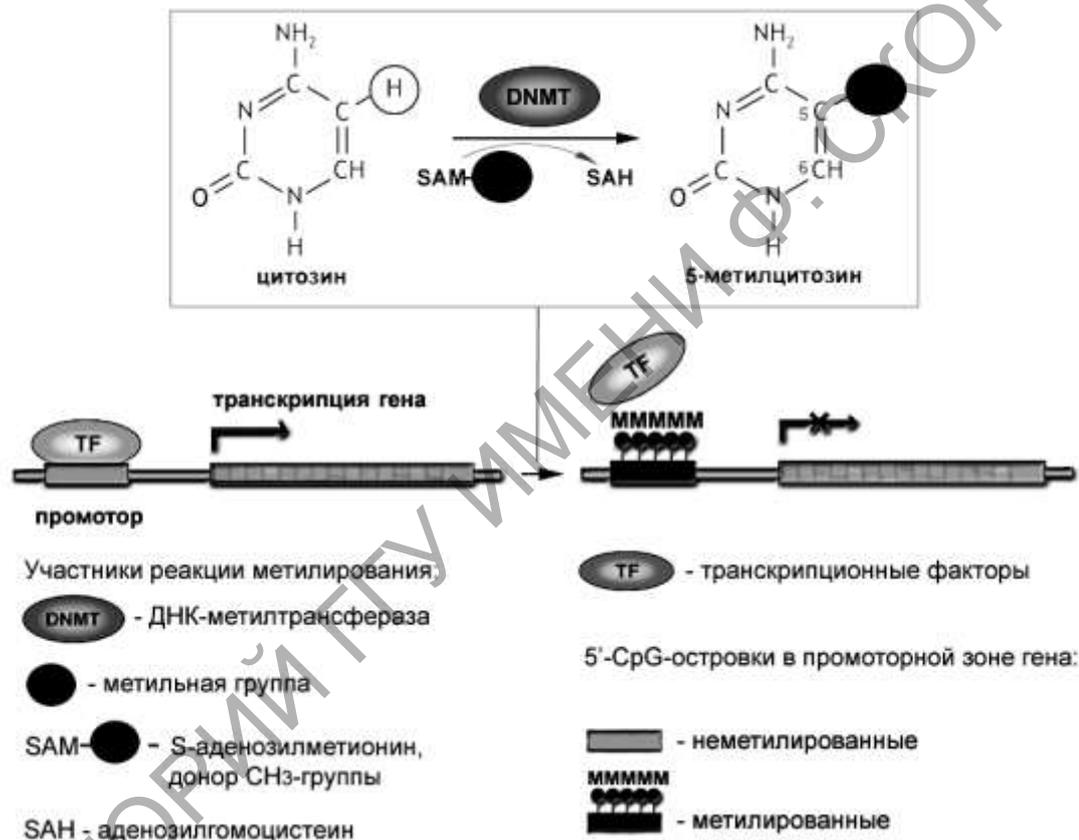


Рисунок 72 - Дезаминирование оснований. Под действием азотистой кислоты цитозин превращается в урацил. Аденин превращается в гипоксантин, который образует водородные связи с цитозином. Это приводит к замене пары А-Т на пару Г-Ц в следующем цикле репликации.

**Алкилирующие агенты** (нитрозогуанидин, этилметансульфонат) вызывают метилирование оснований. Метилирование (алкилирование) азотистых оснований заключается в присоединении метильной группы ( $\text{CH}_3$ ) к гуанину или цитозину. В результате метилирования гуанин превращается в метилгуанозин, который имеет сходство с аденином. Пара Г-Ц заменяется на пару А-Т. Метилирование цитозина в молекуле ДНК связано с механизмом регуляции экспрессии генов эукариот, а также с узнаванием ферментами репарации корректной (материнской) цепи ДНК (рис. 73).



**Рисунок 73 – Образование 5-метилцитозина в результате присоединения метильной группы  $\text{CH}_3$ .**

**Неалкилирующие агенты** (формальдегид и гидроксилламин) - вызывают различные модификации оснований.

**Интеркалирующие агенты** (к ним относятся бромистый этидий, акридиновый оранжевый, компонент табачного дыма бензипирен, препараты химиотерапии) - встраиваются в молекулу ДНК и приводят к мутациям типа сдвига рамки считывания.

**Апуринизация** (потеря азотистых оснований) – происходит вследствие разрыва гликозидной связи между пурином и дезоксири-

бозой при повышении температуры или спонтанно (частота 5000 - 10000/сутки).

**Спонтанные замены оснований** происходят во время репликации ДНК. Причиной «ошибок» репликации являются:

- таутомеризация,
- внедрение аналогов азотистых оснований в цепь ДНК,
- нарушение корректирующей функции ДНК-полимераз.

*Таутомеризация* – это явление существования молекул в виде изомеров, которые различаются только положением протонов и двойных связей. В результате таутомеризации аминогруппа  $\text{NH}_2$  превращается в иминогруппу  $\text{NH}$ , кетогруппа  $\text{C}=\text{O}$  превращается в енольную группу  $\text{C}-\text{OH}$ . Атомы водорода азотистых оснований могут менять положение и образовывать таутомеры, которые образуют нестандартные пары во время репликации, например:  $\text{A}^* - \text{Ц}$ ,  $\text{Г}^* - \text{Т}$  (таутомеры обозначены \*) (рис. 74).

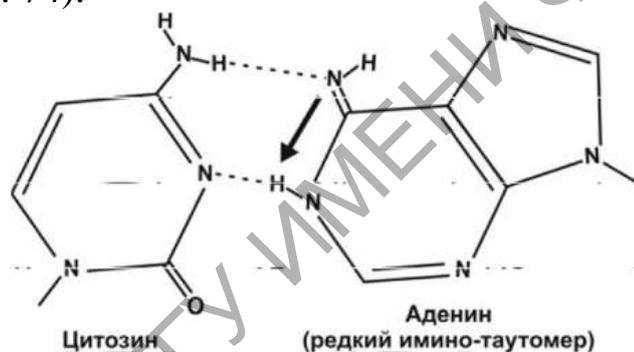


Рисунок 74 – Редкая форма аденина (иминотаутомер) образует пары с цитозином. Тогда пара А - Т в дочерней цепи замещается на Г-Ц пару.

#### **Аналоги азотистых оснований:**

1) 5-бромурацил (БУ) является аналогом тимина, который часто встраивается в ДНК во время репликации и обычно образует пару с аденином. Редкая таутомерная форма 5-БУ образует пару с гуанином. При этом пара АТ в матричной цепи во время следующего цикла репликации заменяется на пару ГЦ (рис. 75).

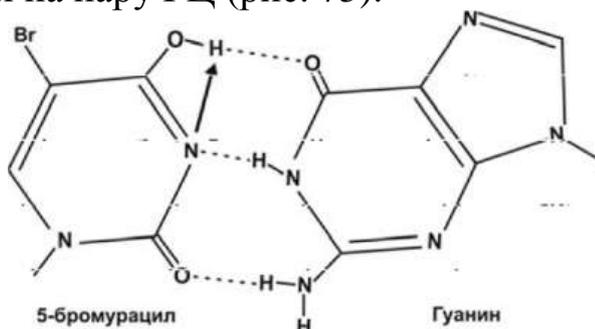


Рисунок 75 – Таутомерная форма 5-бромурацила образует пару с гуанином.

#### 4. Гены-мутаторы и “горячие точки мутаций”.

Мутации, повышающие скорость мутирования, закрепляются во многих эволюционных экспериментах на бактериях. Гены, несущие такие мутации, называют **генами-мутаторами** или просто **мутаторами**.

К генам-мутаторам относятся многие гены системы репарации ДНК и гены, кодирующие ферменты матричного синтеза нуклеиновых кислот. Описаны мутационные замены отдельных аминокислотных остатков в ДНК-полимеразах, которые понижают специфичность выбора дезоксирибонуклеозидтрифосфатов из внутриклеточного пула в соответствии с последовательностью матричной ДНК, что приводит к повышению частоты включения некомплементарных матрице нуклеотидов в строящиеся цепи ДНК. Так, например, мутация в гене ДНК-полимеразы фага Т4 может привести к возникновению дефектного фермента, что в свою очередь обусловит увеличение частоты как транзиций, так и трансверсий при репликации ДНК. У многих различных организмов, в том числе у *E. coli* и у дрозофилы, известны гены-мутаторы, увеличивающие частоту мутаций. У *E. coli* мутация *mut S* повышает частоту обоих типов замен, тогда как мутация *mut T* индуцирует лишь трансверсии АТ → Г.

Сам процесс включения некомплементарных матрице нуклеотидов является лишь одной из стадий, критических для контроля точности репликации ДНК. Благодаря наличию у ДНК-полимераз корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активности ошибочно включенные некомплементарные матрице нуклеотиды удаляются из строящейся цепи ДНК, что защищает ее от точковых мутаций, возникающих по такому механизму.

Мутации, нарушающие функционирование корректирующей экзонуклеазной активности, приводят к возникновению мутаторного фенотипа, также как и нарушения функционирования систем рекомбинации, транскрипции, систем контроля структуры хроматина, ферментных систем, контролирующих сегрегацию хромосом и число копий индивидуальных генов, и систем, участвующих в синтезе эндогенных мутагенов. Нарушения функционирования и координации экспрессии генов метаболизма нуклеотидов также приводят к мутаторному фенотипу.

**Горячие точки** – участки генов (ДНК), характеризующиеся особенно высокой мутабельностью.) это позиция последовательности, в которой мутации возникают с повышенной частотой относительно других позиций. Особенности контекста «горячих» точек возникно-

вения мутаций в полинуклеотидной последовательности могут иметь жесткую локализацию, относительно этих точек или располагаться на варьирующем расстоянии вблизи этих точек.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

## ЛЕКЦИЯ 10 РЕПАРАЦИЯ ДНК

1. Типы повреждений ДНК.
2. Механизмы репарации повреждений ДНК: прямая репарация, эксцизионная репарация.
3. Пострепликативная (рекомбинационная) репарация. SOS-репарация.
4. Системы защиты ДНК: процессы рестрикции и модификации.

### 1. Типы повреждения ДНК.

**Репарация (от лат. reparatio – восстановление)** – особая функция клеток, позволяющая исправлять химические повреждения и разрывы в молекулах ДНК, возникающие при нормальном биосинтезе ДНК в клетке или в результате воздействия физических или химических реагентов. Осуществляется специальными ферментными системами клетки.

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

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

Каждая из систем репарации включает следующие компоненты:

а) ДНК-хеликаза – фермент, «узнающий» химически изменённые участки в цепи и осуществляющий разрыв цепи вблизи от повреждения;

б) ДНКаза (дезоксирибонуклеаза) – фермент, «разрезающий» 1 цепочку ДНК (последовательность нуклеотидов) по фосфодиэфирной связи и удаляющий повреждённый участок: экзонуклеаза работает на концевые нуклеотиды 3' или 5', эндонуклеаза – на нуклеотиды, отличные от концевых;

в) ДНК-полимераза – фермент, синтезирующий соответствующий участок цепи ДНК взамен удалённого;

г) ДНК-лигаза – фермент, замыкающий последнюю связь в полимерной цепи и тем самым восстанавливающий её непрерывность.

У бактерий имеются по крайней мере 3 ферментные системы, ведущие репарацию – прямая, эксцизионная и пострепликативная. У эукариот к ним добавляется ещё Mismatch и SOS-репарация

## 2. Механизмы репарации повреждений ДНК: прямая репарация, эксцизионная репарация.

Начало изучению репарации было положено работами А. Келнера США, который в 1948 году обнаружил явление фотореактивации – уменьшение повреждения биологических объектов, вызываемого ультрафиолетовыми лучами, при последующем воздействии ярким видимым светом.

В 1958 году был выделен фермент – **фотолиаза**, осуществляющий фотореактивацию.

Первоначально способность к репарации была обнаружена у бактерий, подвергавшихся воздействию ультрафиолетового излучения. В результате облучения целостность молекул ДНК нарушалась, так как в ней возникали **димеры** (рис. 76), т. е. сцепленные между собой соединения в области оснований. Димеры образуются между:

-  двумя тиминами;
-  тиминном и цитозином;
-  двумя цитозинами;
-  тиминном и урацилом;
-  двумя урацилами.

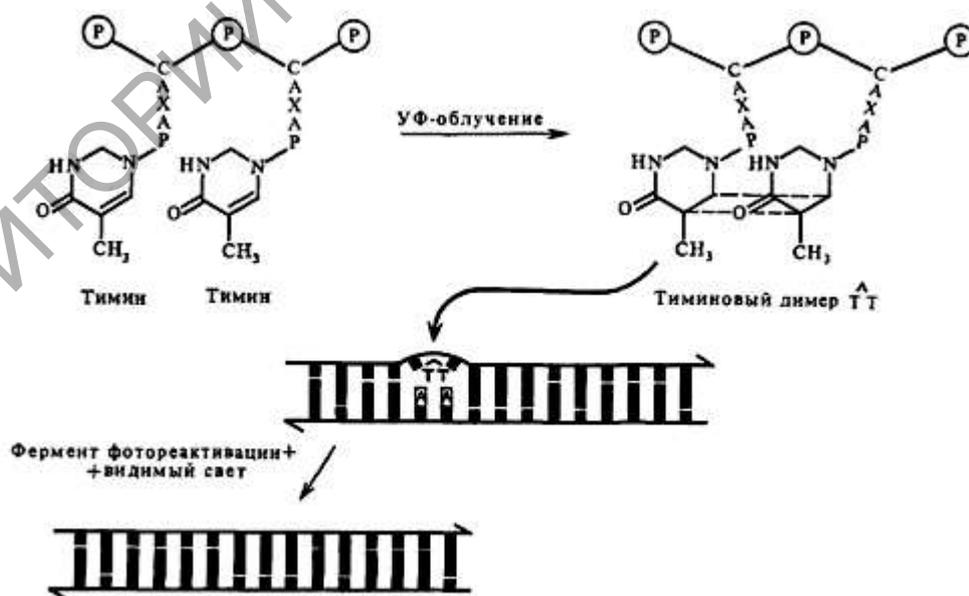


Рисунок 76 – Образование димера и его устранение при световой репарации.

Облученные клетки на свету выживали гораздо лучше, чем в темноте. После тщательного анализа причин было установлено, что в облученных клетках на свету происходит репарация. Она осуществляется специальным ферментом, активирующимся квантами видимого света. Фермент соединяется с поврежденной ДНК, разъединяет возникшие в димерах связи и восстанавливает целостность нити ДНК.

Механизм (рис. 77): под влияние УФ-лучей образуются димеры пиримидиновых оснований. Фотолиаза расщепляет вновь образующиеся связи между пиримидиновыми основаниями и восстанавливает структуру ДНК. Свет активирует фотолиазу, которая узнает димеры облученной ДНК, присоединяется к ним и разрывает возникающие связи.



Рисунок 77 – Схема фотореактивации.

Если первоначально способность к фотореактивации была обнаружена у микроорганизмов, то в дальнейшем фотореактивирующие ферменты были найдены в клетках некоторых рыб, птиц, амфибий, насекомых, высших растений и водорослей.

Длительное время этот вид репарации не удавалось обнаружить у млекопитающих и человека. Только в 1969 году было доказано, что способностью к фотореактивации обладают клетки сумчатых животных. Объясняли этот факт особенностями биологии этих древнейших обитателей Земли: полагали, что наличие фотореактивирующего фермента у сумчатых животных имеет исключительную важность, так как только у них (среди других млекопитающих) зародыш под-

вергается действию солнечного света (в том числе и ультрафиолетового облучения) в процессе переноса его в сумке матери.

Исследования последних лет указывают на возможность наличия фотореактивирующего фермента в клетках кожи человека; может быть, поэтому массивное ультрафиолетовое облучение, например при загаре, не вызывает повреждений генетического аппарата человека.

Позднее при изучении генетического контроля чувствительности бактерий к УФ-свету и ионизирующим излучениям была обнаружена темновая репарация – свойство клеток ликвидировать повреждения в ДНК без участия видимого света.

Механизм темновой репарации облученных УФ-светом бактериальных клеток был предсказан *А. П. Говард-Фландерсом* и экспериментально подтвержден в 1964 году *Ф. Ханавальтом* и *Д. Петиджоном* (США). Было показано, что у бактерий после облучения происходит вырезание поврежденных участков ДНК с измененными нуклеотидами и ресинтез ДНК в образовавшихся пробелах. Специфические ферменты узнают поврежденный участок ДНК и вырезают его.

Механизмы темновой репарации принципиально отличны от механизма фотореактивации. Первое отличие заключается в том, что если во время реакции на свету фотореактивирующий фермент расщепляет сцепленные ультрафиолетовым облучением участки молекулы ДНК, то в ходе темновой репарации поврежденные участки удаляются из молекулы ДНК. Второе отличие связано с числом «вылечиваемых» повреждений. Фотореактивирующий фермент активен в отношении только одного типа повреждений ДНК – образования димеров тимина под действием ультрафиолетового облучения. Ферменты же, осуществляющие темновую репарацию, способны устранять различные структурные нарушения ДНК, появляющиеся вследствие всевозможных воздействий на клетки – и химических, и радиационных. В результате темновой репарации осуществляется своеобразное молекулярное «хирургическое» вмешательство: поврежденные участки «вырезаются», а образовавшиеся «бреши» заполняются путем локального (местного) синтеза или обмена участками между поврежденной и неповрежденной нитями ДНК, в результате чего и восстанавливается ее исходная нормальная структура.

Темновая эксцизионная репарация осуществляется в несколько этапов комплексом из пяти ферментов (рис. 78):

- узнающего химические изменения на участке цепи ДНК;
- осуществляющего врезку вблизи поврежденного участка ДНК;

- ✚ удаляющего этот участок;
- ✚ синтезирующего новый участок по принципу комплементарности взамен удаленного фрагмента;
- ✚ соединяющего концы старой цепи и восстановленного участка.

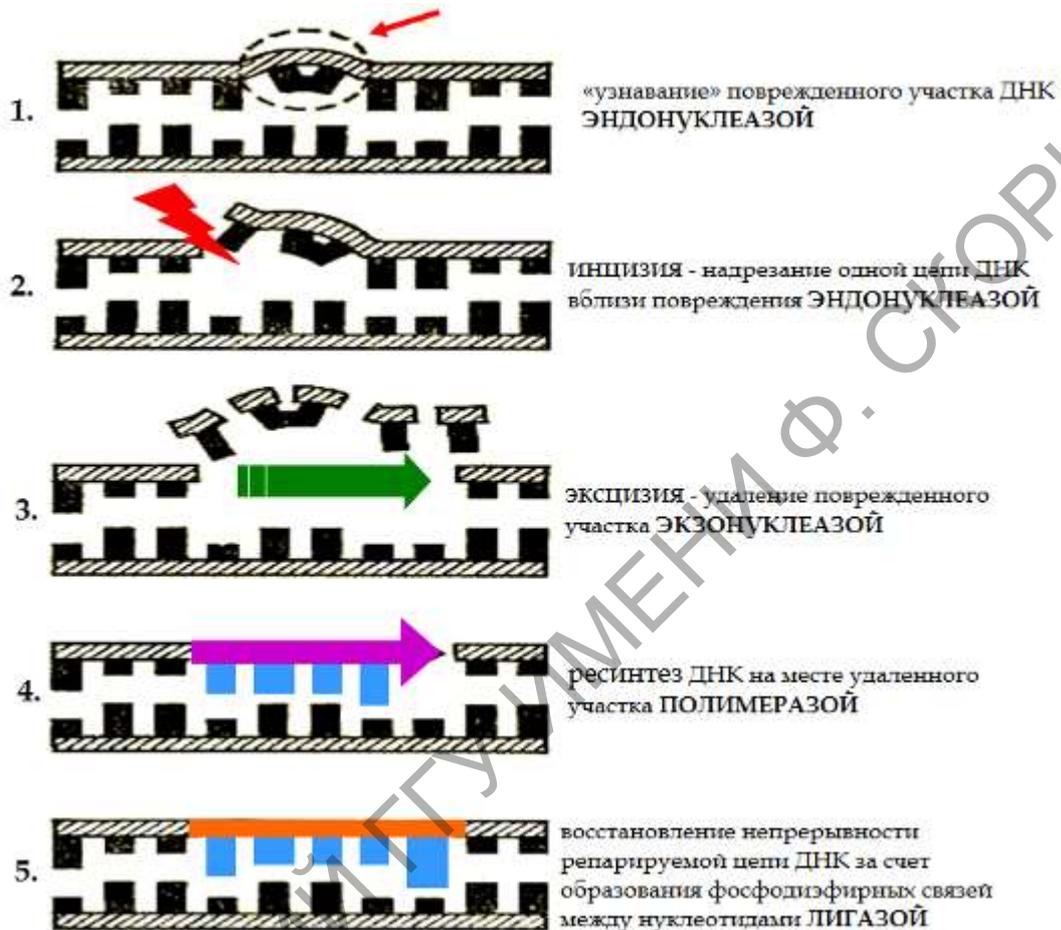


Рисунок 78 – Схема темновой эксцизионной репарации.

Таким образом, при световой репарации исправляются повреждения, возникшие только под воздействием ультрафиолетовых лучей. Темновая репарация, в отличие от фотореактивации, универсальна. Она устраняет различные структурные повреждения ДНК, появляющиеся в результате разнообразных радиационных и химических воздействий. Способность к темновой репарации обнаружена у всех клеточных систем и организмов.

Детально изучены два типа темновой репарации – эксцизионная и пострепликативная. При эксцизионной репарации поврежденный участок ДНК вырезается и замещается до начала очередного цикла размножения клетки, точнее до начала удвоения (репликации) молекул ДНК. Биологический смысл этого процесса состоит в том, чтобы предупредить закрепление у потомства наследственных изменений

(мутаций) и последующее размножение измененных форм.

Эксцизионная репарация – наиболее экономичная и эффективная форма генетической репарации. Установлено, что при ее нормальном функционировании у микроорганизмов до начала репликации ДНК удаляется до 90% имеющихся генетических повреждений, из клеток высших организмов – до 70%.

### **3. Пострепликативная (рекомбинационная) репарация. SOS-репарация.**

Пострепликативная репарация или **SOS-репарация** была открыта в клетках *E.coli*, не способных выщеплять тиминовые димеры. Тип репарации, имеющей место в тех случаях, когда процесс эксцизионной репарации недостаточен для полного исправления повреждения: после репликации с образованием ДНК, содержащей поврежденные участки, образуются одноцепочечные бреши, заполняемые в процессе гомологичной рекомбинации при помощи белка RecA.

Это единственный тип репарации, не имеющий этапа узнавания повреждения. При ней индуцируется синтез белка, который присоединяется к ДНК-полимеразному комплексу и делает возможным строить дочернюю ДНК напротив дефектных звеньев матричной цепи. В результате ДНК удвоена, с ошибкой, но это дает провести клеточное деление.

Пострепликативная репарация – последняя возможность для клетки устранить имеющиеся генетические повреждения, защитить потомство от изменения наследственных признаков. Если в ДНК возникает так много повреждений, что в ходе эксцизионной репарации клетка не успевает их полностью устранить, или если повреждены гены, определяющие возможность эксцизионной репарации, то в процессе размножения (удвоения, репликации) ДНК в дочерних нитях на месте повреждений, имеющихся в материнской нити, образуются «бреши». Это происходит в силу того, что фермент, ведущий репликацию ДНК (синтез дочерней нити на материнской нити ДНК), не может «прочитать» искаженную информацию в поврежденной точке материнской нити. Поэтому, доходя до поврежденного места, оставшегося неисправленным во время эксцизионной репарации, этот фермент останавливается, затем медленно (со скоростью в сотни раз меньшей, чем обычно) проходит через зону повреждения и возобновляет нормальный синтез дочерней нити, отступая от этого места. Так

происходит во всех точках, где материнская нить ДНК остается поврежденной к началу репликации.

Конечно, если число повреждений слишком велико, репликация останавливается полностью и клетка погибает. Но и существовать с молекулами ДНК, несущими бреши, клетка долго не может. Поэтому после репликации, но перед делением клетки начинается процесс пострепликативной репарации. Перед делением клетки в ней образуются две двунитевые молекулы ДНК. Если одна из них несет в какой-либо точке повреждение в одной нити и брешь в противоположной нити, то в другой двунитевой молекуле ДНК обе нити в данной точке будут нормальными. В этом случае может произойти обмен участками ДНК – рекомбинация: неповрежденный участок будет вырезан из нормальной молекулы ДНК и вставлен на место поврежденного участка в другой молекуле, благодаря чему поврежденный генетический материал будет заменен нормальным. Вслед за этим специальные ферменты (ДНК-полимеразы) заделают «бреши» (теперь они смогут это сделать, т. к. в обеих молекулах в данном месте повреждения будут отсутствовать), вновь синтезированные и старые нити будут соединены друг с другом, и исходная структура ДНК будет в результате этого полностью восстановлена (рис. 79).

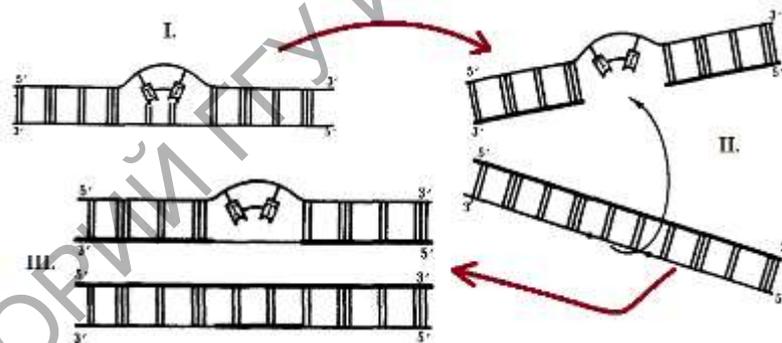


Рисунок 79 – Схема пострепликативной репарации ДНК: I – возникновение тиминового димера в одной из цепей ДНК; II – образование «бреши» во вновь синтезируемой цепи против измененного участка материнской молекулы после репликации (стрелкой показано последующее заполнение «бреши» участком из соответствующей цепи второй дочерней молекулы ДНК); III – восстановление целостности дочерней цепи верхней молекулы за счет рекомбинации и в нижней молекуле за счет синтеза на комплементарной цепи.

В соответствии с природой процесса, связанного с осуществлением рекомбинации, этот тип пострепликативной репарации называют также рекомбинационным.

#### 4. Системы защиты ДНК: процессы рестрикции и модификации.

Явление рестрикции и модификации было открыто г. Бергани, Дж. Вайглем в 1953 г. Далее подробно исследовано в конце 1960-х гг. В. Арбером при изучении развития бактериофага  $\lambda$  в различных штаммах кишечной палочки. Им были обнаружены дополнительные механизмы, регулирующие взаимоотношения бактерий и фагов. На основании открытых механизмов, автором была предложена модель «Рестрикции и модификации». Это теория, которая объясняет механизм ограничения способности роста бактериофагов в бактериях-хозяевах определенного штамма.

Позже, за открытие рестриктаз и их применение в молекулярной генетике В. Арбер, Х. Смит и Д. Натанс были удостоены в 1978 г. Нобелевской премии.

*Система рестрикции-модификации (R-M)* – ферментативная система бактерий, разрушающая попавшую в клетку чужеродную ДНК. Основная её функция – защита клетки от чужеродного генетического материала, например, бактериофагов и плазмид. Для компонентов системы характерны два типа активности – метилтрансферазная (метилязная) и эндонуклеазная. За каждую из них могут отвечать как отдельные белки, так и один белок, сочетающий в себе обе функции.

Система рестрикции-модификации специфична по отношению к определённым последовательностям нуклеотидов в ДНК, называемых сайтами рестрикции. Если определённые нуклеотиды в последовательности не метилированы, эндонуклеаза рестрикции вносит в ДНК двуцепочечный разрыв (часто – со смещением на несколько нуклеотидов между цепями), при этом биологическая роль молекулы ДНК нарушается. В случае, когда метилирована только одна из цепей ДНК, расщепления не происходит, вместо этого метилтрансфераза добавляет метильные группы к нуклеотидам второй цепи. Подобная специфичность R-M позволяет бактериям проводить селективное расщепление чужеродной ДНК, не затрагивая собственную. В норме вся ДНК в бактериальной клетке либо полностью метилирована, либо полностью метилирована только по одной цепи (сразу после репликации). Напротив, чужеродная ДНК не метилирована и подвергается гидролизу.

## ЛЕКЦИЯ 11

### РУКОМБИНАЦИЯ ДНК

1. *Понятие рекомбинации.*
2. *Общая, гомологичная, или законная рекомбинация.*
3. *Сайт-специфическая рекомбинация.*
4. *Случайная, негомологичная или незаконная рекомбинация.*

#### 1. Понятие рекомбинации.

*Генетическая рекомбинация* – это важный процесс реорганизации генетического материала, обусловленный обменом отдельными сегментами двойных спиралей ДНК, приводящий к возникновению новых комбинаций генов. Она получила развитие у всех живых организмов: у эукариот, у бактерий и даже у вирусов, в том числе таких, генетический материал которых представлен РНК.

Рекомбинация может происходить путем обмена клеточными ядрами, целыми молекулами ДНК или частями молекул. В то время как процессы репликации и репарации ДНК обеспечивают воспроизведение и сохранение генетического материала, рекомбинация приводит к генетической изменчивости.

Генетическая рекомбинация состоит в образовании ковалентных связей между нуклеотидными последовательностями из разных областей одной и той же или разных молекул ДНК. В процессе рекомбинации с помощью ферментов две спирали ДНК разрываются, обмениваются участками, после чего непрерывность спиралей восстанавливается.

Рекомбинация между близко расположенными гомологичными хромосомами приводит к интенсивной перестановке отцовских и материнских генов в ходе мейоза и тем самым создает предпосылки для эволюционной проверки новых сочетаний этих генов в потомстве. Как правило, рекомбинационные события, происходящие в соматических клетках либо во время репликации ДНК, либо после нее и проявляющиеся в виде обмена сестринских хроматид, не приводят к изменению генотипа или фенотипа клетки.

Существуют 3 типа рекомбинации:

- 1) общая, гомологичная, или законная
- 2) сайт-специфическая,
- 3) случайная, негомологичная или незаконная.

## 2. Общая, гомологичная, или законная рекомбинация

В основе молекулярного механизма законной генетической рекомбинации лежит принцип "разрыв-воссоединение" двух гомологичных молекул ДНК. Этот процесс называют кроссинговер, он включает несколько промежуточных этапов:

- 1) узнавание участков;
- 2) разрыв и **реципрокное** (крест-накрест) воссоединение молекул (рис. 80): замена одних цепей гомологичными;

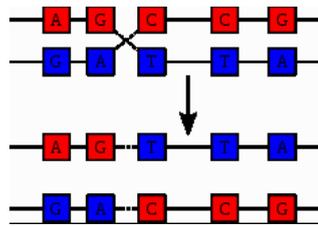


Рисунок 80 – Разрыв и реципрокное воссоединение молекул

3) устранение ошибок, возникающих в результате неправильного спаривания участков.

Гомологичная рекомбинация начинается с возникновения в одном или обоих дуплексах участков из одиночных цепей ДНК, которые затем с помощью специальных белков находят комплементарные последовательности в гомологичном дуплексе и образуют с ними **гетеродуплекс** (рис. 81) – ключевой промежуточный продукт (интермедиат) рекомбинации.

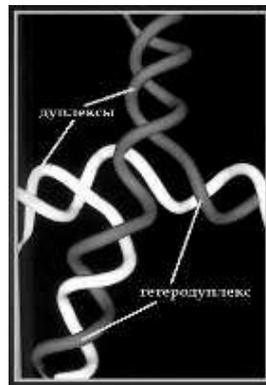


Рисунок 81 – Схема спаривания двух гомологичных спиралей и образование гетеродуплекса.

Конечным результатом рекомбинации будет обмен равными частями гомологичных молекул. Обычно общая рекомбинация происходит между гомологичными и аллельными участками разных молекул ДНК, но она может произойти и между гомологичными, но неаллельными областями рекомбинирующих молекул. В этом случае один

из продуктов рекомбинации утрачивает часть ДНК, а другой приобретает "лишний" сегмент. Такой процесс получил название **неравного кроссинговера**. Иногда рекомбинация происходит между неаллельными участками одной и той же хромосомы с соответствующей потерей области, лежащей между сайтами рекомбинации.

В отличие от уже рассмотренных случаев некоторые рекомбинационные события **нереципрокны**; как следствие, один из образовавшихся продуктов идентичен одной из исходных молекул, а другой отличается от обоих партнеров. Такой процесс часто называется **генной конверсией**.

**Модель Холлидея.** Рассмотрение гомологичной рекомбинации невозможно без общей модели кроссинговера, опубликованной в 1964 году американским генетиком Р. Холлидеем. Она разработана для мейотического кроссинговера. Ядро мейотической клетки в профазе I содержит по четыре гомологичных хроматиды – **дуплексы**, но в каждом отдельном акте кроссинговера участвуют только две из них. В принципе для того, чтобы гомологичные молекулы ДНК поменялись своими частями, сначала должны произойти разрывы во всех цепях обоих дуплексов, а уже потом – обмен цепями и замыкание разрывов. У Холлидея разрывы происходят не одновременно, а в два этапа.

Рекомбинация начинается с первичных одноцепочечных разрывов фосфодиэфирных связей ДНК (их вносит фермент эндонуклеаза). Разрывы происходят в двух цепях одинаковой полярности. Холлидей также постулировал, что первичные разрывы возникают не в случайных, а в определенных сайтах ДНК. Впоследствии эта идея получила экспериментальное подтверждение. Далее от точек первичных разрывов происходит обмен цепями между дуплексами, который приводит к образованию крестообразной структуры, получившей впоследствии название "полухиазма Холлидея" (рис. 82).

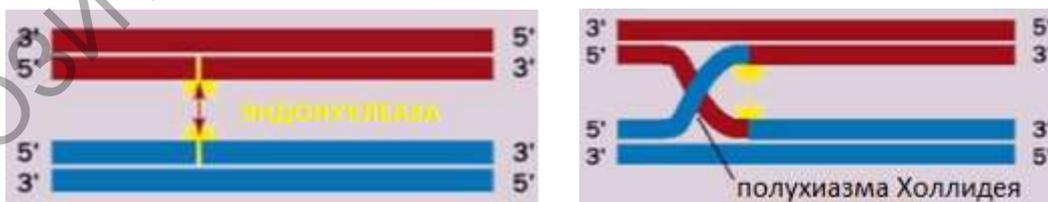


Рисунок 82 – Разрывы в дуплексах (слева) и образование "полухиазмы Холлидея" (справа).

Такое название объясняется тем, что в полухиазме в обмен вовлечены только две цепи ДНК из четырех, что отличает ее от полной хиазмы – характерного продукта заверщенного мейотического кроссинговера.

Затем происходит очень важный процесс – перемещение точки перекреста цепей в полухиазме вдоль рекомбинирующих дуплексов. Такое явление описано под названием "миграция ветвления" (рис. 83).

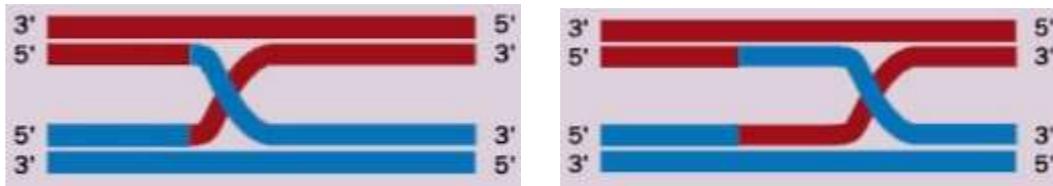


Рисунок 83 – "Миграция ветвления".

Оно заключается в следующем: от точки перекреста цепей происходит расплетание исходных дуплексов и высвобождающиеся цепи тут же ренатурируют с комплементарными цепями из гомологичных дуплексов, что приводит к образованию и последующему удлинению гетеродуплекса (B / b). Именно в удлинении гетеродуплекса и заключается биологический смысл миграции ветвления. Ее осуществляют специальные ферменты. Размеры гетеродуплекса при мейотическом кроссинговере колеблются от нескольких сот до одной тысячи п.н., при рекомбинации в соматических клетках и клетках прокариот он еще протяженнее.

Гетеродуплекс сформирован. Образовавшаяся сложная разветвленная структура должна разделиться на гомологи. Это называется разрешением полухиазмы (рис. 84).

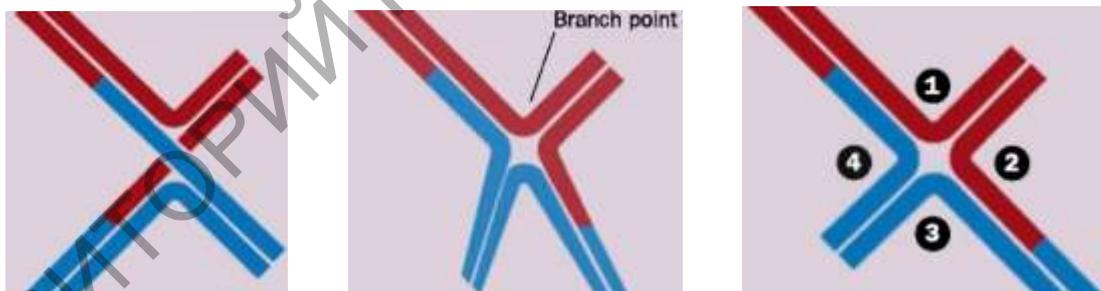


Рисунок 84 – Разрешение полухиазмы.

Для разрешения необходимы еще два разрыва цепей: вторичные разрывы завершат обмен цепями. Но прежде чем это случится, полухиазма должна претерпеть еще одно превращение – изомеризацию. Структура с перекрещенными цепями может существовать в различных стереоизомерных формах, возникающих в результате вращения составляющих ее элементов относительно друг друга. **Изомеризация** заключается в изменении структуры полухиазмы, которое происходит за счет обычного теплового движения молекул. Структуры в и в'

идентичны. В структуре  $v'$  происходит один поворот на 180 любой пары дуплексных сегментов (плеч).

Изомеризация, которая как и другие стадии рекомбинации контролируется генетически, изменяет положение двух пар цепей: две ранее перекрещивавшиеся цепи становятся неперекрещивающимися и наоборот.

Для того чтобы вновь восстановились две отдельные спирали ДНК и тем самым прекратился процесс спаривания, в каждой из двух перекрещенных цепей должен произойти разрыв. Если он происходит до того, как прошла изомеризация, то две исходные спирали ДНК отделяются друг от друга так, что у каждой из них генетически перестроенной оказывается только одна цепь. Если же разрыв двух перекрещенных цепей происходит после изомеризации, то обе молекулы ДНК претерпевают полную реорганизацию: часть каждой исходной спирали оказывается присоединенной (ступенчатым соединением) к части другой спирали.

Образовавшаяся структура может разрешиться двумя парами вторичных разрывов. Парные разрывы цепей одинаковой полярности 1-1 или 2-2 приводят к двум типам рекомбинантных хроматид: хроматиды первого типа содержат внутренний гетеродуплекс  $B/b$ , а по конфигурации фланговых маркеров  $A$  и  $C$  не отличаются от исходных (некроссоверные хроматиды); рекомбинантные хроматиды второго типа кроссоверные, они также содержат гетеродуплекс, но обмениваются частями по обе стороны от него (рис. 85).

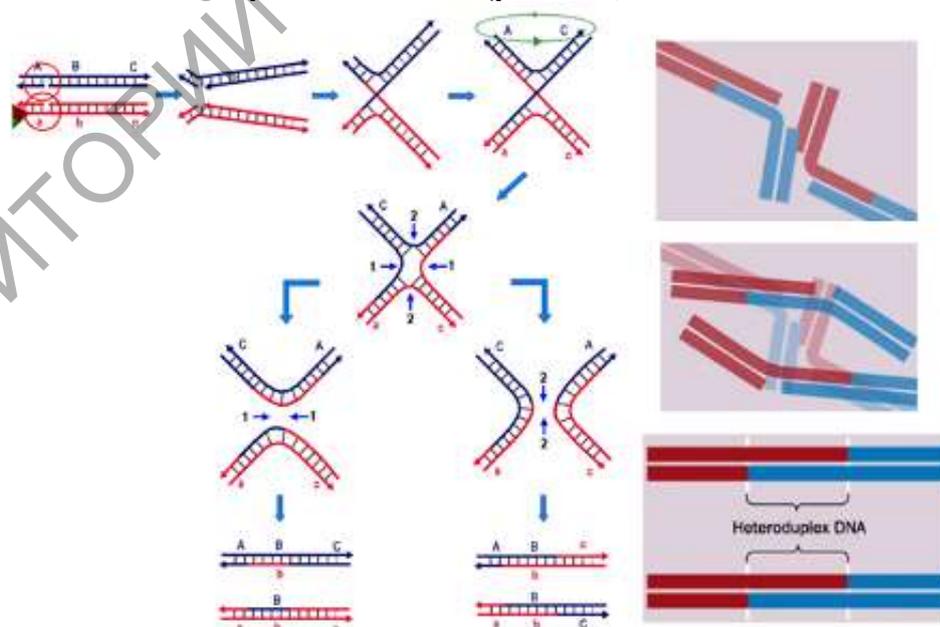


Рисунок 85 – Изомеризация полухиазмы.

Оба типа продуктов рекомбинации равновероятны, что соответствует генетическим данным, на которые опирался Холлидей при создании своей модели.

Законная генетическая рекомбинация приводит к возникновению новых комбинаций специфических аллелей, но не изменяет места расположения генов (локусов). От исходных молекул в рекомбинационный гетеродуплекс могут войти разные аллели, и тогда в нем возникнут неспаренные основания, которые локально нарушают структуру двойной спирали ДНК. Эти нарушения узнаются специальными ферментными системами, работающими по типу эксцизионной репарации. Они проводят коррекцию неспаренных оснований в гетеродуплексе: удаляют неспаренное основание в одной цепи ДНК и застраивают образующуюся брешь по матрице другого аллеля в комплементарной цепи, тем самым превращая (конвертируя) один аллель в другой. Это явление было давно известно под названием "**конверсия гена**", в её основе лежит коррекция гетеродуплекса.

Если гетерозиготная клетка  $A/a$  вступает в мейоз, то в норме среди продуктов мейоза оба аллеля гена  $A$  будут представлены в равном соотношении:  $2A : 2a$ . Однако если в районе хромосомы, где расположен ген  $A$ , произойдет кроссинговер, то сформируется гетеродуплекс  $A/a$  с локально неспаренными основаниями, что может привести к конверсии гена  $A$ : расщепление аллелей гена среди продуктов мейоза будет  $3A : 1a$  или  $1A : 3a$ . Расщепление по генам, расположенным вне участка кроссинговера, сохранит нормальное соотношение аллелей  $2 : 2$ . При разборе модели Холлидея становится ясно, что содержащие гетеродуплекс продукты рекомбинации с кроссинговером и без кроссинговера по внешним генам равновероятны, иными словами, конверсия гена в мейозе может одинаково часто сопровождаться и не сопровождаться обменом по внешним генам.

Модель Холлидея симметрична: первичные разрывы возникают одновременно в обоих гомологах и обмен цепями происходит синхронно. Однако имеются генетические данные об асимметричных обменах, полученные, в частности, на дрожжах. В этих случаях первичный разрыв возникает только в одном дуплексе, затем от точки разрыва отделяется одна цепь ДНК, которая внедряется в гомологичный дуплекс и в ходе последующей миграции ветвления вытесняет из него цепь той же полярности. После этого обмен превращается в симметричный.

Модель Холлидея в ее современном виде общепризнанна и универсальна для про- и эукариот (и для половых, и для соматических

клеток). Ее достоинством является тот факт, что она хорошо проверяется генетическими данными, и практически все ее этапы постепенно нашли экспериментальное подтверждение. Полухиазмы Холлидея хорошо видны под электронным микроскопом. Обнаружены специальные эндонуклеазы (их называют резолвазами), которые осуществляют разрешение полухиазмы. К настоящему времени такие резолвазы обнаружены у бактериофагов Т4 и Т7, *E. coli*, дрожжей и человека. У *E. coli* выявлены также белки, осуществляющие миграцию ветвления полухиазмы.

### 3. Сайт-специфическая рекомбинация.

Рекомбинация называется сайт-специфической, если сайты разрыва и воссоединения в двух рекомбинирующих молекулах или двух фрагментах одной и той же молекулы ДНК находятся в пределах довольно коротких специфических гомологичных нуклеотидных последовательностей (как правило, не более 25 нуклеотидов). Следовательно, сайт-специфическая рекомбинация происходит между специфическими сегментами дуплексов ДНК, не имеющими протяженных гомологичных участков. Такие короткие последовательности может иметь только один из партнеров или оба. В качестве примера первого варианта можно привести транспозиции некоторых мобильных элементов у про- и эукариот, а второго (рис. 86) – встраивание кольцевой ДНК фага  $\lambda$  в генофор *E. coli* и ее обратное выщепление.

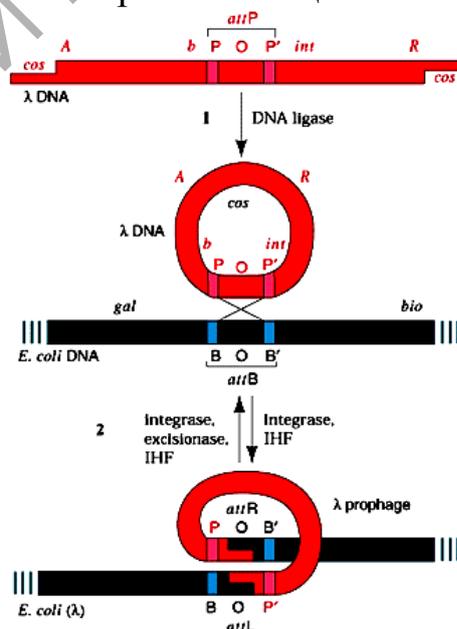


Рисунок 86 – Механизм сайт-специфической рекомбинации.

Рекомбинация происходит в пределах специфической нуклеотидной последовательности ДНК фага  $\lambda$  (attP-сайт) и уникальной последовательности ДНК *E. coli* (attB-сайт). Нуклеотидные последовательности attP- и attB-сайтов совершенно различны, хотя имеют общее ядро (O) протяженностью в 15 нуклеотидных пар. AttP (POP') простирается на 150 нуклеотидов влево (P) и на 75 нуклеотидов вправо (P') от общего ядра, а attB (BOB') – это сегмент длиной всего около 25 нуклеотидов, включая и ядро.

Поскольку нуклеотидные последовательности, фланкирующие attP- и attB-сайты слева (attL) и справа (attR), для этих сайтов различаются, механизм рекомбинационного выщепления ДНК фага  $\lambda$  из ДНК *E. coli* должен отличаться от механизма их рекомбинационной интеграции. И действительно, для рекомбинации между attL и attR при исключении фаговой ДНК помимо белка Int необходимы фаговый белок  $\chi$ is и клеточный белок HF. Процесс рекомбинационного выщепления, по-видимому, имеет некоторое сходство с процессом интеграции, но роль указанных трех белков, особенно белка  $\chi$ is, все еще изучается.

С помощью сайт-специфической рекомбинации происходят запрограммированные перестройки хромосомной ДНК при смене типов спаривания у дрожжей; она ответственна также за разнообразие антител.

#### **4. Случайная, негомологичная или незаконная рекомбинация.**

Изначально, термин незаконная рекомбинация был определен Франклином как рекомбинация между последовательностями с небольшими участками гомологии или не имеющими гомологии.

В настоящее время имеет смысл принять более широкое определение, которое исключает рекомбинационные события, являющиеся результатом нормальной или законной транспозиционной деятельности или деятельности специализированных рекомбинационных систем (например, инсерция и высвобождение ДНК). Франклин рассматривал, что незаконная рекомбинация может быть следствием ошибок в белках, ответственных за разрезание и сшивание или репликацию ДНК.

Незаконная генетическая рекомбинация имеет выраженный локальный характер. В этом случае весь процесс с его начальным этапом узнавания, который сводит вместе две спирали ДНК, направляет-

ся особым рекомбинационным ферментом; спаривания оснований здесь не требуется (даже в тех случаях, когда это все-таки происходит, в процессе участвует не более несколько пар оснований). К негомологичной рекомбинации можно отнести интеграцию транспозонов, процесс случайного встраивания вирусной или плазмидной ДНК в ДНК клеток животных.

При незаконной генетической рекомбинации в обмен вступают короткие специфические нуклеотидные последовательности одной или обеих спиралей ДНК, участвующих в этом процессе. Таким образом, такая генетическая рекомбинация изменяет распределение нуклеотидных последовательностей в геноме – соединяются участки ДНК, которые до этого не располагались в непрерывной последовательности рядом друг с другом. Подобный обмен гетерологическими участками ДНК приводит к возникновению вставок, делеций, дупликаций и транслокаций генетического материала.

У эукариот перемещения разных генетических элементов, сопряженные с незаконной генетической рекомбинацией, осуществляются преимущественно не в мейозе, когда контактируют парные хромосомы, а во время обычных клеточных циклов (митозе). Незаконная генетическая рекомбинация играет важную роль в эволюционной изменчивости, так как благодаря ей осуществляются самые разнообразные, нередко кардинальные, перестройки генома и, следовательно, создаются предпосылки для качественных изменений в эволюции данного организма.

## **2 Лабораторные занятия по «Молекулярной генетике»**

**1 Лабораторная работа** «Выделение геномной ДНК из эукариотических клеток» (4 часа).

**2 Лабораторная работа** «Конструирование и подбор праймеров для ПЦР» (2 часа).

**3 Лабораторная работа** «Подбор оптимальных условий и проведение ПЦР» (4 часа).

**4 Лабораторная работа** «Подбор оптимальных условий и проведение гель-электрофореза» (2 часа).

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1

## ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

**Цель работы:** Ознакомиться с методами выделения геномной ДНК из эукариотических клеток.

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

### **Растворы и реактивы:**

50 mM NaOH  
1M Трис-HCl  
фенол  
хлороформ  
70 или 96%-ный этанол.

### **Необходимое оборудование:**

центрифуга-вортекс «Eimi»  
термостат «Гном»  
пробирки для центрифугирования  
весы аналитические.  
бумажные фильтры.  
пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл.

### **Практическая часть**

**Задание 1.** Произвести забор буккального эпителия.

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

После гигиены полости рта (тщательно сполоснуть рот водой) чистыми руками взять ватный аппликатор (щеточку) и держа его за пластиковый стержень, потереть наконечником с внутренней стороны щечных поверхностей в течение 2-3 мин (избегая контакта с зубами и медленно поворачивая наконечник для сбора клеток). ДНК из собранных клеток должна быть выделена в течение 24 часов.

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

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

Метод щелочной экстракции ДНК из буккальных клеток.

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

2. Пробы устанавливаем в твердотельный термостат «Гном» и инкубируем пробы в течение 5 мин при 95<sup>0</sup>С.

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

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

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

6. Супернатант (надосадочную жидкость) с растворенной в нем ДНК отбирают отдельным наконечником и переливают в новые маркированные пробирки. По окончании этой процедуры пробы готовы к постановке ПЦР. Пробирки с разаликваченным (разделенным на равные части) раствором, содержащим ДНК хранят в морозильной камере (t<sub>≈</sub>-200С). Срок годности проб не менее 5 лет.

**Задание 3.** Выделить образец ДНК из буккальных клеток (клетки эпителия щеки) по методу фенольной экстракции ДНК.

Для выделения геномной ДНК разрушают плазматическую и ядерную мембраны и освобождаются от клеточных белков. Удаление белков часто проводят с помощью экстракции из водных растворов нуклеиновых кислот фенолом и (или) хлороформом.

Метод фенольной экстракции ДНК.

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

2. Содержимое пробирки размешивают, пока не образуется эмульсия.

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

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

5. Добавляют равный объем смеси фенола и хлороформа (1:1). Повторяют стадии 2-4.
6. Добавляют равный объем хлороформа, и повторяют стадии 2-4.
7. Осаждают ДНК этанолом и собирают ее отдельным наконечником в новые маркированные пробирки. По окончании этой процедуры пробы готовы к постановке ПЦР. Пробирки с разаликвоченным (разделенным на равные части) раствором, содержащим ДНК хранят в морозильной камере ( $t \approx -200^{\circ}\text{C}$ ).

### **Теоретическая часть**

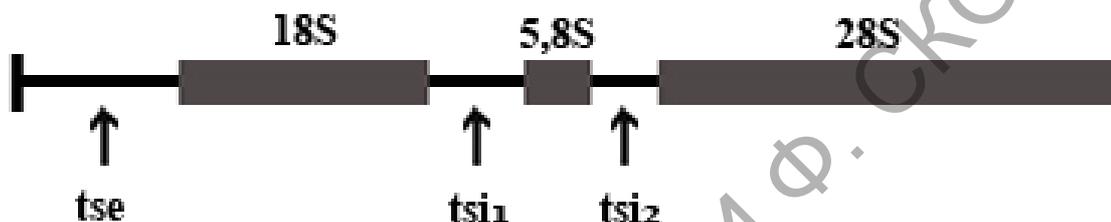
1. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин. Мн.: Высшая школа, 2005.
2. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Альбертс и др. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.
3. ЭУМК Молекулярная генетика. **Лекция 3.**

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2 «КОНСТРУИРОВАНИЕ И ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПЦР»

**Цель работы:** Научиться подбирать и конструировать праймеры для амплификации исследуемого фрагмента ДНК.

### Практическая часть

**Задание 1.** У эукариотических организмов рибосомальные гены представлены в виде **кластеров**, расположенных группами на разных хромосомах. В каждый кластер входит три – 18S, 5,8S и 28S **рибосомальных** гена, разделенных участками – так называемыми **спейсерами** (рис.1).



**Рис. 1**-Схема строения рибосомального кластера: tse – внешний спейсер и tsi – внутренние спейсеры.

Весь кластер содержит около 13000 нуклеотидных пар. Имеется два внутренних спейсера tsi<sub>1</sub> и tsi<sub>2</sub>, а также один внешний – tse. Ученые с успехом используют рибосомальные гены для видовой диагностики, поскольку спейсерные участки очень изменчивы по длине и нуклеотидному составу.

При диагностике описторхоза – заболевания человека и животных, вызываемых кошачьей двуусткой (*Opisthorchis felineus*) в качестве маркера часто используется второй внутренний спейсер (tsi<sub>2</sub>), размером около 300 н.п.

Последовательность нуклеотидов ДНК спейсерного участка tsi<sub>2</sub> (выделен черным) и 38 нуклеотидов прилегающих 5,8 и 28S рибосомальных генов у *O. felineus* представлена ниже ([www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) ID: EF688132.1).

```
1 5' ccacgcctgt ccgagggtcg gcttataaac tatcacgacg cccaaaaagt cgtggcttgg
61 gtcttgccag ctggcatgat ttccccacgc atttgtgtgg ggtgccggat ctatggcttt
121 tccccaatgt gccggacgca accatgtctg ggctgactgc ctggatgagg gggtgccggc
181 ggagtcgtgg ctcaattggt gttgttattg ttgtgaatgt gcgcgctccg ttgttggtcc
241 tttgtctttg gttgaggctc cagtgggtgc aatgcattcg atgcaaatct gttttgcact
301 tcggtgctta actttcctga cctcggatc 3'
```

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

**Задание 2.** Используя из предыдущего задания 1 приведенную последовательность 5'-3' спейсерного участка tsi<sub>2</sub> и нуклеотидов прилегающих районов у *O. felineus* найдите в ней участок, которому будет комплементарна-

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

**Задание 3.** Последовательность нуклеотидов участка  $tsi_2$  (выделен черным) и 38 нуклеотидов прилегающих 5,8 и 28S генов у *O. felineus* представлена ниже.

```
1 5' ccacgcctgt ccgagggtcg gcttataaac tatcacgacg cccaaaaagt cgtggcttgg
61 gtcttggcag ctggcatgat ttccccacgc atttgtgtgg ggtgccggat ctatggcttt
121 tccccaatgt gccggacgca accatgtctg ggctgactgc ctggatgagg gggtggeggc
181 ggagtcgtgg ctcaattggt gttgttattg ttgtgaatgt gcgcgctccg ttgttggtc
241 tttgtctttg gttgaggctc cagtgggtggc aatgcattcg atgcaaatct gttttgcact
301 tcggtgctta actttcctga cctcggatc 3'
```

Какова будет длина амплифицированного фрагмента ДНК, если используемые праймеры для амплификации (по Muller *et al*, 2007), имеют следующий состав:

прямой (F) 5'-CGAGGGTCGGCTTATAAAC-3'  
и обратный (R) 5'-AGCCTCAACCAAAGACAAAG-3'.

**Задание 4.** Молекулярные генетики в Новосибирском Академгородке используют для амплификации спейсерного участка  $tsi_2$  у *O. felineus* праймеры другого состава.

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

```
1 5' atattgceggc catgggtttg cctgtggcca cgctgtccg agggctggct tataaactat
61 cacgacgccc aaaaagtctg ggcttgggtc tggcagctg gcatgattc cccacgcatt
121 tgtgtggggg gccggateta tggcttttcc ccaatgtgcc ggacgcaacc atgtctgggc
181 tgactgcctg gatgaggggg tggcggcgga gtcgtggctc aattgttgtt gttattgttg
241 tgaatgtgcg cgtccgcttg ttggctcttt gtctttgggt gaggctccag tgggtggcaat
301 gcattcgatg caaatctggt ttgcacttctg gtgcttaact ttctgacct cggatcagac
361 gtgattacc gctgaattt 3'
```

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

**Задание 5.** Используя из предыдущего задания 4 приведенную последовательность 5'-3' спейсерного участка  $tsi_2$  и нуклеотидов, прилегающих районов ДНК у *O. Felineus*, найдите в ней участок, которому будет комплементарен обратный праймер (R) следующего состава:

5'-TCAGCGGG-TAATCACGTCT-3'.

**Задание 6.** Новосибирские генетики используют для амплификации спейсерного участка  $tsi_2$  у *O.felineus* праймеры следующего состава: (F) прямой 5'-CATGGGTTTGCCTGTGG-3' и (R) обратный 5'-TCAGCGGGTAAT-CACGTCT-3' (по Катохину и др., 2008).

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

```
1 5' atattgcggc catgggtttg cctgtggcca cgctgtccg agggtcggct tataaactat
61 cacgacgccc aaaaagtcgt ggcttgggtc ttgccagctg gcatgatttc cccacgcatt
121 tgtgtggggt gccggatcta tggettttcc ccaatgtgcc ggacgcaacc atgtctgggc
181 tgactgcctg gatgaggggg tggcgcgga gtcgtggctc aattgttggt gttattgttg
241 tgaatgtgcg cgctccggtt ttggtcttt gtctttgggt gaggtccag tgggtgcaat
301 gcattcgatg caaatctggt ttgcacttcg gtgcttaact ttcctgacct cggatcagac
361 gtgattaccc gctgaattt 3'
```

Какой длины будет амплифицированный фрагмент ДНК в этом случае?

### Теоретическая часть

1. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин. Мн.: Высшая школа, 2005.

2. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Альбертс и др. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.

3. ЭУМК Молекулярная генетика. Лекция 3.

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3 «ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР»

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

#### **Растворы и реактивы:**

выделенная ДНК  
ПЦР-смесь (PCR-Mix)  
праймеры (прямой (F) и обратный (R))  
деионизированная вода  
минеральное масло

#### **Необходимое оборудование:**

центрифуга-вортекс «Elmi»  
термостат «Гном»  
пробирки  
амплификатор  
пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл.

#### **Практическая часть.**

**Задание 1.** Провести амплификацию гена ACE *H. sapiens*.

Амплификация гена ACE *H. sapiens* проводится с использованием праймеров:

прямой (F) – 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT- 3',  
обратный (R) – 5'-ATGTGGCCATCACATTCGTTCAGAT-3'.

Реакционная стандартная ПЦР-смесь (PCR-Mix):

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

Общий объем реакционной ПЦР-смеси должен составить 24 мкл.

1. В пронумерованные реакционные пробирки для амплификации объемом 0,6 мл (Axugen) внести по 24 мкл смеси.

2. В пробирку с отрицательным контролем добавить 1 мкл деионизированной воды. Во все остальные пробирки внести по 1 мкл образца выделенной ДНК.

3. Тщательно перемешать содержимое пипетированием, затем налить по одной капле (20-25 мкл) минерального масла для ПЦР и закрыть пробирки.

4. После этого пробирки центрифугировать 5 сек при 3 тыс. об/мин и поместить в амплификатор (“Терцик”).

Температурные режимы ПЦР для гена ACE:

1 цикл	94 <sup>0</sup> С ..... 5 мин
30 циклов	94 <sup>0</sup> С ..... 60 сек
	62 <sup>0</sup> С ..... 60 сек
	72 <sup>0</sup> С ..... 60 сек
1 цикл	72 <sup>0</sup> С ..... 5 мин

**Задание 2.** Провести амплификацию гена внутреннего спейсера ITS2 *Opisthorchis felineus*

Амплификация внутреннего спейсера ITS<sub>2</sub> *Opisthorchis felineus* проводится с использованием праймеров:

прямой (F) – 5'- GAACATCGACATCTTGAACG-3',

обратный (R)– 5'-TGGTGTTTCAGGTCGT-TCC-3', реакционной стандартной ПЦР-смеси (PCR-Mix). Общий объем реакционной ПЦР-смеси должен составить 24мкл.

Для проведения амплификации необходимо повторить шаги 1-4 из задания

1. Ниже представлены температурные режимы ПЦР для внутреннего спейсера 2:

1 цикл	94 <sup>0</sup> С ..... 3 мин
30 циклов	94 <sup>0</sup> С ..... 45 сек
	60 <sup>0</sup> С ..... 30 сек
	72 <sup>0</sup> С ..... 60 сек
1 цикл	72 <sup>0</sup> С ..... 5 мин

После амплификации полученный раствор с множественными копиями выделенного гена сохраняют в морозильной камере (t ≈ - 20<sup>0</sup>С).

### Теоретическая часть

1. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин. Мн.: Высшая школа, 2005.

2. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Альбертс и др. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.

3. ЭУМК Молекулярная генетика. **Лекция 3.**

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4 «ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ И ПРОВЕДЕНИЕ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА»

**Цель работы:** Ознакомиться с методами проведения электрофоретического анализа ДНК в агарозном геле.

В ходе манипуляций с фрагментами ДНК часто необходимо определить размер или выделить конкретный участок ДНК из смеси. Легче всего фрагменты ДНК разделять с помощью метода электрофореза в агарозном геле. ДНК переносят в лунки застывшего геля, который помещается в специальную камеру для электрофореза. В камере создается электрическое поле, под действием которого фрагменты ДНК начинают передвигаться в геле. Короткие фрагменты движутся быстрее, чем длинные. Это позволяет цепочкам ДНК разной длины отделиться друг от друга. 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.

Электрофорез в агарозном геле используют для визуальной детекции ПЦР.

### **Растворы и реактивы:**

агароза  
электрофорезный буфер  
краситель (Blue/Orange 6x Loading Dye)  
амплифицированная ДНК  
маркер молекулярных масс  
этидиум бромид

### **Необходимое оборудование:**

электрофоретическая камера  
источник тока  
УФ-лампа  
амплификатор  
пипетки.

### **Практическая часть.**

**Задание 1.** Приготовить агарозный гель.

1. Смешать 2 г агарозы и 100 мл электрофорезного буфера. Состав электрофорезного буфера - Трис-ацетат (ТАЕ) 0,04 М трис-ацетат (50x) : 0,002 М ЭДТА.

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

3. Остудить раствор до 50<sup>0</sup>С и залить в кювету электрофоретической установки, затем вставить гребенку, для образования лунок. После того, как гель полностью затвердеет осторожно удалить гребенку.

**Задание 2.** Провести электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле.

1. Кювету с застывшим агарозным гелем поместить в электрофоретическую камеру и добавить достаточное количество электрофорезного буфера, так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1 мм.

2. На планшете в отдельные ячейки, по количеству электрофоретических дорожек, добавить 1-2 мкл буфера для нанесения проб с красителем (Blue/Orange 6x Loading Dye).

3. 10 мкл амплифицированной пробы (после ПЦР) перемешать с буфером в ячейке планшета пипетированием. Маркер с участками ДНК определенного размера 1 мкл, таким же образом смешать с буфером для нанесения проб.

4. Подключить электрофоретическую камеру к универсальному источнику питания и провести электрофорез в течении 80 минут. Параметры электрического тока в УИП «Эльф»: 110 В, 80 Вт, 400 мА.

**Задание 3.** Провести визуализацию полученных электрофоретических спектров.

1. Окрасить ДНК. Для этого флюоресцирующий краситель этидий бромид 50 мкл растворить в 500 мл воды. В полученный раствор поместить гель и окрашивать в течении 30 минут.

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

### **Теоретическая часть**

1. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин. Мн.: Высшая школа, 2005.

2. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Альбертс и др. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.

3. ЭУМК Молекулярная генетика. **Лекция 3.**

## 3 КОНТРОЛЬ ЗНАНИЙ

### 3.1 Перечень вопросов к зачету

1. Предмет, задачи и цели молекулярной генетики.
2. Модификация 5'- и 3'-концов транскриптов.
3. Химический состав нуклеиновых кислот.
4. Этапы трансляции и их характеристика
5. Инициация, элонгация и терминация транскрипции, промотор и терминатор.
6. Строение рибосом.
7. Строение м РНК.
8. тРНК-синтетазы их функции и образование ттРНК.
9. Процессинг РНК.
10. Эксперименты Ниренберга и Маттеи.
11. Сплайсинг РНК.
12. Этапы расшифровки генетического кода.
13. Первичная структура нуклеиновых кислот.
14. Посттрансляционная модификация полипептидных цепей.
15. История открытия двойной спирали ДНК.
16. Фолдинг белков.
17. Вторичная структура ДНК.
18. Секреция белков у прокариот.
19. Физико-химические свойства ДНК.
20. Модификация 5'- и 3'-концов транскриптов, кэп и полиА-хвост.
21. Строение и свойства РНК.
22. Деградация белков.
23. Матричные процессы синтеза биополимеров.
24. Передача информации через клеточную мембрану.
25. Общая характеристика репликации.
26. Белковые домены, узнающие специфические последовательности ДНК
27. Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК.
28. Молекулярные механизмы возникновения генных мутаций
29. Инициация репликации, Ori-последовательность
30. Классификация мутаций
31. Терминация репликации.
32. Определение нуклеотидной последовательности молекул ДНК, метод секвенирования Максомма-Гилберта, метод Сэнгера, секвенаторы
33. Репликация кольцевых молекул ДНК.

34. Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции.
35. Репликация теломерных концов ДНК.
36. Геномика. Размеры, структура и особенности организации геномов различных групп организмов.
37. Явление обратной транскрипции.
38. Молекулярные механизмы возникновения генных мутаций.
39. Репарация повреждений ДНК.
40. Инициация, элонгация и терминация транскрипции, промотор и терминатор.
41. Рекомбинация ДНК.
42. Структура прерывистых генов у различных эукариот.
43. Репликативное метилирование ДНК.
44. Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).
45. SOS-репарация ДНК.
46. Общая схема процесса транскрипции и характеристика его отдельных элементов.
47. Основные типы мобильных генетических элементов про- и эукариот.
48. Общая схема процесса трансляции и характеристика его отдельных элементов.
49. Мини-транспозоны.
50. Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК.
51. Транскрипция у прокариот, строение оперонов на примере *lac*-оперона.
52. Структура белков (первичная, вторичная, третичная и четвертичная).
53. Транскрипция у эукариот.
54. Первичная структура нуклеиновых кислот.
55. Строение оперонов на примере *lac*-оперона.
56. рРНК: строение и свойства.
57. ДНК-связывающие белки, участвующие в регуляции транскрипции.
58. тРНК: строение и свойства.
59. Особенности организации генов у прокариот и эукариот.
60. Основные свойства генетического кода и кодового словаря.

### **3.2 Критерии оценок по дисциплине**

#### ***10 баллов (десять):***

- систематизированные, глубокие и полные знания по всем разделам учебной программы, а также по основным вопросам, выходящим за ее пределы;
- точное использование научной терминологии (в том числе на иностранном языке), стилистически грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы;
- безупречное владение инструментарием учебной дисциплины, умение его эффективно использовать в постановке и решении научных и профессиональных задач;
- выраженная способность самостоятельно и творчески решать сложные проблемы в нестандартной ситуации;
- полное и глубокое усвоение основной и дополнительной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;
- умение ориентироваться в теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им критическую оценку, использовать научные достижения других дисциплин;
- творческая самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, активное участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.

#### ***9 баллов (девять):***

- систематизированные, глубокие и полные знания по всем разделам учебной программы;
- точное использование научной терминологии (в том числе на иностранном языке), стилистически грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы;
- владение инструментарием учебной дисциплины, умение его эффективно использовать в постановке и решении научных и профессиональных задач;
- способность самостоятельно и творчески решать сложные проблемы в нестандартной ситуации в рамках учебной программы;
- полное усвоение основной и дополнительной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;
- умение ориентироваться в основных теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им критическую оценку;
- самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях;
- творческое участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.

### **8 баллов (восемь):**

- систематизированные, глубокие и полные знания по всем поставленным вопросам в объеме учебной программы;
- использование научной терминологии, стилистически грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы, умение делать обоснованные выводы;
- владение инструментарием учебной дисциплины (методами комплексного анализа, техникой информационных технологий), умение его использовать в постановке и решении научных и профессиональных задач;
- способность самостоятельно решать сложные проблемы в рамках учебной программы;
- усвоение основной и дополнительной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;
- умение ориентироваться в основных теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им критическую оценку с позиций государственной идеологии (по дисциплинам социально-гуманитарного цикла);
- активная самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, систематическое участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.

### **7 баллов (семь):**

- систематизированные, глубокие и полные знания по всем разделам учебной программы;
- использование научной терминологии (в том числе на иностранном языке), лингвистически и логически правильное изложение ответа на вопросы, умение делать обоснованные выводы;
- владение инструментарием учебной дисциплины, умение его использовать в постановке и решении научных и профессиональных задач;
- усвоение основной и дополнительной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;
- умение ориентироваться в основных теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им критическую оценку;
- самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.

### **6 баллов (шесть):**

- достаточно полные и систематизированные знания в объеме учебной программы;
- использование необходимой научной терминологии, стилистически грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы, умение делать обоснованные выводы;
- владение инструментарием учебной дисциплины, умение его использовать в решении учебных и профессиональных задач;
- способность самостоятельно применять типовые решения в рамках учебной программы;
- усвоение основной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;
- умение ориентироваться в базовых теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им сравнительную оценку;
- активная самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, периодическое участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.

### **5 баллов (пять):**

- достаточные знания в объеме учебной программы;
- использование научной терминологии, стилистически грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы, умение делать выводы;
- владение инструментарием учебной дисциплины, умение его использовать в решении учебных и профессиональных задач;
- способность самостоятельно применять типовые решения в рамках учебной программы;
- усвоение основной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;
- умение ориентироваться в базовых теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им сравнительную оценку;
- самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.

### **4 балла (четыре), ЗАЧТЕНО:**

- достаточный объем знаний в рамках образовательного стандарта;
- усвоение основной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;

- использование научной терминологии, стилистическое и логическое изложение ответа на вопросы, умение делать выводы без существенных ошибок;

- владение инструментарием учебной дисциплины, умение его использовать в решении стандартных (типовых) задач;

- умение под руководством преподавателя решать стандартные (типовые) задачи;

- умение ориентироваться в основных теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им оценку;

- работа под руководством преподавателя на практических, лабораторных занятиях, допустимый уровень культуры исполнения заданий.

### **3 балла (три), НЕЗАЧТЕНО:**

- недостаточно полный объем знаний в рамках образовательного стандарта;

- знание части основной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;

- использование научной терминологии, изложение ответа на вопросы с существенными лингвистическими и логическими ошибками;

- слабое владение инструментарием учебной дисциплины некомпетентность в решении стандартных (типовых) задач;

- неумение ориентироваться в основных теориях, концепциях и направлениях изучаемой дисциплины;

- пассивность на практических и лабораторных занятиях, низкий уровень культуры исполнения заданий.

### **2 балла (два), НЕЗАЧТЕНО:**

- фрагментарные знания в рамках образовательного стандарта;

- знания отдельных литературных источников, рекомендованных учебной программой дисциплины;

- неумение использовать научную терминологию дисциплины, наличие в ответе грубых стилистических и логических ошибок;

- пассивность на практических и лабораторных занятиях, низкий уровень культуры исполнения заданий.

### **1 балл - один, НЕЗАЧТЕНО:**

- отсутствие знаний и компетенций в рамках образовательного стандарта или отказ от ответа.

Учреждение образования  
«Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

УТВЕРЖДАЮ  
Проректор по учебной работе  
ГГУ имени Ф.Скорины

 И.В.Семченко

05.05.2021  


Регистрационный № УД-21/1/23 /уч.

### МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА

Учебная программа учреждения высшего образования  
по учебной дисциплине для специальности  
1-31 01 01 Биология (по направлениям)  
направления специальности 1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность)

Учебная программа составлена на основе учебной программы ведущего учреждения образования (Белорусского государственного университета) «Молекулярная генетика» для специальности 1-31 01 01 Биология, утв. 30.06.2020, регистрационный № УД-9424/уч. и учебных планов ГГУ имени Ф. Скорины направления специальности 1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность), регистрационные номера G 31-01-16/уп от 17.06.2019, G 31-01-19/зф от 09.05.2019.

Составители:

Г.Г. Гончаренко, заведующий кафедрой зоологии, физиологии и генетики учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины», член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор;

Е.М. Курак, старший преподаватель кафедры зоологии, физиологии и генетики учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»;

Рекомендована к утверждению:

кафедрой зоологии, физиологии и генетики  
протокол № 10 от 12.04.2021

Научно-методическим советом ГГУ имени Ф. Скорины  
протокол № 6 от 05.05.2021

## ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Учебная дисциплина «Молекулярная генетика» относится к циклу дисциплин специализации и является одним из спецкурсов, предназначенных для студентов специальности 1-31 01 01 Биология (по направлениям) направления специальности 1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность). Развитие молекулярной генетики открывает новые перспективы в медицине, селекции растений и животных, микробиологической промышленности и биотехнологии. Изучение молекулярной генетики является необходимым этапом подготовки современных специалистов-биологов.

**Цель учебной дисциплины** – сформировать у студентов систему знаний о молекулярных механизмах генетических процессов, протекающих в клетке.

**Задачи учебной дисциплины:** помочь студентам сформировать четкие современные представления о структуре, функциях и методах изучения нуклеиновых кислот, молекулярных механизмах матричных процессов, протекающих в клетке.

**Место учебной дисциплины** в системе подготовки специалиста с высшим образованием.

Учебная дисциплина относится к циклу дисциплин специализации компонента учреждения высшего образования.

Программа составлена с учетом межпредметных связей и программ по учебным дисциплинам «Генетика», «Биохимия», «Микробиология», «Молекулярная биология».

В результате изучения дисциплины студенты должны:

*знать:*

современные представления о строении генов прокариот и эукариот, а также основные методы их исследования;

молекулярные механизмы матричных процессов, протекающих в клетке и их регуляцию.

*уметь:*

применять знание молекулярной генетики при изучении других биологических дисциплин.

использовать полученные знания в практической работе и экспериментальных исследованиях.

*владеть:*

основными молекулярно-генетическими методами исследования генов про- и эукариот.

Освоение учебной дисциплины «Молекулярная генетика» должно обеспечить формирование следующих академических, социально-личностных и профессиональных компетенций:

академические компетенции:

АК-1. Уметь применять базовые научно-теоретические знания для решения теоретических и практических задач.

АК-2. Владеть системным и сравнительным анализом.

АК-3. Владеть исследовательскими навыками.

АК-4. Уметь работать самостоятельно.

АК-5. Быть способным вырабатывать новые идеи (обладать креативностью).

АК-6. Владеть междисциплинарным подходом при решении проблем.

АК-7. Иметь навыки, связанные с использованием технических устройств, управлением информацией и работой с компьютером.

АК-8. Обладать навыками устной и письменной коммуникации.  
социально-личностные компетенции:

С ЛК-2. Быть способным к социальному взаимодействию.

С ЛК-3. Обладать способностью к межличностным коммуникациям.

С ЛК-4. Владеть навыками здоровьесбережения.

СЛК-5. Быть способным к критике и самокритике.

СЛК-6. Уметь работать в команде.

профессиональные компетенции:

ПК-1. Квалифицированно проводить научные исследования в области молекулярной генетики, проводить анализ результатов экспериментальных исследований, формулировать из полученных результатов корректные выводы.

ПК-7. Осуществлять поиск и анализ данных по изучаемой проблеме в научно-технических и других информационных источниках.

Дисциплина изучается в 7 семестре дневной формы получения высшего образования и в 7-8 семестрах заочной формы получения высшего образования. Общее количество часов для **студентов дневной формы обучения** в 7 семестре – 70 (2,5 зачетных единиц), аудиторных – 34 (лекционных – 22, лабораторных занятий – 12 часов). Форма отчетности – зачет. Общее количество часов для **студентов заочной формы обучения** в 7,8 семестре – 90 (2,5 зачетных единиц), из них аудиторных – 10 (лекционных – 6, лабораторных занятий – 4). Форма отчетности – зачет.

# СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Предмет, цели и задачи молекулярной генетики. Предпосылки возникновения и этапы развития. Достижения молекулярной генетики.

## 2. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Первичная структура ДНК. Компоненты молекулы ДНК и химические связи, их соединяющие. Конформация компонентов нуклеиновых кислот. Альтернативные формы двойной спирали ДНК. Денатурация и ренатурация ДНК. Суперспирализация двойной спирали ДНК. Топоизомеразы. Макромолекулярная структура ДНК. Молекулярная и пространственная организация РНК. Типы РНК и их распространенность. Гибридизация ДНК-РНК.

## 3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Рестрикционный анализ ДНК. “Прогулки” и “прыжки” по хромосоме. Клонирование ДНК. Методы гибридизации нуклеиновых кислот. ДНК-зонды. Создание библиотеки генов. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК: метод Максама-Гилберта, метод Сэнджера. Полимеразная цепная реакция. ПДРФ-анализ. Химический синтез ДНК.

## 4. ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА ПРО - И ЭУКАРИОТ

Структура генома вирусов и фагов. Доменная структура бактериальной хромосомы. Оперонная организация генов прокариот. Структура прокариотических генов. Бактериальные плазмиды. IS-элементы и транспозоны бактерий. Геном архебактерий. Минимальный размер генома прокариот. Структура эукариотических генов. Гены, кодирующие белки. Рибосомные гены. Гены т-РНК. Гистоновые гены. Типы повторяющихся последовательностей ДНК: высоко- и умеренно повторяющиеся последовательности ДНК. Сателлитные ДНК. Уникальные последовательности ДНК. Экзон-интронное строение генома эукариот. Тандемные гены. Мини- и микросателлиты. ДНК-фингерпринтинг. Псевдогены. Подвижные генетические элементы эукариот. ДНК митохондрий. ДНК хлоропластов. Структура и уровни компактизации хроматина у эукариот. Нуклеосомы.

## 5. РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Белки, участвующие в репликации ДНК. Молекулярные механизмы репликации про- и эукариот: сходство и отличие. Репликативная вилка *E. coli* и бактериофага Т4. ДНК-полимеразы прокариот. Инициация, элонгация и терминация репликации ДНК прокариот. Регуляция репликации плазмиды Col E1 и бактериальной хромосомы. Особенности функционирования репликативной вилки эукариот. ДНК-полимеразы эукариот. Контроль инициации репликации эукариотических хромосом. Согласованность контроля репликации с клеточным циклом. Элонгация и терминация

репликации ДНК эукариот. Репликация теломерных участков эукариотических хромосом. Обратная транскрипция. Этапы биосинтеза ДНК на РНК-матрице. Репликация геномов ретровирусов.

## **6. ТРАНСКРИПЦИЯ**

Молекулярные механизмы транскрипции. Промоторы про- и эукариот. Структура бактериальной РНК-полимеразы. Функции субъединиц минимального фермента. Рабочий цикл  $\sigma$ -фактора. Бактериальный оперон. Регуляторная область и структурные гены. Контроль экспрессии генов прокариот. Позитивная и негативная регуляция оперона. Аттенуация. Регуляция экспрессии лактозного, триптофанового и арабинозного оперонов. Терминация и антитерминация. Функции фактора  $\rho$ . Эукариотические РНК-полимеразы (РНК-полимераза I, РНК-полимераза II и РНК-полимераза III). Строение транскрипционных единиц класса I, II и III. Белковые факторы транскрипции. Этапы транскрипции. Регуляция транскрипции у эукариот. Регуляторные последовательности эукариот: энхансеры, сайленсоры и адапторные элементы. Структура хроматина как специфический регулятор экспрессии генов эукариот.

## **7. ПРОЦЕССИНГ И СПЛАЙСИНГ**

Процессинг первичных транскриптов у прокариот. Группы генов, кодирующих рРНК и тРНК. Разрезание рРНК-тРНК котранскриптов. Образование зрелых транскриптов. Процессинг рРНК и тРНК у эукариот. Процессинг мРНК у эукариот. Сплайсинг эукариотической РНК. Автокаталитический сплайсинг. Альтернативный сплайсинг.

## **8. ТРАНСЛЯЦИЯ**

Участие рибосом, мРНК, тРНК и вспомогательных факторов в трансляции. Строение рибосом про- и эукариот. Сравнительная характеристика основных стадии трансляции у про- и эукариот. Трансляция у прокариот. Активация аминокислот. Инициация, элонгация и терминация трансляции. Реинициация трансляции. Антибиотики, ингибирующие биосинтез белка у бактерий. Молекулярные механизмы трансляции. Трансляция у эукариот. Факторы инициации трансляции. Взаимодействие мРНК с кэп-связывающим комплексом и рибосомами. Факторы и механизмы элонгации. Факторы и механизмы терминации. Биосинтез белка в митохондриях. Трансляция в хлоропластах.

## **9. МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС**

Классификация мутаций. Индуцированные мутации. Химические мутагены экзогенного происхождения. Эндогенные мутагены. Мутагенез. Молекулярные механизмы возникновения генных мутаций. Гены-мутаторы и "горячие точки мутаций".

## **10. РЕПАРАЦИЯ ДНК**

Типы повреждений ДНК. Механизмы репарации повреждений ДНК. Прямая репарация (ДНК-метилтрансферазы, ДНК-фотолиазы, ДНК-инсеразы). Эксцизионная репарация ДНК путем удаления поврежденных азотистых оснований (BER). Эксцизионная репарация ДНК путем удаления нуклеотидов (NER). Пострепликативная (рекомбинационная) репарация. SOS-репарация. Системы защиты ДНК: процессы рестрикции и модификации.

## **11. РЕКОМБИНАЦИЯ ДНК**

Типы рекомбинации. Общая рекомбинация. Энцимология общей рекомбинации. Функции Rec BCD и Rec A белков. Образование структуры Холидея. Способы разрезания полухиазмы. Неравный кроссинговер. Генная конверсия. Связь процессов рекомбинации и рекомбинационной репарации. Негомологичная рекомбинация. Сайт-специфическая рекомбинация. Система интеграции профагов X, P1 и Mu.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРНИНЫ

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ КАРТА ДИСЦИПЛИНЫ**  
(дневная форма обучения)

Номер раздела, темы, занятия	Название раздела, темы занятия; перечень изучаемых вопросов	Количество аудиторных		Количество часов УСР	Материальное обеспечение занятия (наглядные, методические пособия и др.)	Литература	Формы контроля знаний
		лекции	лабораторные занятия				
1	2	3	4	5	6	7	8
1	<b>Введение</b> Предмет, цели и задачи молекулярной генетики. История развития молекулярной генетики	2			Текст лекций	[1-5]	-
2	<b>Строение и свойства нуклеиновых кислот</b> Первичная и вторичная структура ДНК. Молекулярная и пространственная организация РНК. Типы РНК. Гибридизация ДНК-РНК.	2			Текст лекций	[1-5]	-
3	<b>Методы исследования нуклеиновых кислот</b> Рестрикционный анализ ДНК. Клонирование ДНК. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК. Полимеразная цепная реакция. ПДРФ-анализ.	2	12		Текст лекций	[1-5]	Защита лабораторной работы
4	<b>Организация генома про - и эукариот</b> Определение нуклеотидных последовательностей в геномах Характеристика геномов прокариот. Характеристика геномов эукариот. Минимальный геном необходимый для жизни.	2			Текст лекций	[1-5]	-

5	<b>Репликация ДНК</b> Характеристика репликации. Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК. Репликация кольцевых молекул ДНК Репликация теломерных концов ДНК Этапы биосинтеза ДНК на РНК-матрице. Репликация геномов ретровирусов.	2			Текст лекций	[1-5]	-
6	<b>Транскрипция</b> Молекулярные механизмы транскрипции. Контроль экспрессии генов прокариот. Позитивная и негативная регуляция оперона. Этапы транскрипции и регуляция транскрипции у эукариот. Структура хроматина как специфический регулятор экспрессии генов эукариот.	2			Текст лекций	[1-5]	-
7	<b>Процессинг и сплайсинг</b> Сплайсинг молекул РНК Процессинг иРНК Процессинг тРНК Процессинг рРНК	2			Текст лекций	[1-5]	-
8	<b>Трансляция</b> Генетический код и его свойства. Аминоацилирование тРНК. Строение рибосом. Этапы трансляции. Инициация, элонгации и терминация трансляции.	2			Текст лекций	[1-5]	-
9	<b>Мутационный процесс</b> Классификация мутаций. Мутагенез. Молекулярные механизмы возникновения генных мутаций. Гены-мутаторы и "горячие точки мутаций".			2	Текст лекций, интернет источники	[1-5]	Реферативная работа
10	<b>Репарация ДНК</b> Типы повреждений ДНК. Механизмы репарации повреждений ДНК: прямая репарация, эксцизионная репарация. Пострепликативная (рекомбинационная) репарация. SOS-репарация. Системы защиты ДНК: процессы рестрикции и модификации.			2	Текст лекций, интернет источники	[1-5]	Реферативная работа
11	<b>Рекомбинация ДНК</b> Понятие рекомбинации. Общая, гомологичная, или законная рекомбинация. Сайт-специфическая рекомбинация. Случайная, негомологичная или незаконная рекомбинация.			2	Текст лекций, интернет источники	[1-5]	Реферативная работа
	<b>Всего часов</b>	<b>16</b>	<b>12</b>	<b>6</b>			<b>Зачет</b>

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ КАРТА ДИСЦИПЛИНЫ**  
(заочная форма обучения)

Номер раздела, темы, занятия	Название раздела, темы занятия; перечень изучаемых вопросов	Количество аудиторных		Количество часов УСП	Материальное обеспечение занятия (наглядные, методические пособия и др.)	Литература	Формы контроля знаний
		лекции	лабораторные занятия				
1	2	3	4	5	6	7	8
1	<b>Введение</b> Предмет, цели и задачи молекулярной генетики. История развития молекулярной генетики	2			Текст лекций	[1-5]	-
2	<b>Строение и свойства нуклеиновых кислот</b> Первичная и вторичная структура ДНК. Молекулярная и пространственная организация РНК. Типы РНК. Гибридизация ДНК-РНК.		2		Текст лекций	[1-5]	Защита лабораторной работы
3	<b>Методы исследования нуклеиновых кислот</b> Рестрикционный анализ ДНК. Клонирование ДНК. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК. Полимеразная цепная реакция. ПДРФ-анализ.	Самостоятельное изучение			Текст лекций	[1-5]	
4	<b>Организация генома про - и эукариот</b> Определение нуклеотидных последовательностей в геномах Характеристика геномов прокариот. Характеристика геномов эукариот. Минимальный геном необходимый для жизни.	2			Текст лекций	[1-5]	-

5	<b>Репликация ДНК</b> Характеристика репликации. Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК. Репликация кольцевых молекул ДНК Репликация теломерных концов ДНК Этапы биосинтеза ДНК на РНК-матрице. Репликация геномов ретровирусов.		2		Текст лекций	[1-5]	Защита лабораторной работы
6	<b>Транскрипция</b> Молекулярные механизмы транскрипции. Контроль экспрессии генов прокариот. Позитивная и негативная регуляция оперона. Этапы транскрипции и регуляция транскрипции у эукариот. Структура хроматина как специфический регулятор экспрессии генов эукариот.	2			Текст лекций	[1-5]	-
7	<b>Процессинг и сплайсинг</b> Сплайсинг молекул РНК Процессинг иРНК Процессинг тРНК Процессинг рРНК	Самостоятельное изучение			Текст лекций	[1-5]	-
8	<b>Трансляция</b> Генетический код и его свойства. Аминоацилирование тРНК. Строение рибосом. Этапы трансляции. Инициация, элонгация и терминация трансляции.	2			Текст лекций	[1-5]	-
9	<b>Мутационный процесс</b> Классификация мутаций. Мутагенез. Молекулярные механизмы возникновения генных мутаций. Гены-мутаторы и “горячие точки мутаций”.	Самостоятельное изучение			Текст лекций, интернет источники	[1-5]	
10	<b>Репарация ДНК</b> Типы повреждений ДНК. Механизмы репарации повреждений ДНК: прямая репарация, эксцизионная репарация. Пострепликативная (рекомбинационная) репарация. SOS-репарация. Системы защиты ДНК: процессы рестрикции и модификации.	Самостоятельное изучение			Текст лекций, интернет источники	[1-5]	
11	<b>Рекомбинация ДНК</b> Понятие рекомбинации. Общая, гомологичная, или законная рекомбинация. Сайт-специфическая рекомбинация. Случайная, негомологичная или незаконная рекомбинация.	Самостоятельное изучение			Текст лекций, интернет источники	[1-5]	
<b>Всего часов</b>		<b>6</b>	<b>4</b>	<b>-</b>			<b>Зачет</b>

## ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### *Перечень используемых средств диагностики*

Учебным планом специальности 1-31 80 01 Биология в качестве формы итогового контроля по учебной дисциплине рекомендован зачет. Для текущего контроля качества усвоения знаний студентами используется следующий диагностический инструментарий:

- защита индивидуальных заданий при выполнении лабораторных работ;
- устные опросы;
- письменные контрольные работы по отдельным темам дисциплины по выбору.

### **Методические рекомендации по организации и выполнению УСР по дисциплине «Молекулярная биология»**

Цели УСР: овладеть теоретическими знаниями по данной теме, освоить молекулярно-биологическую терминологию и сформировать компетенцию в применении полученных знаний.

Виды заданий УСР с учетом модулей сложности по темам УСР:

А) *Задания, формирующие знания по учебному материалу на уровне узнавания:*

- 1 Соотнесите термины с определениями.
- 2 Исправьте ошибки в определениях.
- 3 Вставьте в определение соответствующий термин.

*Форма выполнения заданий – индивидуальная.*

*Форма контроля выполнения заданий – тест.*

Б) *Задания, формирующие компетенции на уровне воспроизведения:*

- 1 Дайте определения терминам.
- 2 Дайте примеры, подтверждающие или опровергающие правильность утверждений.
- 3 Сделайте обобщение по экзаменационным вопросам.

*Форма выполнения заданий – индивидуальная (задание 3).*

*Форма контроля выполнения заданий – контрольная работа, устное сообщение и обсуждение (в устной или письменной форме – 3 задание).*

В) *Задания, формирующие компетенции на уровне применения полученных знаний:*

Приобретение умений составления схем, таблиц, оформление рисунков, подготовка презентаций и докладов.

*Форма выполнения заданий – индивидуальная.*

*Форма контроля выполнения заданий* – схема и ее интерпретация устное сообщение (1-4 задание), защита учебного задания / мультимедийная презентация (1-4 задание), реферативная работа (5 задание).

Для самостоятельного изучения выделяются следующие темы:

Тема для самостоятельного изучения «**Репарация ДНК**» – 2 часа, преследует следующие цели:

- изучить понятия: репарация ДНК, эксцизионная репарация, прямая репарация, ДНК-метилтрансферазы, ДНК-фотолиазы, ДНК-инсеразы;

- овладеть знаниями о механизмах эксцизионной репарации поврежденных ДНК путем удаления поврежденных азотистых оснований (BER), эксцизионной репарации ДНК путем удаления нуклеотидов (NER), пострепликативной (рекомбинационной) репарации, SOS-репарации;

- уметь классифицировать типы повреждений ДНК, знать системы защиты ДНК: процессы рестрикции и модификации.

Тема для самостоятельного изучения «**Рекомбинация ДНК**» – 2 часа, 1 семестр, преследует следующие цели:

- изучить понятия: рекомбинация, кроссинговер, структуры Холидея, полушиазмы, генная конверсия;

- овладеть знаниями о механизмах общей, негомологичной и сайт-специфической рекомбинации;

- знать энзимологию общей рекомбинации, функции Rec BCD и Rec A белков, связь процессов рекомбинации и рекомбинационной репарации.

Тема для самостоятельного изучения «**Мутационный процесс**» – 2 часа, 1 семестр, преследует следующие цели:

- изучить понятия: мутации, мутагенез, гены-мутаторы, мутагены, “горячие точки мутаций”;

- овладеть знаниями о механизмах действия химических мутагенов экзогенного происхождения, эндогенных мутагенов, теории мутагенеза;

- уметь классифицировать мутации, знать молекулярные механизмы возникновения генных мутаций.

#### *Рекомендуемые темы лабораторных работ*

1 Лабораторная работа «Выделение геномной ДНК из эукариотических клеток» (4 часа).

2 Лабораторная работа «Конструирование и подбор праймеров для ПЦР» (2 часа).

3 Лабораторная работа «Подбор оптимальных условий и проведение ПЦР» (4 часа).

4 Лабораторная работа «Подбор оптимальных условий и проведение гель-электрофореза» (2 часа).

## ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### ЛИТЕРАТУРА

Основная:

1. Альбертс, Б. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рефф, К. Робертс, Дж. Уотсон. М.: Мир, 1994. Т. 1-3.
2. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин. Мн. :Высшая школа, 2005.
3. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот / под ред. А.С. Спирина. М.: Высшая школа. 1990.
4. Закиян, С.М. Эпигенетика / Отв. ред. С. М. Закиян; В. В. Власов, Е. В. Дементьева. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012 с.
5. Кэри, Н. Эпигенетика. Как современная биология переписывает наши представления о генетике, заболеваниях и наследственности: пер с англ. / Н. Кэри. Ростов н/Д: Феникс, 2012 с.

Дополнительная:

1. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия/ Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. М.: Высшая школа, 1998.
2. Lewin, B. Genes VIII / Lewin B. Prentice Hall, 2004.
3. Lodish, H. Molecular Cell Biology (5th Edition) / Lodish H. et. al. W.H.Freeman & Company, 2003.
4. Сингер, М. Гены и геномы / М.Сингер, П.Берг. М.: Мир, 1998. Т. 1-2.
5. Коничев, А.С. Молекулярная биология / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. М.: Изд. центр «Академия», 2003.
6. Льюин, Б. Гены / Б. Льюин. М.: Мир, 1987.
7. Патрушев, Л.И. Экспрессия генов / Л.И. Патрушев. М.: Наука, 2000.
8. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003.
9. Шпорк, П. Читая между строк ДНК: пер с англ. / П. Шпорк. М.: Ломоносов, 2012, 272 с.
10. Issa, J.-P. (2014). Aging and epigenetic drift: a vicious cycle. J Clin Invest 124, 24–29.

РЕСУРСЫ ИНТЕРНЕТ

1. Проблемы эволюции <http://evolbiol.ru/>
2. Элементы науки <http://elementy.ru/>
3. Бимолекула <http://biomolecula.ru/>
4. What is epigenetics <http://www.whatisepigenetics.com/>
5. EpiGenie <http://epigenie.com/>

**ПРОТОКОЛ СОГЛАСОВАНИЯ УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЫ  
ДИСЦИПЛИНЫ СПЕЦИАЛИЗАЦИИ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕ-  
НЕТИКА» С ДРУГИМИ ДИСЦИПЛИНАМИ СПЕЦИАЛЬНОСТИ  
1 -31 80 01 Биология**

Название дисциплины, с которой требуется согласование	Название кафедры	Предложения об изменениях в содержании учебной программы по изучаемой учебной дисциплине	Решение, принятое кафедрой, разработавшей учебную программу (с указанием даты и номера протокола)
Молекулярная биология	Кафедра зоологии, физиологии и генетики	Содержание учебной программы одобрить	Рекомендовать к утверждению учебную программу в представленном варианте протокол № <u>10</u> от <u>12.04. 2021</u> г.
Генная инженерия	Кафедра зоологии, физиологии и генетики	Содержание учебной программы одобрить	Рекомендовать к утверждению учебную программу в представленном варианте протокол № <u>10</u> от <u>12.04. 2021</u> г.
Генетика	Кафедра зоологии, физиологии и генетики	Содержание учебной программы одобрить	Рекомендовать к утверждению учебную программу в представленном варианте протокол № <u>10</u> от <u>12.04. 2021</u> г.

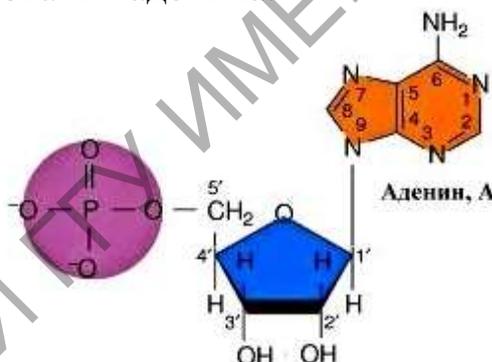
## Глоссарий

### 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.).

**Аденин, А** (adenine, А, гр. *aden* — железа и лат. *-in(e)* — суффикс, обозначающий «подобный») — пуриновое азотистое основание, 6-аминопурин. А. содержится во всех живых клетках в составе нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), аденозинфосфорных кислот, циклического АМФ, коферментов (НАД, НАДФ) и др. В ДНК аденин комплементарен тимину (см.) и образует с ним две водородные связи.

**Аденозин 5'-монофосфат (АМФ)** — нуклеотид молекулы РНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода рибозы и пуринового азотистого основания аденина.



**Аденозинтрифосфат (АТФ)** — рибонуклеозид-5-трифосфат, участвующий в энергетическом цикле клетки в качестве донора фосфатной группы.

**Активация аминокислоты** — АТФ-зависимое ферментативное образование эфирной связи между карбоксильной группой аминокислоты и 3'-гидроксильной группой соответствующей ей тРНК.

**Alu-семейство** — семейство умеренно повторяющихся последовательностей ДНК, известное у многих млекопитающих и у некоторых других организмов; размер *Alu*-повтора около 300 п. н., а в каждом таком повторе расположен сайт узнавания для рестриктазы *AluI*.

**Альтернативный сплайсинг иРНК** — вариант сплайсинга, при котором происходит соединение экзонов гена в разных комбинациях, и, следовательно, образование различных зрелых молекул иРНК.

**Аминоацил-тРНК-синтетаза (кодаза)** - фермент, который ката-

лизирует присоединение аминокислоты к соответствующей ей молекуле тРНК. Существует 20 типов аминоацил-тРНК-синтетаз (по числу аминокислот). У каждой тРНК-синтетазы 3 центра связывания: для аминокислоты, тРНК и АТФ. Сначала осуществляется связь аминоацил-тРНК-синтетазы с определенной аминокислотой, а затем активированная с помощью АТФ аминокислота присоединяется к аденину акцепторного триплета ЦЦА тРНК.

**Аминокислота** - органическое соединение, содержащее аминогруппу ( $-\text{NH}_2$ ) и карбоксильную группу ( $-\text{COOH}$ ). Известно 20 основных аминокислот входящих в состав белков. Общая формула для аминокислоты:  $\text{NH}_2\text{-CR-COOH}$ , где R —это радикал, специфичный для каждой отдельной аминокислоты.

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

**Амниоцентез** (*amniocentesis*) – взятие проб амниотической жидкости при пренатальной диагностике (см.) пороков развития плода, генных и хромосомных мутаций, определения 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 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, термоциклер** (*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.  $90\text{-}94^\circ\text{C}$ ), отжиг праймера (при  $50^\circ\text{C}$ ) и удлинение праймера (синтез цепи ДНК при  $70\text{-}72^\circ\text{C}$ ).

**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).

**Антионкогены (гены-супрессоры опухолевого роста)** – гены, активность которых препятствует развитию опухолей. По своему функциональному назначению антионкогены являются антагонистами онкогенов. Хорошо изученным антионкогеном является ген Rb, (кодирует белок pRb, подавляющий клеточные деления в нормальных клетках). Мутация гена Rb приводит к образованию ретинобластомы и некоторых других опухолей (остеосаркомы, карциномы лёгких, мочевого пузыря и др.).

**Апоптоз** – процесс программированной гибели клетки, которая происходит при нормальном развитии, функционировании и обновлении тканей. Отличается от некроза, при котором гибель клетки обусловлена действием внешних факторов (стресс или токсины).

**att-сайты** – участки фаговой и бактериальной хромосом, рекомбинация между которыми приводит к интеграции или исключению фага.

**Аутосплайсинг** – сплайсинг предшественников мРНК, происходящий без участия каких-либо др. макромолекул (ферментов), т.е. мРНК сама является катализатором этого процесса (рибозимом); явление А. открыто Т. Цехом с соавт. в 1981 при анализ процессинга рибосомной 26S-рРНК у инфузории *Tetrahymena thermophila*.

## Б

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

**Бактериофаг  $\lambda$ , фаг  $\lambda$**  – умеренный бактериофаг, инфицирующий *E. coli* (см.). Его геном представляет собой линейную двуническую 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  $\lambda$  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).

**Белки «цинковые пальцы»** – одна из основных групп ДНК-связывающих белков: являются регуляторами транскрипции, содержат характерный домен, который включает 2 цистеиновых и 1 гистициновый остаток: – эти аминокислоты взаимодействуют с ионом цинка, а расположенная между ними полипептидная цепочка выпетливается в виде «пальца»; обширная группа Б.«Ц.П.» кодируется широко диспергированными по геному генами группы Zfp (например, у мыши известны на хромосомах X, Y, 11 и 8); один из наиболее известных Б.«Ц.П.» кодируется геном Крюппеля.

**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 (вставляются) в подходящие вектора, напр, космидные или бактериальные векторы, и трансформируются 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.

**Биополимеры** — высокомолекулярные органические соединения, входящие в состав живых организмов (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты).

**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 которого весь электрофоретический спектр ДНК отпечатывается (blotting) за счет капиллярных сил на приложенной к гелю нитроцеллюлозной мембране (пленке), после чего фиксируется при помощи высокой температуры.

**Бокс Хогнесса, ТАТА-бокс** – специфическая последовательность нуклеотидов, присутствующая в промоторных областях генов эукариот; обобщенная структура Б.Х. – ТАТА(АТ)А(АТ); выполняет регуляторную функцию – участвует в инициации транскрипции, обеспечивая ориентацию РНК-полимеразы относительно промотора, функцио-

нально эквивалентен боксу Прибнова у прокариот.

**Бокс Прибнова** – нуклеотидная последовательность у прокариот, расположенная за 10 нуклеотидов от точки инициации транскрипции и обычно состоящая из 6 (иногда до 9) оснований, каноническая последовательность Б.П. – ТАТААТ; предполагается, что на участке Б.П. происходит расплетание цепей ДНК в момент инициации транскрипции, также Б.П. необходим для правильного ориентирования РНК-полимеразы на промоторе; аналогом Б.П. у эукариот является бокс Хогнесса, выполняющий те же функции.

## **В**

**Вектор клонирования, клонирующий вектор** (cloning vector) [лат. *vector* - везущий, несущий; гр. *clon* - отпрыск, ветвь] – рекомбинантный вектор (см. *Вектор*), содержащий сайты рестрикции, по которым в него может быть встроен любой подлежащий клонированию чужеродный фрагмент ДНК, и способный к автономной репликации в бактериальных, дрожжевых или иных клетках.

**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.).

**$\lambda$  вектор** – вектор сконструированный на базе фага  $\lambda$  (см.), использующийся при клонировании достаточно больших фрагментов чужеродной ДНК длиной около 15 кб.

**Величина генома** (*genome size*) – количество пар оснований (п.о.) ДНК в расчете на гаплоидный геном; иногда (что неверно) понятие В.г. используется для обозначения весового содержания ДНК (в пикограммах на клетку). По последним данным В.г. составляет: у бактерий– $2 \cdot 10^6$  п.о., нематод– $1 \cdot 10^8$  п.о., насекомых– $2,3 \cdot 10^9$  п.о., моллюсков– $1,6 \cdot 10^9$  п.о., рыб– $1,4 \cdot 10^9$  п.о., птиц– $1,2 \cdot 10^9$  п.о., млекопитающих– $2,6 \cdot 10^9$  п.о., человека– $3 \cdot 10^9$  п.о., голосеменных– $1,6 \cdot 10^{10}$  п.о.

**Водородная связь** – сравнительно слабое электростатическое притяжение между электроотрицательным атомом и атомом водорода, ковалентно связанным с другим электроотрицательным атомом.

**Вставочная мутация** – мутация, вызванная вставкой дополнительного основания между двумя последовательно расположенными основаниями ДНК.

**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 двунигчатой молекулы ДНК размером в 5,2 кб, содержащей 5 генов. Впервые был обнаружен у африканской 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 позволяет использовать вирусную ДНК в качестве эффективного вектора в генной инженерии.

**Вторичный мессенджер** (вторичный посредник) – химическое соединение внутри клетки, вовлеченное в инициацию ответа на сигнал от химического носителя (например, гормона), который не может проникнуть в клетку-мишень.

**Вырожденность кода** – свойство генетического кода, заключающееся в том, что 18 из 20 аминокислот кодируются несколькими кодонами. Одним кодоном кодируются только аминокислоты метионин и триптофан.

**Высокоповторяющаяся ДНК** – нуклеотидные последовательности, содержащиеся в геноме в сотнях тысяч или миллионах повторов и первыми реассоциирующиеся во время ренатурации тотальной ДНК; как правило, единица («мономер») В.ДНК состоит из небольшого числа нуклеотидов (например, на половых хромосомах известны многомиллионные повторы тетра nukлеотидов ГАТА и ГАЦА), входят в состав гетерохроматина и сателлитной ДНК.

**Г**

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

**Г белки** – белки, локализованные на внутренней поверхности плазматической мембраны, которые соединены с гуанозин три- и дифосфатами (ГТФ и ГДФ). Передают сигналы с внешней стороны мембраны через трансмембранные рецепторы (G-белок сопряженный рецептор) к аденилатциклазе, которая катализирует формирование

внутри клетки вторичного переносчика - циклической АМФ.

**Гель** — желеобразный матрикс, состоящий из полимерного компонента и буферного раствора, используется для разделения в процессе электрофореза макромолекул ДНК и РНК (агарозный Г., 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 не кодирующих (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. Иогансенем в 1909 г. и нередко заменяется понятиями "наследственный фактор".

**Ген-регулятор** (*regulator gene*) — ген, кодирующий белок-репрессор, взаимодействующий с геном-оператором и таким образом регулирующий транскрипцию "своего" оперона.

**Генетическая дактилоскопия и идентификация индивидуумов** — точная идентификация индивидуумов животных и растений на основе молекулярно-генетического анализа индивидуальных образцов ДНК (см. Генная дактилоскопия, ДНК-фингерпринтинг, Фингерпринт ДНК, Секвенирование 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 sv40 (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.) для соответствующих аминокислот в белках. Г. к. триплетен (см. Триплет) – 3 нуклеотида кодируют 1 аминокислоту. Код называют вырожденным (см. Вырожденность кода), т.к. 18 из 20 аминокислот 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.

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

**Геномика** - раздел генетики, предметом которого является изучение принципов построения геномов и их структурно-функциональной организации.

**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.).

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

**Гетерогамия** [гетеро + и гр. *gamos* – брак] - тип полового процесса, при котором две гаметы, сливающиеся при оплодотворении, различаются по внешнему виду. При гетерогамии в узком смысле гаметы обоих полов различаются только по размеру - гетерогаметы, анизогаметы (см. Анизогамия) и не различимы по

форме и поведению (например, подвижные жгутиковые гаметы некоторых водорослей). Крупная гамета называется макрогаметой (яйцеклеткой), мелкая - микрогаметой (сперматозоидом). При широком толковании гетерогамия включает в себя также оогамию (у всех животных, всех высших и многих низших растений), при которой яйцеклетка и сперматозоид (спермий) различаются по размеру, форме и поведению.

**Гетеротрофы** — организмы, питающиеся готовыми органическими веществами. Г. являются животные, грибы, большинство бактерий, многие протисты и паразитические растения.

**Гетерохроматин** (*heterochromatin*) – часть хроматина, находящаяся в конденсированном состоянии в интерфазе клеточного цикла, как правило, реплицируется позже эухроматина и в основном составлен высокоповторяющимися последовательностями; ДНК в составе Г. чаще всего не транскрибируется; термин «Г» предложен Э. Хейтцем в 1922 г.

**Гибридизация праймеров** — вторая стадия ПЦР в ходе которой при снижении температуры в реакционной смеси *in vitro* с 92°C до 50°C 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 сшивания (лигирования (см.)) двух или более негомологичных молекул ДНК. Напр., рекомбинантная плазида (см.), содержащая одну или более вставок чужеродной ДНК. Организмы, содержащие такие *in vitro* сконструированные ДНК, также относятся к рекомбинантам (рекомбинантный фаг, бактерия).

**Гиперхромный эффект** — повышение оптической плотности за счет увеличения адсорбции УФ в растворе двухцепочечной ДНК по мере ее денатурации при высоких температурах, щелочной обработке или действию других факторов.

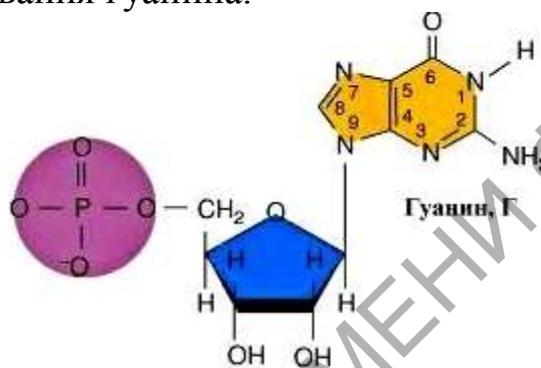
**Гипотеза качаний** - объясняет способность тРНК узнавать более чем один кодон, благодаря неканоническому (отличному от G-C, A-T) спариванию первого основания антикодона тРНК с третьим основанием кодона.

**ГМО (генетически модифицированный организм)** – организм, генотип которого был искусственно изменён при помощи методов генной инженерии (см. Наследственно измененные организмы, трансформированные организмы, трансгенные организмы).

**Горячая точка** – участок ДНК, в котором частота возникновения мутаций (или рекомбинаций) очень велика.

**Гуанин, Г** (guanine, G) [исп. *huanu* – навоз и лат. *-in(e)* – суффикс, обозначающий «подобный»] – пуриновое основание (2-амино-6-оксипурин), комплементарное цитозину (см. *Цитозин, Ц*) в нуклеиновых кислотах, содержится во всех живых клетках в составе ДНК и РНК, входит в состав гуанозина Г. – структурный компонент низкомолекулярных коферментов, исходное вещество при биосинтезе птеринов, рибофлавина, фолиевой кислоты. Нуклеотид Г. (гуанозинтрифосфат, ГТФ) участвует в синтезе белка, активации жирных кислот, цикле трикарбоновых кислот, глюконеогенезе.

**Гуанозин 5'-монофосфат (GMF)**– нуклеотид молекулы РНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода рибозы и пуринового азотистого основания гуанина.



**Д**

**Двухцепочечная молекула кДНК** — см. кДНК, комплементарная ДНК.

**Двунаправленная репликация** – репликация, при которой две репликационные вилки движутся в противоположных направлениях от общего старта - *oriC*.

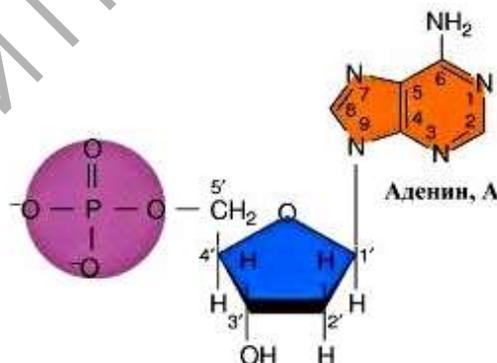
**Д-петля** – область внутри митохондриальной ДНК, в которой небольшой участок РНК-праймера взаимодействует с одной из цепей ДНК, вытесняя исходную комплементарную цепь. Этот же термин используется при описании события, катализируемого RecA-белком, которое заключается в замене одной цепи в дуплексной ДНК другой одноцепочечной ДНК, захваченной извне.

**Дезоксирибоза** – молекула рибозы у которой отсутствует гидроксильная группа при 2'-углеродном атоме сахарного кольца, входит в состав дезокси-нуклеотидов.

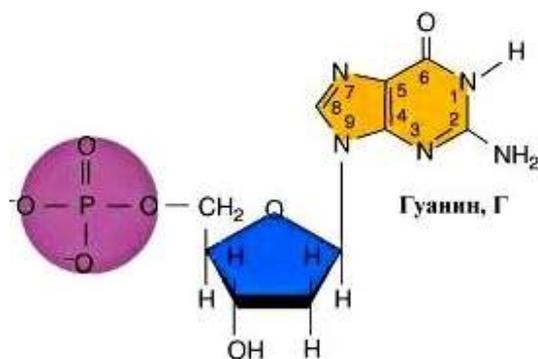


**Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)** — высокомолекулярный полимер, состоящий из четырех дезоксирибонуклеотидов (А, Т, Ц, Г), аperiodическим чередованием которых кодируется генетическая информация вирусов, бактерий и высших организмов. ДНК может быть однонитчатой (*ss*ДНК), как, напр., у некоторых 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,  $5' \rightarrow \rightarrow 3'$  и, наоборот,  $3' \rightarrow \rightarrow 5'$ ). 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.

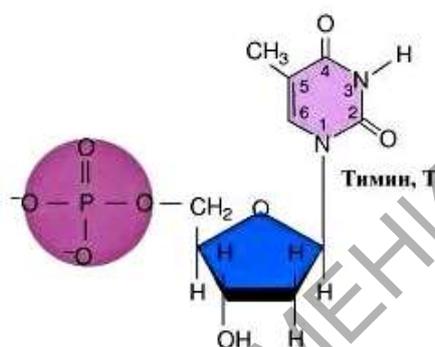
**Дезоксиаденозин 5'-монофосфат (dAMF)** — нуклеотид молекулы ДНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода дезоксирибозы и пуринового азотистого основания аденина.



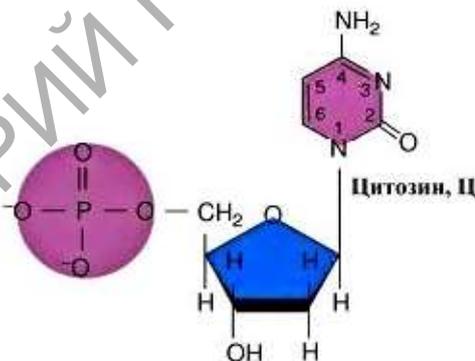
**Дезоксигуанозин 5'-монофосфат (dGMF)** — нуклеотид молекулы ДНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода дезоксирибозы и пуринового азотистого основания гуанина.



**Дезокситимидин 5'-монофосфат (dTMP)** – нуклеотид молекулы ДНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода дезоксирибозы и пиримидинового азотистого основания тимина.



**Дезоксицитидин 5'-монофосфат (dCMP)** – нуклеотид молекулы ДНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода дезоксирибозы и пиримидинового азотистого основания цитозина.



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

**Дидезоксинуклеотид, ddNTP (Dideoxynucleotide)** - Полученный искусственным путем нуклеозидтрифосфат, без гидроксильных групп при 2'- и 3'-углеродных атомах сахарного кольца (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP).

**Дидезоксирибоза** – молекула рибозы у которой отсутствуют гидроксильные группы при 2'- и 3'-углеродных атомах сахарного кольца, входит в состав дидезоксинуклеотидов (см. рибоза, дезоксирибоза).

**Дистрофин (dystrophin)** — крупный мышечный белок (молекулярная масса Д. человека - 427 кД), связанный с внешней мембраной многоядерных мышечных волокон и вовлеченный в патогенез широко распространенных мышечных дистрофий Дюшенна и Беккера; ген Д. расположен в X-хромосоме (Xp21.2), и является одним из самых больших генов человека (длина около 2,6 млн. п. н., состоит из 79 экзонов).

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

**ДНК-лигазы** — ферменты, которые катализируют образование фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами в молекуле ДНК. Связи образуются между C—C, C—S, C—O и C—N за счет энергии сопряженной реакции гидролиза. В технологии рекомбинантной ДНК используются в основном две ДНК-л., выделенные из *E. coli* и фага T4. ДНК-л. соединяют 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 флюорисцентно 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) меченого зонда.

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

**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-топоизомеразы** – группа ферментов, которые контролируют уровень суперскрученности ДНК.

**ДНК-фингерпринтинг, метод фингерпринта ДНК** (*DNA fingerprinting or DNA fingerprint technique*) (см. Фингерпринт ДНК) – метод, при котором 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.). 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.

**Домен** – участок полипептидной цепи белка, выполняющий какую-либо его функцию (например, цитоплазматический Д., трансмембранный Д. и т.п.); каждый Д. кодируется участком гена, расположенным между соседними интронами (т.е. одним экзоном), что обуславливает эволюционный консерватизм положения интронов (например, в генах гемоглобина млекопитающих); также Д. – дискретный участок хромосомы, спирализующийся независимо от соседних участков (доменов) или обладающий повышенной чувствительностью к ДНКазе.

## Е

***Escherichia coli*, *E. coli*, кишечная палочка** — граммотрицательная 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.).

**ERK1 и 2** (extracellular signal-regulated kinases) – экстрацеллюлярная сигнальрегуляторная киназа, активируемая MEK-киназой путем фосфорилирования. Непосредственно ERK1 и 2 фосфорилируют факторы, поступающие в ядро.

**З**

**Запаздывающая цепь** – цепь дочерней ДНК, на которой синтез комплементарной цепи во время репликации осуществляется посредством соединения фрагментов Оказаки.

**И**

**Изоакцепторные тРНК** – группа тРНК, связывающих одну и ту же аминокислоту, но имеющих разные антикодоны; разные И.тРНК узнаются одной и той же аминоацил-тРНК-синтетазой; И.тРНК отсутствуют у метионина и триптофана, а наибольшее их число (по 6) распознают кодоны аденина, лейцина и серина; И.тРНК могут иметь одинаковые антикодоны, но различную первичную структуру.

**Инвертированные концевые повторы** – короткие гомологичные последовательности, ориентированные в противоположных направлениях, расположенные на концах некоторых мобильных генетических элементов, например, IS-элементов.

**Инвертированный повтор** – участок молекулы нуклеиновой кислоты, два сегмента которого имеют одинаковую нуклеотидную последовательность, но противоположную ее ориентацию.

**Индуктор** – небольшая молекула, включающая транскрипцию гена за счет связывания с регуляторным белком.

**Индукция** – свойство клеток (бактериальных или дрожжевых) синтезировать определенные ферменты только при наличии соответствующих субстратов; применительно к экспрессии генов термин означает включение транскрипции в результате взаимодействия индуктора с регуляторным белком.

**Иницирующий кодон** (*initiator codon*) — кодон АУГ в составе мРНК, кодирующий метионин (формилметионин), с которого начинается (иницируется) синтез многих (возможно - всех) полипептидных цепей, у бактерий кроме АУГ инициацию определяет иногда ГУГ, у эукариот – всегда АУГ.

**Иницирующий комплекс** – структура, необходимая для инициации синтеза полипептидной цепи рибосомами, состоит из малой (30S) субъединицы рибосомы, молекул иницирующих факторов,

формилметиониновой тРНК, ГТФ и собственно транслируемой мРНК; также И.К. – комплекс РНК-полимеразы с матричной ДНК и инициаторным рибонуклеозидтрифосфатом, образование которого необходимо для инициации транскрипции.

**Интеграция** – внедрение вирусной или иной последовательности ДНК в геном клетки-хозяина, приводящее к ковалентному соединению с хозяйской последовательностью.

**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.

**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.

**Искусственные генетические структуры** — целенаправленно сконструированные (созданные) новые формы биологически активных ДНК и генетически новые формы клеток с помощью искусственных приемов 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.

***In vivo*** — выращивание живого материала в естественных условиях.

## 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 плаزمиде (кольцевая карта сцепления) и относительного расстояния между ними. Генетиче-

ские 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. Секвенирование ДНК).

**Каспазы** (англ. caspases) – протеазы, имеющие цистеин в активном сайте и разрезающие белки-мишени по аспарагиновой кислоте.

**Катаболическая репрессия** – ослабление экспрессии многих бактериальных оперонов, происходящее при добавлении глюкозы, вызывается уменьшением уровня циклического АМР в клетке и инактивацией вследствие этого регуляторного CAP-белка.

**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 двунигчатая молекула ДНК, комплементарная молекуле иРНК. Образуется при обратной транскрипции иРНК с помощью обратной транскриптазы (см.) *in vitro*. кДНК соответствует определенному гену без интронов.

**Киназы** – ферменты, катализирующие перемещение фосфатной группы из высокоэнергетического положения (как в АТФ) в другую молекулу.

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

**Клеточный цикл** – жизнь клетки с момента ее образования в процессе деления материнской клетки до собственного деления (включая это деление) или до гибели.

**Клонирование гена** (*gene cloning*) — см. Клонирование ДНК.

**Клонирование ДНК** (*DNA cloning*) — использование технологии рекомбинантной ДНК для инсерции (включения) фрагмента ДНК, напр, гена (см.), в клонирующий вектор 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 (ОН) у 3'-атома углерода рибозы или дезок-

сирибозы.

**3'-Конец праймера** — конец праймера со свободной гидроксильной группой (ОН) у 3' атома углерода рибозы с которого Таг-полимераза достраивает растущую цепь ДНК в 5'-3' направлении на третьей стадии цикла ПЦР (см.).

**5'-Конец** (*5'-carbon atom end or 5'-terminus*) — один из концов линейной молекулы ДНК или РНК, несущий нуклеотид с гидроксильной (ОН) группой в остатке фосфорной кислоты 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 дезоксирибонуклеотид-5'-трифосфатов к 3'-ОН-группам обоих концов двуничейной ДНК или к одноничейной ДНК, образуя 3'-гомополимерное удлинение нити (полидезоксиденилат) 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.).

**Кроссинговер** — (от англ. *crossingover* — перекрест) — механизм взаимного обмена генами и целыми сегментами хроматид между спаренными гомологичными хромосомами в процессе мейоза. При конъюгации хромосом за счет перекреста двух хроматид, переходящих от одной хромосомы к другой, возникают хиазмы. Кроссинговер характеризуется разрывом этих хиазм, причем сегменты перекрещенных хроматид остаются включенными в состав соседних гомологичных хромосом, в результате чего и происходит обмен наследственными факторами между гомологичными хромосомами. Термин введен Морганом (1911).

**Космиды** — векторная плазида, 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.

**Кэп** – структура на 5'-конце эукариотических иРНК; образуется после транскрипции за счет присоединения 5'-конца гуанинового нуклеотида к 5'-концевому основанию иРНК. Эта структура может быть метилирована, по крайней мере, по той молекуле гуанина, которая присоединилась. «Кэп» имеет следующее строение - 7MeG5'ppp5'Np...

## Л

**Лактозный оперон, lac-оперон** – комплекс генов (общий размер – около 6 тыс. пар нуклеотидов) ДНК *E. coli*, включающий генератор и 3 структурных гена: *lacZ* (кодирует  $\beta$ -галактозидазу), *lacY* ( $\beta$ -галактозидпермеазу), *lacA* ( $\beta$ -галактозидтрансацетилазу), – в результате транскрипции Л.о. образуется полицистронная мРНК; белокрепрессор кодируется геном *lacI*, кодируемые генами *lacY* и *lacZ* ферменты участвуют в транспорте и расщеплении лактозы, а продукт гена *lacA* изомеризует лактозу с образованием алло-лактозы, которая является индуктором Л.О

**lac-Z-ген** (*lac-Z-gene*) — ген лактозного оперона *E. coli*, кодирующего  $\beta$ -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.

**Лиганд** – небольшая молекула (например, активаторы, субстраты и ингибиторы активности фермента), связанная с белком нековалентными связями; ион или молекула, которая связывает другие химические компоненты, образуя сложный комплекс.

**Лигирование** (*ligation*) — 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 в плазмидную ДНК с помощью фермента лигазы (см.).

**Лидирующая цепь** – дочерняя цепь ДНК в репликативной вилке, синтезирующаяся непрерывно.

**Лигаза, синтетаза** – см. ДНК-лигаза.

**Лигирование** (*ligation*) – 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.

**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 Т4ДНК-лигазы (см.).

**Линия** – культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

**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.

**Люцифераза** – фермент, катализирующий реакцию, сопровождающуюся испусканием света (биолюминесценцией), при расщеплении субстрата люциферина (от слова Люцифер («светоносец»)). Наиболее широко известна люцифераза светлячка *Photinus pyralis*. Широко используется в генной инженерии в качестве *репортерного гена* (см.)

## М

**Макрогамета** [гр. *makros* большой + *gamete* жена] – женская особь у простейших, имеющих в жизненном цикле половой процесс. Макрогамета обычно неподвижная, содержит запас питательного материала.

**Макрогаметоцит** – половая клетка, из которой развивается макрогамета.

**Макросателлит** – относительно крупный спутничным элемент, диаметр которого превышает половину толщины нити хроматиды.

**Малая ядерная РНК** (мяРНК) – транскрипты РНК длиной 100-300 п. о., которые, связываясь с белками, формируют малые ядерные рибонуклеопротеиновые частицы. Большинство мяРНК являются

компонентами сплайсосом

**Маркер для селекции (селективный маркер)** – специальный ген, кодирующий устойчивость к к.-л. антибиотику (напр., канамицину), который вводят в вектор для последующего отбора трансформантов.

**Метод дробовика («шот-ган»)** (*shotgun*) — получение случайной массивированной выборки клонированных фрагментов ДНК данного организма (т.е. “дробление” генома), на основе которых может быть составлена его геномная библиотека; полученные в результате “Ш.-г.” последовательности нуклеотидов после дополнительного клонирования могут быть использованы в различных генетических экспериментах.

**Метилирование** – процесс присоединения к нуклеотиду метильной группы – в частности, в ДНК клеток животных «в норме» метилированы до 7% остатков цитозина, причем сателлитная ДНК обычно метилирована в значительно большей степени, чем ДНК структурных генов, у которых метилированная ДНК обычно ассоциирована с неактивным состоянием, а деметилированная – с активацией генов, исключением из этого правила является ген Об-метилгуанин-ДНКметилтрансферазы, более экспрессированный при большем уровне М.; у бактерий процесс М. сайтов рестрикции (модификация) предохраняет ДНК от разрушения собственными эндонуклеазами и контролируется специфическими метилазами.

**Микроинъекция** (*microinjection*) – введение растворов каких-либо веществ в микроскопические объекты (клетки, ядра и т.п.); метод М. является одним из основных методов введения ДНК в генной инженерии.

**Микросателлиты, микросателлитные локусы (STR-локусы, Short Tandem Repeats)** — варьирующие участки (локусы) в ядерной ДНК и ДНК органелл (митохондрией и пластид), состоящие из большого количества – до ста и выше - tandemно повторяющихся идентичных «мотивов». Мотивом является короткая последовательность из нескольких (от двух до восьми) пар нуклеотидов, обычно называемая «повтором» В зависимости от длины повтора микросателлиты классифицируют на локусы с ди-, три-, тетра-, пента-, и гексануклеотидными повторами. Являются широко распространёнными молекулярными маркерами в генетических и геномных исследованиях.

**Минисателлиты** (*minisatellites*) — короткие (14-100 н.п.), среднеповторяющиеся, tandemно организованные, высоко-вариабельные последовательности ДНК (обычно богатые ГЦ-последовательностями), рассредоточенные по геному человека (встречаются

также у растений и животных). М.-с. проявляют значительный полиморфизм по длине, который возникает в результате неравного кроссинговера. В итоге в М.-с. изменяется число коротких tandemных повторов (см.), что ведет к образованию последовательностей длиной от 0,1 до 20 кб. Короткий tandemно 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 однойцевых близнецов, см.), выявляющихся в результате гибридизации на радиоавтографах.

**Митоген (mitogen)** – любое соединение (продукты дегенерации, специфические митотические гормоны и др.), стимулирующее клетки к вступлению в митоз; фактор, вызывающий переход клеток из G<sub>0</sub>-фазы к клеточному делению. Пример – факторы роста.

**Митоген-активируемые киназы (МАРК)** – это протеинкиназы, которые отвечают на внеклеточные стимулы (митогены) и регулируют многие клеточные процессы (экспрессию генов, деление, дифференцировку и апоптоз). Внеклеточные стимулы ведут к активации МАРК через сигнальный каскад (наприм., **Ras/МАРК-каскад**). К членам семейства МАРК относятся: белки **Raf**, киназы **ERK1 и 2** (extracellular signal-regulated kinases); киназы **МЕК** (MEKK, – mitogen activated extracellular kinases) и др.

**Митохондриальный геном** – кольцевая двунитевая молекула ДНК, входящая в состав митохондрий (размер мтДНК у животных обычно около 16 тыс. пар оснований, а в различных группах растений и микроорганизмов эта величина существенно больше и высокоизменчива); М.Г. включает гены тРНК и рРНК, некоторых ферментов (субъединицы АТФазы, цитохромоксидазы и др.), в нем имеются некоторые отклонения от универсального триплетного кода (например, триплет УГА, являющийся стоп-кодоном в ядерном геноме, в М.Г. животных кодирует триптофан); как правило, М.Г. наследуется по материнскому типу; анализ структуры мтДНК с использованием рестриктаз широко применяется в популяционно-генетических исследованиях.

**Медиаторы** (от лат. mediator - посредник) — вырабатываемые нервными клетками и выделяемые в межклеточное пространство физиологически активные вещества, с помощью которых осуществляется начальный этап передачи нервного импульса. Связываясь с мем-

браной рецептора, медиатор изменяет ее проницаемость для определенных ионов, что приводит к созданию необходимого для передачи импульса активного электрического потенциала. К числу медиаторов центральной нервной системы относятся ацетилхолин, адреналин, серотонин и др.

**Модель двухцепочечной молекулы ДНК** - В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик, основываясь на данных Э. Чаргаффа и Р. Франклин, построили пространственную модель молекулы ДНК и истолковали ее роль, как носителя генетической информации (рис.). Согласно их модели молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных комплементарных цепочек, закрученных в двойную спираль. Азотистые основания нуклеотидов обеих цепей ДНК заключены внутри между витками спирали и соединены водородными связями. В соответствии с правилами Чаргаффа аденин одной цепи связан только с тиминем другой цепи, а гуанин – только с цитозином. Такой порядок соответствия азотистых оснований ( $A=T$  и  $G=C$ ) называется комплементарностью, и, следовательно, цепи в ДНК комплементарны друг другу. В каждой из цепей ДНК нуклеотиды последовательно соединены друг с другом с помощью остатка фосфорной кислоты и молекулы дезоксирибозы. Обе цепи в молекуле ДНК имеют противоположную направленность, одна имеет направление  $5'-3'$ , а другая  $3'-5'$ .

**Модификация** – видоизменение, преобразование, характеризующееся появлением новых свойств.

**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-фингерпринтинг, Секвенирование ДНК, ПЦР-технологии). Молекулярно-генетическая диагно-

стика может давать точную идентификацию наследственных заболеваний на всех стадиях развития и жизни организма человека, начиная с восьмиклеточного пре-эмбриона, всех эмбриональных стадий внутриутробного развития, пост эмбриональных стадий и т.д.

**Мутация** (mutation) [лат. *mutatio* - изменение] – редкое спонтанное (естественное) или искусственно вызываемое с помощью мутагенов (см. *Мутаген*) наследуемое изменение в нуклеотидной последовательности ДНК. М. - единственный источник новых наследственных изменений. По характеру изменения генетического аппарата М. делят на геномные, хромосомные и генные.

**Рес-мутация** – мутация, нарушающая процесс гомологичной рекомбинации у *E.coli*; R.-М. происходят в нескольких генах, кодирующих ферменты, которые участвуют в рекомбинации по типу «разрыв-соединение» (экзонуклеаза, ДНК-полимераза, ДНК-лигаза и т.д.); впервые R.-М. была получена у *E.coli* А. Кларком и А. Маргуэлисом в 1965, кроме того, они показали резкое возрастание чувствительности Рес-мутантов к ультрафиолету, что подтвердило близкую связь репарационного и рекомбинационного процессов, в частности, общность участвующих в них ферментов.

**Мутаген** — физический или химический агент, увеличивающий частоту мутаций по сравнению со спонтанным уровнем.

**МЕК 1 и 2** (MEKK, – mitogen activated extracellular kinases kinases) – митогенактивируемые экстрацеллюлярные киназы киназ, которые активируется путем фосфорилирования RAF белками. МЕК фосфорилируют ERK1 и 2, которые в свою очередь фосфорилируют факторы, поступающие в ядро.

## Н

**Наследственно измененные организмы** – см. ГМО, трансгенные организмы, трансформированные организмы.

**Нитроцеллюлозная (пленка) мембрана** – состоит из нитроцеллюлозных нитей, образующих поры определенного размера (0,45µm). Селективно (выборочно) улавливают двунитчатую ДНК или ДНК-РНК-гибриды, но свободно пропускают одонитчатые молекулы. Одонитчатые ДНК и РНК также могут задерживаться на Н. м., если ее проинкубировать при 80°C в течение 2 ч (спекание). Такие блоты (пленки) используются в Саузерн- и Нозерн-блот экспериментах.

**Нуклеиновая кислота** – универсальный биополимер, состоящий из рибо- или дезоксирибонуклеозидмонофосфатов, соединенных фосфодиэфирными связями, образованными между 5'-фосфатом од-

ного нуклеотида и 3'-гидроксильной группы следующего; молекулярная масса Н.К. может достигать 1010; различают (по типу входящих сахаров) 2 основных типа Н.К. – ДНК и РНК, главная роль Н.К. – хранение и передача генетической информации; термин «Н.К.» предложен в 1889 (впервые Н.К. обнаружена в лейкоцитах человека Ф. Мишером в 1868).

**Нуклеозид** – химическое соединение, состоящее из остатков азотистого основания и углевода – рибонуклеозид и дезоксирибонуклеозид; основные природные Н. входят в состав нуклеиновых кислот (аденозин, гуанозин, уридин, цитидин, тимидин); Н. образуются при гидролизе нуклеиновых кислот и нуклеотидов.

**Нуклеосома** – дисковидная структура диаметром около 10 нм, являющаяся элементарной единицей упаковки хромосомной ДНК в хроматине; состоит из белкового ядра (включает октамер гистонов H2, H3, H4, но не H1), «опоясанного» 7/4 оборота двойной спирали ДНК (140 пар нуклеотидов), межнуклеосомные участки ДНК (линкеры) по длине варьируют в пределах 15–100 и более пар нуклеотидов; суммарная молекулярная масса одной Н. оценивается в 262 кД (108 кД приходится на гистоны, 130 кД – на ДНК, 24 кД – на небольшие негистоновые белки); нуклеосомная структура универсальна для эукариотических организмов – ее отсутствие известно в сайтах, сверхчувствительных [к ДНКазе].

**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.). Являются мономерами нуклеиновых кислот. 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 двуническую ДНК с использованием в качестве матрицы однонической 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

ром, 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.

**Оператор** – участок ДНК, узнаваемый специфическими белками-репрессорами и негативно регулирующий транскрипцию структурных генов, размер – несколько десятков нуклеотидов; как правило, О. непосредственно примыкает к регулируемому структурному гену (согласно модели оперона); известны точковые мутации О., ведущие к постоянной (конститутивной) экспрессии соответствующего гена.

**Оперон, транскриптон** (*operon*) — участок бактериальной хромосомы, содержащий несколько структурных генов (например, *lac*-О. *E. coli* включает 3 гена), транскрибируемых с образованием одной полицистронной молекулы мРНК (см.); каждый О., как правило, включает специфические ген-оператор и ген-регулятор, контролирующие его транскрипцию.

**Открытая рамка считывания** (*open reading frame, ORF*) — последовательность нуклеотидов ДНК, которая начинается с иницирующего кодона АТГ и заканчивается одним из трех терминирующих кодонов - ТАА, ТАГ или ТГА; потенциально **О.р.с.** может быть транслирована в полипептидную цепь.

**Отжиг** (*annealing*) — процесс восстановления (ренатурация), называемый также гибридизацией, нуклеиновой кислоты, во время которого одноцепочечные полинуклеотиды образуют двухцепочечную молекулу с водородными связями 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

**Палиндром** – участок двухцепочечной молекулы ДНК, обе цепи которого обладают одинаковой последовательностью нуклеотидов при прочтении от 5' – к 3'-концу, т.е. П. является тандемным инвертированным повтором. П. играют важную роль в обеспечении процессов терминации транскрипции (у прокариот П. обнаружены во

всех терминаторных участках генов), являются сайтами действия рестриктаз, а также участвуют в ряде др. процессов.

**Первая рекомбинантная (гибридная) молекула ДНК** — создана в 1972 г. П. Бергом, которая включала в себя фрагменты фага  $\lambda$ , *E. coli* и вируса обезьян *sv-40*.

**Плазмиды** — внехромосомный (экстрахромосомный) генетический элемент, кольцевая, автономно реплицирующаяся двухцепочечная 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, мультико-пийных 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 *pSC101*, ориджин репликации *ori* и *rep*-ген от *Col E1*, 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<sup>r</sup>* геном, кодирующим ампициллин-устойчивость, ориджином репликации *ori* (см.) и последовательно-

стями, кодирующими  $\alpha$ -пептид *lac-Z*-гена ( $\beta$ -галактозидазы) с полилинкером (см.). Инсерция чужеродной ДНК в полилинкер приводит к нарушению  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

**Повторяющаяся нуклеотидная последовательность (ДНК) (*repetitious DNA*)** — последовательность нуклеотидов, содержащаяся в хромосомной ДНК в виде идентичных копий; различают высокоповторяющиеся нуклеотидные последовательности (млн. копий на геном), а также умеренно повторяющиеся последовательности (десятки и сотни копий на геном).

**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 олигонуклеотид, содержащий много сайтов рестрикции (см.). П. вводят в векторы, чтобы расширить их возможности для встраивания чужеродных ДНК.

**Полимеризация** — третья стадия цикла ПЦР в ходе которой при увеличении температуры в реакционной смеси *in vitro* с 50°C до 72°C *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°C гибрид праймер-ДНК не денатурирует, а *Tag*-полимераза способна работать с большой скоростью.

**Полимеразная цепная 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 праймера 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 до 90°C. При последующем снижении температуры до 50°C праймеры присо-

единяются 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*<sup>TM</sup>-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.

**Полисахариды** — линейные или разветвленные полимеры, состоящие более чем из 10 моносахаридов, связанных гликозидными связями.

**Полицистронная мРНК** (*polycistronic message*) — молекула мРНК, кодирующая последовательности более чем одного белка; образуется при транскрипции двух или нескольких соседствующих генов, входящих в состав одного оперона.

**Полуконсервативная репликация** — способ репликации двухцепочечной молекулы ДНК, при котором исходная молекула разделяется на две цепи (с образованием репликативной вилки), каждая из которых служит матрицей для синтеза второй (новой) комплементарной полинуклеотидной цепи; гипотеза П.Р. была выдвинута Дж. Уотсоном и Ф. Криком одновременно с идеей о двойной спирали ДНК, а доказана опытами М. Мезельсона и Ф. Сталя по переносу меченой ДНК с использованием метода центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия.

**Последовательность Шайна-Далгарно** — консервативная последовательность в прокариотических иРНК, комплементарная последовательности, находящейся вблизи 5' —конца 16S рибосомной РНК, и, таким образом, участвующая в процессе инициации трансляции.

**Популяция** [лат. *populus* - народ, население] - совокупность особей одного вида организмов, длительно населяющих определенную территорию, в пределах которой возможна та или иная степень свободного скрещивания (панмиксия) между ними.

**Последовательность узнавания** — см. Сайт узнавания.

**Правило Чаргаффа** — правило, гласящее, что в любой двуни-чатой молекуле ДНК число адениновых оснований всегда равно числу тиминовых ( $A = T$ ), а число гуаниновых — числу цитозино-вых ( $G = C$ ) оснований. Согласно П. Ч. количество пиримидинов ( $T + C$ ) равно сумме пуринов ( $A + G$ ). П. Ч. открыто в 1950 г. и является одним из главных принципов в создании 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 реакции, ПЦР (см.) и др.

**Праймазы, ДНК-праймазы (DNA primase)** – ферменты, осуществляющие синтез РНК-затравок для последующего синтеза фрагментов Оказаки, а также синтез РНК-затравок в процессе синтеза репликативной формы ДНК бактериофагов. У эукариот ДНК-праймаза является субъединицей ДНК-полимеразы. В отличие от обычных [РНК-полимераз](#) ДНК-праймаза способна использовать в качестве субстрата как рибо-, так и [дезоксирибонуклеотиды](#); образует комплекс с другими ферментами – [праймсомому](#) (см).

**Праймосома** – комплекс ферментов, обеспечивающих синтез запаздывающей цепи в репликативной вилке посредством образования фрагментов Оказаки; один из основных ферментов П. – ДНК-праймаза (см).

**Пре-мРНК** – предшественник мРНК (часто очень большого размера), синтезированный на матрице ДНК структурного гена в процессе транскрипции и до выхода из ядра претерпевающий посттранскрипционные модификации.

**Принцип комплементарности** — пространственная взаимодополняемость (взаимное соответствие) поверхностей взаимодейству-

ющих молекул или их частей, приводящая 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.

**Прионы (от англ. proteinaceous infectious particles — белковые заразные частицы)** — особый класс инфекционных агентов, чисто белковых, не содержащих нуклеиновых кислот, вызывающих тяжёлые заболевания центральной нервной системы у человека и ряда высших животных (т. н. «медленные инфекции»). Прионный белок, обладающий аномальной трёхмерной структурой, способен прямо катализировать структурное превращение гомологичного ему нормального клеточного белка в себе подобный (прионный), присоединяясь к белку-мишени и изменяя его конформацию. Как правило, прионное состояние белка характеризуется переходом  $\alpha$ -спиралей белка в  $\beta$ -слои. Прионы — единственные инфекционные агенты, размножение которых происходит без участия нуклеиновых кислот.

**Прокариоты** – организмы, клетки которых лишены ограниченного мембраной ядра; аналогом ядра является нуклеоид, генетическая система которого (генофор) соответствует примитивной хромосоме; митоза у П. нет, клетки П. лишены хлоропластов, митохондрий, аппарата Гольджи, центриолей, а рибосомы существенно отличаются от рибосом эукариотических клеток; П. составляют отдельное царство (возможно, надцарство), включающее одноклеточные (архебактерии, эубактерии) и многоклеточные (сине-зеленые водоросли, или цианобактерии) организмы; термин «П.» предложен в 1937 Э. Шаттоном, который впервые сформулировал принципиальные различия П. и эукариот.

**Промотор (promoter)** — участок молекулы ДНК длиной 80-120 п. н., к которому присоединяются молекулы РНК-полимеразы, что со-

проводится инициацией транскрипции соответствующих генов; каждый ген (или оперон) имеет свой П., контролирующей его транскрипцию; существование П. впервые было показано Ф. Жакобом и Ж. Моно при анализе *lac*-оперона *E. coli*.

**Протеазы** – ферменты, катализирующие гидролиз белков, то есть расщепление пептидных связей, которыми соединены остатки аминокислот в белковых молекулах. Синоним: пептидазы.

**Протеинкиназы** – ферменты, катализирующие присоединение к молекуле белка фосфатной группы (групп) в местах расположения остатков серина, треонина или тирозина.

**Протоонкоген (proto-oncogene)** – ген, контролирующей нормальную пролиферацию или дифференцировку клеток, который в результате соматической мутации или транспозиции может превращаться в онкоген; в норме протоонкогены кодируют протеинкиназы (напр., гены семейства *c-src*), мембранно-связанные белки (семейство *c-ras*), факторы роста и их рецепторы.

**Процессинг** – комплекс процессов образования зрелых молекул РНК и белков в клетке; включает ряд последовательных расщеплений молекулы-предшественника эндонуклеазой или протеазами с образованием конечных, функционально активных продуктов (например, 41S-, 32S-, 20S-рРНК у многих эукариот – промежуточные; 5,8S-, 18S-, 28S-рРНК – конечные) и деградации «избыточных» участков; у эукариот П. мРНК включает этап вырезания интронов и образования зрелой молекулы в результате сплайсинга; также к системе П. относят различные модификации – например, метилирование отдельных оснований и др.

**ПЦР (PCR)** — см. Полимеразная цепная реакция.

**ПЦР-амплификации** — см. полимеразная цепная реакция (ПЦР), амплификация генов.

**ПЦР технологии** — различные методы размножения (амплификация) ДНК с помощью ПЦР.

**p53 (белок p53)** – это транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл. p53 выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей, соответственно ген TP53 является антионкогеном.

## Р

**Радиоактивно меченный ДНК-зонд** — см. ДНК-зонд.

**Разделение рестрикционных фрагментов ДНК** — см. Электрофорез в агарозном геле.

**Распознаваемые участки** — см. Сайты распознавания.

**гесА** - обнаруженный у большинства бактерий белок, играющий важную роль в процессах репарации и рекомбинации ДНК.

**Рекомбинация** – перераспределение генетического материала родителей, приводящее к наследственной комбинативной изменчивости; в общем смысле под Р. понимают создание новой комбинации генов при соединении гамет родителей, более узко Р. – обмен участками хроматид и хромосом в процессе клеточного деления; у прокариот Р. осуществляется в процессе конъюгации, трансформации либо трансдукции, у вирусов – при смешанной инфекции; у эукариот, как правило, Р. характерна для мейоза (мейотическая Р.), но иногда имеет место и в митозе (соматическая Р.); различают реципрокную (взаимный обмен участками молекулы ДНК), нереципрокную (односторонний перенос участка ДНК); общую (кроссинговер), сайт-специфическую и незаконную Р. (обмен участками негомологичных хромосом в результате хромосомных перестроек).

**Рекомбинация генов** – (от лат. ге – снова и combinare – соединять) – обмен генами между двумя хромосомами или между двумя клетками, отличающимися друг от друга своими геномами. Последнее может происходить при «гибридизации» соматических клеток, соматическом кроссинговере. Единицей генетической рекомбинации является рекон. Рекомбинация генов имеет большое биологическое значение в плане эволюционных преобразований клеток и организмов, так как вследствие ее могут возникнуть такие сочетания генов, которые отсутствуют у родительских форм.

**Рекомбинационная репарация** – один из молекулярных механизмов репарации, имеющих место при рекомбинации по типу «разрыв-соединение», – образование нативной молекулы ДНК путем обмена ее поврежденного сегмента на неповрежденный в процессе рекомбинации между 2 молекулами.

**Рентгеноструктурный анализ** – один из важных методов исследования молекулярной организации клеток, основанный на использовании явления дифракции (огибания) рентгеновых лучей при пропускании их через объект. В зависимости от характера расположения молекул в пространственной решетке объекта на фотопластинке возникает изображение концентрических колец и дуг, по ширине которых и расстоянию между ними определяют размеры и расположение молекул. На основе рентгеноструктурного анализа предложена схема строения молекулы ДНК.

**Ренатурация** – восстановление нативной (биологически активной) пространственной структуры биополимера (белка или нуклеино-

вой кислоты); в частности, Р. ДНК (после денатурации нагреванием) может происходить при медленном охлаждении, что используется для получения гибридных гетеродуплексов.

**Репаративная репликация** – этап эксцизионной репарации, в процессе которого происходит застройка образовавшихся брешей, осуществляемая в соответствии с принципами репликации ДНК с участием ДНК-полимеразы I.

**Репаративные ферменты** – набор специфических ферментов клетки, участвующих в процессе репарации; к Р.Ф. относятся нуклеазы (например, кодируемые у *E.coli* генами *uvrA* и *uvrB* и вырезающие поврежденные участки ДНК), ДНК-полимераза I, фотореактивирующий фермент – дезоксирибопиримидинфототиаза (кодируется у *E.coli* геном *phr*), участвующий в фотореактивации, а также ряд др. менее специфических для репарации ферментов – например, ДНКлигаза.

**Репарация, репаративный синтез** – восстановление нативной первичной структуры молекулы ДНК (т.е. исправление повреждений, спонтанно возникающих в процессе репликации и рекомбинации или вызванных действием внешних факторов); различают фотореактивацию, эксцизионную и пострепликативную Р.; Р. осуществляется с помощью набора специфических репаративных ферментов; дефектность Р. ДНК наблюдается при некоторых наследственных заболеваниях человека – пигментной ксеродерме, атаксии-телангиэктазии, анемии Фанкони, трихотиодистрофии и др.

**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 цепь, лидирующая цепь нить), должна отделяться от др. (запаздывающей) нити, которая реплицируется прерывисто, короткими кусками (фрагменты Оказаки). После синтеза фрагменты Оказаки лигируются (с участием ДНКлигазы), образуя целую запаздывающую нить.

**Репликация по типу «Катящееся кольцо»** - способ репликации, при котором репликационная вилка совершает множество оборотов на циркулярной матрице; синтезирующаяся в каждом цикле цепь

ДНК вытесняет цепь, синтезированную в предыдущем цикле, образуя хвост, состоящий из линейного набора последовательностей, комплементарных одноцепочечному матричному кольцу.

**Репликон** – автономная единица репликации, находящаяся под контролем одной точки инициации репликации (репликатора); у прокариот Р. представлен всем геномом, а у эукариот геном может включать множество Р.; термин «Р.» предложен Ф. Жакобом и С. Бреннером в 1963.

**Реплицирующийся участок** – участок ДНК (репликон), проходящий процесс репликации в определенный момент времени; ввиду значительной десинхронизации процесса репликации у эукариот распределение Р.У. оказывается видо- и хромосомоспецифичным, что было продемонстрировано, в частности, для генома человека В. Шмидом в 1963.

**Репрессор** – (от лат. *repressio* – подавление) – белок, кодируемый геном-регулятором, способный блокировать действие функционирующего гена-оперона, что приводит к снижению уровня синтеза белков. При связывании репрессора метаболитами, называемыми эффекторами, синтез белков вновь активизируется.

**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,  $\beta$ -глюкуронидазы, хлорамфениколацетилтрансферазы 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.

**Ретротранспозоны** – группа мобильных генетических элементов, перемещение которых осуществляется с использованием механизма

обратной транскрипции (при участии обратной транскриптазы); к Р. относятся мобильные диспергированные гены дрозофил, Ту-элемент дрожжей и др.

**Рецептор** – локализованный в плазматической мембране трансмембранный белок, способный связываться с лигандом на наружной стороне мембраны и, тем самым, вызывать изменение активности на стороне, обращенной к цитоплазме. Часто используется для обозначения участка молекулы, который делает возможным связывание лигандов.

**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 дву-нитчатых РНК.

**Рибосома** — органоид клетки, с помощью которого осуществляется биосинтез белка. Р. представляет собой асимметричную рибонуклеопротеидную частицу диаметром 10—20  $\mu\text{m}$ , 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 иРНК начинается синтез полипептидов. Малая субъединица содержит единственную цепь рРНК (16S — у прокариот, хлоропластов и растений, 18S рРНК — у животных), ассоциированную с рибосомным белком (S-белки), которая связывается с иРНК. Крупная субъединица является комплексом единственной большой цепи рРНК (23S рРНК — у прокариот, 25S — у растений и митохондрий, 28S — у животных), одной или двух малых рРНК (5S — у прокариот, 5S и 5,8S — у эукариот) и рибосомных L-белков. Этот комплекс несет сайт для присоединения 2—3 молекул тРНК.

**РНК-затравка** – олигорибонуклеотид, синтезируемый с участием РНК-полимеразы (см) или ДНК-праймазы (см): с 5'-конца РНК-3. с участием ДНК-полимеразы III инициируется синтез новой молекулы ДНК (или фрагмента Оказаки), после чего РНК-3. отщепляется, образуя брешь одновременно застраивается ДНК-полимеразой I, а одноцепочечные разрывы репарируются ДНК-лигазой.

**РНК-полимераза, РНК-синтетаза** – фермент, осуществляющий матричный синтез РНК из рибонуклеозидтрифосфатов; в зависимости от используемой матрицы – ДНК или РНК – различают ДНК-зависимую и РНК-зависимую РНК-П.; у прокариот имеется 2 типа РНК-П.: одна из них синтезирует РНК-затравки для фрагментов Оказаки, а другая – все остальные типы РНК; у эукариот – 3 типа РНК-П.: РНК-П. I осуществляет синтез рРНК, РНК-П. II синтезирует мРНК, а РНК-П. III – тРНК, 5S-РНК и др. небольшие РНК; активность РНК-П. может полностью подавляться некоторыми антибиотиками – например, рифамицином и актиномицином D (бактериальная РНК-п.), альфа-аманитином (РНК-П. II прокариот).

**Ро-зависимый терминатор** – терминатор (последовательность нуклеотидов, обеспечивающая терминацию транскрипции), для нормального функционирования которого необходимо присутствие ро-фактора.

**Ро-независимый терминатор** – терминатор, функционирующий в отсутствие ро-фактора; характерной особенностью структуры Р.-Н.Т. является наличие ГЦ-богатого участка с центральной симметрией, предшествующего кластеру из 4–8 адениловых нуклеотидов в значащей цепи.

**Ро-фактор, фактор терминации** – белок E.coli, необходимый для осуществления терминации транскрипции на ро-зависимых терминаторах; Р.-Ф. в активной форме – тетрамер с молекулярной массой 55 кД; in vitro Р.-Ф. в каталитических количествах функционирует как фактор терминации, а также обладает РНК-зависимой АТ-

Фазной (ГТФазной) активностью, необходимой для его функционирования.

**Ras-белки** – регуляторные мембраносвязанные G-белки, состоящие из 189 аминокислотных остатков. Они осуществляют один из первых этапов передачи сигнала извне клетки и, как правило, регулируют размножение клеток. В соответствии с характером посттрансляционной модификации имеется три изоформы Ras: N, H и K. Некоторые мутации могут приводить к постоянной активации Ras, что нарушает регуляцию деления клеток. Ошибки в регуляции Ras могут привести к росту опухоли и метастазированию.

**Ras/MAPK-путь** – сложный разветвленный путь внутриклеточной передачи сигнала у эукариот. На этом пути сигнал от тирозинкиназного рецептора передается через ряд белковых посредников, ключевым из которых является белок Ras, на митогенактивируемые протеинкиназы (MAPK), которые последовательно активируя друг друга (Raf-MEK-ERK) путем фосфорилирования в конечном итоге фосфорилируют транскрипционные факторы, поступающие в ядро. Следствием этого является изменение генной экспрессии, увеличение роста и дифференцировки клеток.

**Raf-белки** – это серин/треониновые киназы, активируемые с помощью Ras-белков. Состоят из двух доменов, из которых C-терминальный является каталитическим. Известны три изоформы Raf – A, B и C. Каждая изоформа различается по активности. Raf путем фосфорилирования активирует одну из цитоплазматических MAPK – MEK – серин/треониновую киназу (прежде известную как MAP киназа киназа, MAPKK). Далее следует каскад последовательной активации протеинкиназ. Непосредственно MEK или другие MAPK фосфорилируют факторы, поступающие в ядро.

**С**

**Сайленсер (англ. silencer)** — последовательность ДНК, с которой связываются белки-репрессоры (факторы транскрипции). Связывание белков-репрессоров с сайленсерами приводит к понижению или к полному подавлению синтеза РНК ферментом ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Сайленсеры могут находиться на расстоянии до 2500 пар нуклеотидов от промотора.

**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 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.

**Самостоятельная репликация** — способность ряда внехромосомных генетических элементов (плазмид) к автономной репликации.

**Сателлитная ДНК** — избыточная геномная ДНК, как правило, резко отличающаяся смещением соотношения А+Т/Г+Ц (в сторону А+Т — «легкая» сатДНК; в сторону Г+Ц — «тяжелая» сатДНК) от др. участков ДНК, содержащаяся в значительном (105 и более) числе повторов и, соответственно, ренатурирующая намного быстрее уникальных последовательностей; С.ДНК может быть выделена при центрифугировании в градиенте плотности хлорида цезия в виде добавочной («сателлитной») по отношению к основным фракциям; как правило, С.ДНК локализована в центромерах и реже — теломерах хромосом и входит в состав гетерохроматина.

**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 ДНК-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.

**Секвенирование ДНК (*DNA sequencing*)** — метод определения последовательности оснований в молекуле ДНК. Существует несколько методов секвенирования: автоматическое, химическое, прямое, секвенирование по Максаму-Гилберту, Сэнгеру и др.

**Секвенирование 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  $^{35}\text{S}$  или фосфора  $^{32}\text{P}$ , 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.

**Секвенирование ДНК по Сэнгеру, ферментативный метод (*Senger sequencing or enzymatic method s.*)** — техника секвенирования (см.) однонитчатой ДНК. В основе метода — присоединение к однонитчатой ДНК-матрицы секвенирующего праймера (см.) (обычно синтетических олигонуклеотидов). Реакционная смесь переносится в 4 пробирки, куда добавляются все 4 дезоксинуклеозидтрифосфата, один из которых мечен по  $^{32}\text{P}$ . 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 удлиниться: 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.

**Селективная среда** - средовые условия в культуре *in vitro*, обеспечивающие отбор клеток с желательными признаками.

**Селекция** [лат. *selectio* –выбор, отбор; *seligere* – выбрать, избрать] – искусственный отбор с целью улучшения пород животных или сортов растений, в том числе устойчивых против заболеваний.

**Скрининг** — поиск в генной библиотеке клонов конкретной колонии, содержащей нужный фрагмент чужеродной ДНК.

**Секрция** – транспортировка молекулы из клетки через клеточную мембрану.

**σ-фактор** – субъединица прокариотической РНК-полимеразы, отвечающая за инициацию транскрипции с определенных иницирующих последовательностей.

**Сигнальный пептид** – участок из 15-30 аминокислотных остатков на N-конце белка, который, как полагают, участвует в секрции (прохождении через клеточную мембрану) белка. После выделения белка из клетки сигнальный пептид удаляется.

**SOS-ответ** – синтез полного набора белков, обеспечивающих репарацию, рекомбинацию и репликацию у бактерий, получивших серьёзные повреждения ДНК (например, в результате облучения УФ светом).

**Селективная среда** - средовые условия в культуре *in vitro*, обеспечивающие отбор клеток с желательными признаками.

**Селекция** [лат. *selectio* –выбор, отбор; *seligere* – выбрать, избрать] – искусственный отбор с целью улучшения пород животных или сортов растений, в том числе устойчивых против заболеваний.

**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  $\lambda$ , *E. coli* и вируса обезьян *sv40* (см. Первая рекомбинантная (гибридная) молекула ДНК).

**Соматотропин** (гормон роста человека ГРЧ) (*growth hormone, GH, somatotropin*) – гормон секретируется передней долей гипофиза. Впервые он был выделен и очищен в 1963 г. Его недостаток приводит к заболеванию – карликовости (1 случай на 5000 человек).

**Спейсер** – нетранскрибируемый участок молекулы ДНК, разделяющий повторяющиеся транскрибируемые элементы генного кластера; обычно С. высокоизменчивы как по размерам (в кластерах генов рРНК), так и по нуклеотидному составу в отличие от консервативных транскрибируемых участков (генов); также С. – любой нетранскрибируемый участок ДНК, разделяющий активные гены (обычно его размер 5–10 нуклеотидных пар); иногда С. может транскрибироваться.

**Сплайсинг** – форма процессинга предшественников мРНК у эукариот; в результате С. происходит удаление из молекулы-предшественника последовательностей интронов и ковалентное соединение последовательностей экзонов с образованием зрелых молекул мРНК.

**Сплайсома** – рибонуклеопротеиновая структура, ассоциированная с ядерным скелетом, способная автономно (как *in vitro*, так и *in vivo*) обеспечивать процесс сплайсинга предшественников мРНК.

**Стоп-кодон, нонсенс-к., терминатор** — тринуклеотид в иРНК, сигнализирующий об окончании синтеза полипептида и освобождении полной полипептидной цепи от рибосомы (см.). Существует три различных типа С.-к.: УАГ (амбер), УГА (опал) и УАА (охра). Ни один из них не соответствует антикодону тРНК.

## Т

**Tag-полимераза, Tag-ДНК-полимераза** (*Tag polymerase or Tag DNA p*) — фермент из термофильной эубактерии *Thermus aquaticus*, осуществляющий полимеризацию дезоксирибонуклеотидов. 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).

**Таблица (словарь) генетических кодов, словарь 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 поли-

пептидной цепи от рибосомы (см.).

**Тандемный повтор** (*tandem repeat*) — множественные копии одинаковых последовательностей ДНК, расположенных одна за другой и ориентированных в одном направлении, например, (AATAT)<sub>n</sub>, (AATAG)<sub>n</sub> др. Тандемные повторы встречаются в кодирующих и некодирующих участках. Они варьируют по длине кластера и размеру повторяющегося звена.

**Темновая (темновая эксцизионная, эксцизионная) репарация** — одна из форм пререпликативной репарации, не нуждающаяся (в отличие от фотореактивации) в энергии видимого света, осуществляется по механизму «вырежь-и-латай»; Т.Р. хорошо изучена у бактерий, но известна также у фагов с двухцепочечной ДНК и у эукариот; в частности, у *E.coli* нуклеазы *uvrA* и *uvrB* распознают участки ДНК с нарушенной структурой, обеспечивая затем начальный этап Т.Р. (вырезание поврежденного участка); впервые Т.Р. была описана у бактерий Р. Сетлоу и У. Карьером в 1964.

**Теломера** — концевой участок хромосомы, иногда богатый гетерохроматином, играющим роль в сохранении целостности хромосомы за счет предотвращения слипания Т.; при концевых делециях возможно спонтанное «залечивание» Т. порциями гетерохроматина, локализованными в др. участках генома.

**Теломераза** — фермент группы трансфераз, контролирующей размер, количество и нуклеотидный состав теломер хромосом; впервые Т. была выделена у инфузории *Tetrahymena thermophila*, у которой в макронуклеусе может содержаться несколько десятков тыс. теломер, Т. представляет собой сложный рибонуклеопротеиновый комплекс (РНК, содержащая 159 нуклеотидов, является матрицей для синтеза мотива ТТГГГГ, до 100 повторов которого содержится в каждой теломере) с молекулярной массой около 500 кД.

**Теломерная последовательность (повтор)** — последовательность нуклеотидов, специфичная для концевых участков ДНК (хромосом), как правило, представленная многочисленными повторами олигонуклеотидов и необходимая для завершения репликации концевых последовательностей хромосом, а также, вероятно, играющая защитную роль; в частности, у позвоночных высококонсервативной является Т.П. (ТТАГГГ)<sub>n</sub>, выявлена в теломерах всех хромосом более чем у 100 видов из основных классов — рыбы, амфибии, рептилии, птицы, млекопитающие; впервые Т.П. были описаны у инфузории *Tetrahymena pyriformis* (по 30–70 повторов гексануклеотида ААЦЦЦ) Э. Блэберном и Дж. Галлом в 1978.

**Температура плавления** — одна из основных характеристик дан-

ной молекулы ДНК (или гибридного ДНК/РНК-дуплекса) – температура, при которой происходит диссоциация 50% двойной спирали, специфична для ДНК данного вида организмов, т.к. зависит от нуклеотидного состава и ее общих размеров;  $T_m$  отражает АТ/ГЦ-соотношение в молекуле нуклеиновой кислоты, т.к. пара Г-Ц имеет 3 водородные связи (А-Т – 2) и взаимодействие между нуклеотидами этой пары более сильное, – соответственно.

**Терминатор (терминаторный участок)** – участок ДНК, который начинается за зоной структурных генов и обеспечивает окончание процессов транскрипции (синтеза и-РНК) и трансляции на рибосомах. Терминатор состоит из трех важных блоков: **ТК** (терминирующего кодона), **РД** (ГЦ-палиндрома) и **ТА-зоны**. Терминирующий кодон (ТК) – кодон, определяющий окончание трансляции на рибосомах. На ДНК может быть представлен триплетами ТАА, ТАГ или ТГА, на и-РНК – стоп-кодонами УАА, УАГ или УГА. Они не кодируют ни одной аминокислоты, поэтому при трансляции на рибосомах на них обрывается синтез полипептида. ГЦ-палиндромы (РД) – зона терминатора, представленная инвертированными (повёрнутыми на 180 градусов) последовательностями, преимущественно из ГЦ- и ЦГ-пар, которые на ДНК способны образовывать крестовую, а на РНК – шпильчатую структуру. Для палиндромов характерна комплементарность по горизонтали и вертикали. Именно ГЦ-палиндром в составе терминатора гена (оперона) приводит к замедлению продвижения по данному участку РНК-полимеразы, ведущей синтез и-РНК, т.е. тормозит транскрипцию. ТА-зона терминатора – участок ДНК, в котором многократно повторяются ТА-пары нуклеотидов. На матричной цепи ТА-участка ДНК при транскрипции РНК-полимераза синтезирует концевой участок информационной РНК – так называемый уридиловый хвост, состоящий из остатков урацила. Между адениловыми остатками ДНК-овой матрицы и комплементарными уридиловыми остатками синтезируемой и-РНК имеется только по две водородных связи, в отличие от ГЦ-пар, соединенных тремя водородными связями. Поэтому в ТА-зоне происходит легкое отсоединение и-РНК от ДНК-матрицы.

***Thermus aquaticus*** – термофильная эубактерия, обитающая в горячих источниках. Из нее был выделен фермент *Taq*-полимераза, который отличается устойчивостью к высокой температуре и способен работать с большой скоростью при температуре 70°C в ходе третьей стадии цикла ПЦР.

**Тимин** [Т, thymine, лат. *thymus* - вилочковая железа и *-in(e)* - суффикс, обозначающий «подобный»] – пиримидиновое основание,

5-метилурацил. Тимин. содержится во всех живых клетках в составе ДНК и транспортных РНК; структурный компонент некоторых коферментов углеводного обмена. В ДНК тимин. комплементарен аденину, образуя с ним 2 водородные связи.

**Тирозиновые протеинкиназы** — ферменты, которые переносят фосфатную группу от АТФ на остаток аминокислоты тирозина в белке. Большинство тирозиновых киназ имеют сопряженные тирозинфосфатазы. Тирозиновые киназы классифицируют на две группы: цитоплазматические и трансмембранные (связанные с рецептором).

**Точка начала репликации** – участок репликона (реплицирующегося участка ДНК), в котором происходит инициация репликации.

**Точка окончания репликации** – участок реплицирующегося участка ДНК, в котором происходит терминация репликации.

**Точка рекомбинации** – точка соединения двух рекомбинирующих двухцепочечных молекул ДНК

**Точка рестрикции (точка R)** – наиболее чувствительная точка фазы G1 клеточного цикла. Дойдя до точки рестрикции, клетки обычно перестают делиться, пока не получат сигнала, побуждающего их вступить в следующую фазу. В точке рестрикции происходит торможение роста клеток при неблагоприятных условиях, например при увеличении их плотности или при голодании. В этом случае клетка может остановиться и выйти из цикла в фазу G0.

**Трансдукция** (*transduction*) – передача (перенос) генетической информации от одной клетки (донора) к другой (реципиенту) с помощью вируса (бактериофага), что приводит к изменению наследственных свойств клеток; Т. была открыта Дж. Ледербергом и Н. Циндером в 1952 г. у *Salmonella typhimurium* и фага P22.

**Транскрибирующийся спейсер** – участок кластера рибосомной ДНК, разделяющий гены двух высокомолекулярных рРНК; Т.С. вырезается в процессе созревания собственно рРНК; у некоторых организмов (бактерии и др.) в состав Т.С. может входить кодирующая последовательность, детерминирующая низкомолекулярную рРНК (5,8S).

**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** — синтез белка (полипептидной цепи) на рибосомах с использованием в качестве матрицы мРНК. Т. состоит из этапов инициации, реакций аминоацилирования молекул тРНК, элонгации

(удлинения) полипептидных цепей и терминации синтеза. Процесс Т. начинается с того, что 5'-лидирующий конец мРНК связывается с рибосомой. Затем мРНК движется через рибосому и служит матрицей для построения полипептидной цепи. Доставку аминокислот на рибосому к месту синтеза белка осуществляют тРНК. Каждая тРНК присоединяется своим антикодоном к соответствующему кодону мРНК, определяя последовательность аминокислот в полипептидной цепи. Синтез полипептидной цепи начинается с аминоконца (N-конец) и заканчивается карбоксильным концом (С-конец). Изменение скорости трансляции мРНК регулирует экспрессию генов.

**Транспозаза** – фермент, участвующий в начальных этапах транспозиции некоторых мобильных генетических элементов (МГЭ), например, бактериального Tn3 или Ac в системе активации-диссоциации; ген T., как и фермент резольваза, входит в состав самого МГЭ.

**Транспозон, транспозабельный элемент, мобильный э.** (*transposon, Tn or transposable element or mobile e.*) – участок ДНК, способный изменять свое положение в пределах генома. Т. фланкируются короткими инвертированными повторами и кодируют ферменты, которые обеспечивают вырезание, перенос и вставку в новое место. Т. могут быть использованы для конструирования векторов клонирования, для транспозонного мутагенеза и транспозонного мечения. Известно большое количество различных Т (Р-элемент дрозофилы, транспозабельные элементы кукурузы и др.)

**Транспозиция:** Процесс, при котором транспозон или инсерционная последовательность встраиваются в новый сайт той же самой или другой молекулы ДНК. Различные транспозоны могут перемещаться с помощью различных механизмов, и точный механизм транспозиции еще не полностью известен. Транспозиция у бактерий не требует наличия протяженных участков гомологии между транспозоном и ДНК-мишенью.

**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 соотр. в 1965 г.

**Транс-сплайсинг** – процесс соединения в одной молекуле мРНК

последовательностей экзонов разных генов; Т.-С. впервые обнаружен *in vitro* и заключается в соединении комплементарных участков интронных областей 2 процессуемых молекул РНК в Х-образную фигуру с последующим сплайсингом пар экзонов от разных исходных молекул; Т.-С., вероятно, имеет место при «перемешивании» экзонов, а также при образовании некоторых зрелых мРНК у трипанозом.

**Трансферазы** – класс ферментов (в классификации ферментов первая цифра – 2), катализирующих обратимые процессы переноса различных групп атомов (например, аминные, ацильные, фосфатные и др.) от одних молекул к другим; разделение на подклассы – в зависимости от структуры переносимой группы; известно около 450 Т.

**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 включается 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 введен 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 ДНК или РНК, кодирующих 1 аминокислоту (см. Кодон).

**у**

**Убиквитин** – небольшой белок, присутствующий во всех эукариотических клетках, роль которого состоит в маркировании тех белков, которые предназначены для протеолитического расщепления (так как они повреждены или больше не нужны клетке).

**Уникальные (неповторяющиеся) последовательности ДНК** (*non-repetitious DNA sequences*) — участки молекулы ДНК, присутствующие в данном геноме в одной копии (редко в нескольких, но

обычно не более 10); большинство структурных генов (за исключением тех, которые составляют мультигенные семейства) представлено **У. п.**

**Умеренно повторяющаяся ДНК** – нуклеотидная последовательность (длиной в 100–500 нуклеотидных пар), повторяющаяся в геноме 10–100 раз; У.П. ДНК обнаруживается в составе гетерохроматина, к ней относятся гены рРНК и тРНК животных, некоторые др., мультигенные семейства, а также мобильные генетические элементы различной природы.

**Упаковка ДНК** – совокупность процессов спирализации и самоукладки двухцепочечной молекулы ДНК, ведущих к резкому сокращению ее абсолютной длины; эффективность У. оценивается по индексу упаковки.

**Урацил** (2,4-диоксопиримидин) – пиримидиновое основание, которое является компонентом рибонуклеиновых кислот и как правило отсутствует в ДНК, входит в состав нуклеотида. В составе нуклеиновых кислот может комплементарно связываться с аденином, образуя две водородные связи.

**Уридин 5'-монофосфат (УМФ)** – нуклеотид молекулы РНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода рибозы и пиримидинового азотистого основания урацила.



**Участок расщепления** — см. Сайт рестрикции.

**Участок узнавания** — см. Сайт узнавания.

**Ф**

**Факторы роста** — это соединения, способные стимулировать рост, пролиферацию и/или дифференцировку живых клеток. Как правило, это пептидные или стероидные гормоны. Факторы роста функционируют как сигнальные молекулы для взаимодействия между клетками. Примерами являются цитокины и гормоны, связываемые специфическими клеточными рецепторами.

**Факторы транскрипции** – вспомогательные белки, облегчающие РНК-полимеразам прохождение основных этапов транскрипции (инициацию, элонгацию и терминацию), а также обеспечивающие из-

бирательный характер транскрипции (например, тканеспецифичную экспрессию генов путем взаимодействия с энхансерами).

**Фактор элонгации (Ef-G – у прокариот)** – крупный белок, обеспечивающий акт перемещения рибосомы во время трансляции. Ф.Э. взаимодействует с ГТФ (гуанозинтрифосфат) и с рибосомой, что сопровождается появлением ГТФазной активности, перемещением и расщеплением ГТФ, при этом гидролиз ГТФ не требуется непосредственно для осуществления перемещения рибосомы, после завершения которого Ф.Э. освобождается из комплекса с рибосомой; молекулярная масса Ф.Э. *E.coli* 77444 Д; число молекул Ф.Э., содержащихся в клетке, примерно равно числу рибосом.

**Фактор IF2** – главный фактор инициации трансляции у прокариот – крупный белок кислой природы с молекулярной массой 100 кД (IF2a) или 90 кД (IF2b), в комплексе с ГТФ взаимодействует с формилметионин-тРНК и 30S-субчастицей рибосом, способствуя связыванию мРНК.

**Ферменты** — вещества белковой природы, присутствующие во всех живых клетках, направляющие, регулирующие и многократно ускоряющие биохимические процессы в них; играют важнейшую роль в метаболизме.

**Фингерпринт ДНК (*DNA fingerprint*)** — высокоспецифичные гибридационные 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.

**Фланкирующая последовательность ДНК** – характеризует любую нуклеотидную последовательность, расположенную рядом («по соседству», «на фланге») с другой последовательностью; различают 5'- и 3'-фланкирующие последовательности ДНК, т.е. прилегающие к основной последовательности соответственно с 5'- и 3'-конца полинуклеотидной цепи.

**Фосфорилирование** — катализируемый ферментами процесс переноса остатка фосфорной кислоты от фосфорилирующего агента-донора к субстрату, ведущий к образованию сложных эфиров фосфорной кислоты. В живых клетках фосфорилирование — один из наиболее распространённых видов посттрансляционной модификации белка. Процессы фосфорилирования и дефосфорилирования различных субстратов являются одними из важнейших биохимических реакций. Они катализируются особыми ферментами, выделяемыми в особый класс [киназ](#), или иначе фосфотрансфераз.

**Фрагменты Оказаки** – относительно небольшие (у *E.coli* – 1–2 тыс., а у млекопитающих – около 100 нуклеотидных пар) фрагменты синтезируемой молекулы ДНК в «отстающей цепи» репликативной вилки (в направлении 5' 3'); сшивание (лигирование) Ф.О. происходит с участием ДНК-лигазы, инициация синтеза Ф.О. происходит с использованием РНК-затравок, образующихся в результате действия праймазы; Ф.О. были описаны Р. Оказаки с сотр. в 1968.

**Фракции, гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом** — часть молекул ДНК, которые после электрофоретического фракционирования комплементарно связались с радиоактивным зондом в процессе Саузерн-блот гибридизации.

**Фóлдинг белка (укладка белка, от англ. folding)** - процесс спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространственную структуру (так называемая третичная структура).

## **Х**

**X-Gal** — специальный субстрат, который расщепляется ферментом  $\beta$ -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.

**Химиотерапия** – лечение заразных и инвазионных болезней такими (гл. обр. синтетическими) препаратами, которые, действуя паразитоцидно или паразитостатически на возбудителей болезни, оказывают незначительный вред или совершенно безвредны для лечимого организма.

**Hind III** – одна из широко применяемых рестрикционных эндонуклеаз, или рестриктаз (см.), извлекаемая из *Haemophilus influenzae*, которая в двухцепочечной ДНК узнает последовательность из шести нуклеотидов ААГЦТТ и разрезает ее между А и А, образуя липкие концы (см.).

**Хроматиды** – (от греч. chroma – цвет и eidos – подобный) – продольные половинки хромосом, состоящие, в свою очередь, из хромонем. В последних различают хромофибриллы, содержащие ДНК. Хроматиды в качестве составной части хромосом выступают в период профазы и метафазы митоза. Позднее во время анафазы после расщепления хромосом на хроматиды каждая хроматида становится самостоятельным образованием и обозначается уже как дочерняя или

сестринская хромосома. Термин «хроматида» предложен Мак Клуном (1900).

**Хроматин** – (от греч. *chroma* – цвет) – сильно окрашивающееся основными красителями вещество клеточного ядра. Термин «хроматин» введен в литературу Флеммингом (1880).

**Хромосома** – нуклеопротеидная структура в ядре эукариотической клетки, в которой сосредоточена большая часть наследственной информации и которая предназначена для её хранения, реализации и передачи. Хромосомы чётко различимы в световом микроскопе только в период митотического или мейотического деления клетки. Набор всех хромосом клетки, называемый кариотипом, является видоспецифичным признаком. В диплоидной клетке человека 46 хромосом, что составляет 6 пг ДНК. Общая длина гаплоидного набора (23 хромосом) составляет  $3,2 \times 10^9$  пар нуклеотид. Истинное количество структурных генов составляет от 30-40 тысяч. В интерфазной клетке хромосомы представлены хроматином. При световой микроскопии хромосомы наблюдаются в митозе (митотические хромосомы).

**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.

## Ц

**Циклический аденозин монофосфат (цАМФ)** – молекула-«мессенджер», регулирующая многие внутриклеточные реакции; участвует в молекулярных механизмах действия многих гормонов, передачи нервного возбуждения, мышечного сокращения и др.

**Циклины** – семейство белков-активаторов ферментов циклин-зависимых киназ (CDK). Без циклина CDK не активна. Прохождение клеточного цикла достигается путем последовательной активации и инактивации разных комплексов циклин-CDK. Механизм действия комплексов циклин-CDK заключается в присоединении фосфатной группировки (фосфорилировании) к белкам-мишеням. Основным результатом каскада сигнальных событий, происходящих вследствие связывания ростового фактора с рецептором на поверхности клетки, является активация комплекса циклин D-CDK4 и/или циклин D-CDK6. Комплексы циклин D-CDK4 и/или циклин D-CDK6 работают в течение фаз G<sub>1</sub>, S и G<sub>2</sub> и в начале митоза. Этот комплекс фосфорилирует различные транскрипционные факторы белковой природы, необходимые для вступления клетки в S фазу. Также комплекс циклин D-CDK4/6 способствует синтезу циклина E.

**Циклинзависимые киназы** (англ. cyclin-dependent kinases, Cdk) — группа белков, регулируемых циклином и циклиноподобными молекулами. Большинство циклинзависимых киназ участвуют в смене фаз клеточного цикла; также они регулируют транскрипцию и процессинг мРНК. Циклинзависимые киназы являются серин/треониновыми киназами и фосфорилируют соответствующие аминокислотные остатки в белках.

**Цинковый палец** – ДНК-связывающий белок, содержащий участок с двумя близко расположенными остатками цистеина и двумя остатками гистидина, которые служат лигандами для одного иона  $Zn^{2+}$ . При связывании иона цинка структура изменяет конформацию, при этом аминокислотная цепочка выпячивается в виде пальца, что позволяет белку взаимодействовать с большой бороздкой ДНК

**Цитидин 5'-монофосфат (СМФ)** – нуклеотид молекулы РНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода рибозы и пиримидинового азотистого основания цитозина.



**Цитозин** (Ц, cytosine) – пиримидиновое основание, 2-окси-4-амино-пиримидин. Цитозин содержится во всех живых клетках в составе ДНК и РНК, входит также в состав некоторых коферментов и антибиотиков. Метилирование цитозина в ДНК с превращением его в 5-метилцитозин является важным процессом в регуляции транскрипции генов (см. *Метилирование*).

#### Ч

**Четвертичная структура белка** – свойственная только полимерным (т.е. состоящим из двух и более полипептидных цепей) белкам форма пространственной организации, обусловленная различными вариантами взаиморасположения и взаимодействия отдельных полипептидных цепей.

**Чужеродная ДНК** — ДНК какого-либо организма по отношению к организму-реципиенту.

#### Ш

**Шапероны** – семейство белков, обеспечивающих *in vivo* правильную сборку и формирование трехмерной конформации полипептидов после их выхода с рибосом, при этом шапероны не входят в состав конечной белковой структуры. Белки, выполняющие такие же функции у прокариот носят название шаперонинов. См: белки теплового шока.

**Штамм** — чистая культура микроорганизмов или вирусов данного вида, выделенная из определенного источника (почвы, воды, организма и т. п.) и обладающая особыми физиолого-биохимическими свойствами.

«**Шпилька**» – двухцепочечный участок одноцепочечной молекулы ДНК или РНК, образованный в результате комплементарных взаимодействий между соседними инвертированными последовательностями нуклеотидов.

Э

**Экзоны** (*exons*) — последовательности эукариотических генов, которые, как правило, сохраняются при процессинге про-иРНК и образуют зрелую матричную, или информационную РНК. Э., как правило, чередуются с интронами (см.). Э. определяют 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.

**Экзонуклеаза** – фермент, последовательно отщепляющий нуклеотиды от конца молекулы нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК).

**Эксцизионные ферменты** – ферменты, участвующие в процессе эксцизионной репарации и обеспечивающие «вырезание» поврежденных (нуклеаза, ДНК-гликозидаза) и последующее «латание» образующихся брешей (ДНК-полимераза, ДНК-лигаза).

**Эксцизионная репарация** – процессы репарации двухцепочечной ДНК, включающие удаление поврежденного или неправильного участка одной цепи ДНК и его замену новым, синтезированным по матрице комплементарной цепи ДНК.

**Экспрессия гена** — реализация генетической информации, за-

кодированной в ДНК, путем ее транскрипции (см.) и трансляции (см.) и РНК.

**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.

**Эндонуклеаза** – Фермент, способный гидролизовать внутренние фосфодиэфирные связи в нуклеиновых кислотах.

**Энхансер** – специфическая цис-действующая последовательность нуклеотидов, многократно усиливающая транскрипцию генов РНК-полимеразой II; способность ряда Э. взаимодействовать со специфическими белками в дифференцированных клетках обеспечивает тканеспецифичный характер экспрессии соответствующих генов; считается, что Э. является одной из форм мобильных генетических элементов; один из Э. – Spm-элемент.

**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.

**Эухроматин** (*euchromatin*) — активный хроматин, не обнаруживаемый визуально на протяжении всей интерфазы вследствие низкой плотности его упаковки, содержит подавляющее большинство активно транскрибируемых генов, способен обратимо превращаться в факультативный гетерохроматин в процессе инактивации X-хромосомы.

**Эпидермальный фактор роста (ЭФР)** – полипептид, состоящий из 53 аминокислотных остатков, стимулирующий деление эм-

бриональных тканей и эпителия. Образуется из трансмембранного белка-предшественника, содержащего 1168 аминокислотных остатков. Продуцируется слюнными железами, а также другими экзо- и эндокринными железами. Содержится в крови, секретах, моче.

**Я**

**ЈАК-STAT-путь** – простой путь внутриклеточной передачи сигнала с рецепторов цитокинов у эукариот, ключевыми компонентами которого являются киназа **ЈАК** и транскрипционный фактор **STAT** (англ. signal transducers and activators of transcription - передатчики сигнала и активаторы транскрипции).

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРНИЦЫ

### 4.3 ПЕРЕЧЕНЬ РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Перечень основной литературы*

1. Сингер, М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг. М.: Мир, 1998. Т. 1-2.
2. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Альбертс и др. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2018.
3. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин. Мн.: Высшая школа, 2005.
4. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот / под ред. А.С. Спирина. М.: Высшая школа. 1990.
5. Коничев, А.С. Молекулярная биология / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. М.: Изд. центр «Академия», 2003.

#### *Перечень дополнительной литературы*

1. Закиян, С.М. Эпигенетика / Отв. ред. С. М. Закиян; В. В. Власов, Е. В. Дементьева. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012.
2. Кэри, Н. Эпигенетика. Как современная биология переписывает наши представления о генетике, заболеваниях и наследственности: пер с англ. / Н. Кэри. Ростов н/Д: Феникс, 2012.
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия/ Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. М.: Высшая школа, 1998.
4. Шпорк, П. Читая между строк ДНК: пер с англ. / П. Шпорк. М.: Ломоносов, 2012, 272 с.
5. Issa, J.-P. Aging and epigenetic drift: a vicious cycle. J Clin Invest 124, 2014.