

Учреждение образования «Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»

Факультет биологический
Кафедра зоологии, физиологии и генетики

СОГЛАСОВАНО

Заведующий кафедрой

 Г.Г. Гончаренко

05.10.2020 г.

СОГЛАСОВАНО

Декан факультета

 В.С. Аверин

05.10.2020 г.

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС ПО УЧЕБНОЙ

ДИСЦИПЛИНЕ

Молекулярная диагностика

для специальности

1-31 80 01 Биология

Рассмотрено и утверждено на заседании
кафедры зоологии, физиологии и генетики
05.10.2020 г. протокол № 3

Составители:
член-корр. НАН Б, д.б.н., профессор Гончаренко Г.Г.,
старший преподаватель Зятыков С.А.,
к.б.н., доцент Крук А.В.

Рассмотрено и утверждено
на заседании научно-методического совета
УО «Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины»
30.10.2020 г. протокол № 2

**Содержание учебно-методического комплекса
по дисциплине «Молекулярная диагностика»
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 Практические занятия
- 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

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Электронный учебно-методический комплекс дисциплины «Молекулярная диагностика» составлен в соответствии с Образовательным стандартом высшего образования второй ступени (магистратура) ОСВО 1-31 80 01-2019, учебных планов ГГУ имени Ф. Скорины специальности 1-31 80 01 Биология, регистрационные номера G 31-2-01/Д-19 от 09.04.2019 и G 31-2-01/3-19 от 09.04.2019, учебной программой учреждения высшего образования, утвержденной 20.05.2020 (регистрационный № УД-16-2020-53/уч.).

Цель учебной дисциплины - ознакомить магистрантов с современными методами молекулярной диагностики, с основными достижениями прикладной биохимии, иммунологии, генетики и молекулярной биологии, а также о последствиях революции в молекулярно-диагностических методах для медицины, фармакологии, сельского хозяйства и криминалистики.

Задачи учебной дисциплины: сформировать у студентов второй ступени образования представление о направлениях развития современных молекулярно-генетических методов детекции биологических макромолекул, а также технологиях высокопроизводительного секвенирования ДНК.

В структурном отношении учебно-методический комплекс включает в себя четыре раздела: теоретический, практический, раздел контроля знаний, вспомогательный.

Теоретический раздел содержит лекционный материал, включающий в себя в соответствии с учебной программой 13 тем (26 часов), предназначенных для магистрантов дневной формы обучения и 4 тем (8 часов) – для магистрантов заочной формы обучения. Через содержание данных тем магистранты могут получить знания об особенностях технологий молекулярной диагностики, базовых алгоритмах сравнения, выравнивания и картирования нуклеотидных и белковых последовательностей для организмов различной систематической принадлежности.

Практический раздел включает в себя в соответствии с учебным планом дисциплины 5 тем (10 часов), предназначенных для магистрантов дневной формы обучения и 2 темы (4 часа) – для магистрантов заочной формы обучения. При проведении практических занятий используются демонстрационные материалы, разнообразный раздаточный материал, таблицы и рисунки.

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

Вспомогательный материал содержит необходимые элементы учебно-программной документации: учебную программу по дисциплине «Молекулярная диагностика» учреждения образования с пояснительной запиской и содержанием учебного материала. Кроме этого, в данном разделе имеется глоссарий молекулярно-генетических терминов и дополнительный материал,

который может быть использован при чтении лекций, проведении практических занятий.

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

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

1 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

1.1 Перечень теоретического материала

- 1 Введение
- 2 Строение нуклеиновых кислот
- 3 Строение белковых макромолекул
- 4 Физико-химические методы
- 5 Иммунологические методы
- 6 Молекулярно-биологические методы
- 7 Методы амплификации нуклеиновых кислот
- 8 Методы секвенирования нуклеиновых кислот
- 9 Особенности молекулярной диагностики в медицине
- 10 Молекулярная диагностика в онкологии и фармакологии
- 11 Генная дактилоскопия
- 12 Анализ состава продуктов питания
- 13 Молекулярно-генетическая детекция ГМО

1.1 ПЕРЕЧЕНЬ ТЕОРЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

ЛЕКЦИЯ 1. ВВЕДЕНИЕ

1. Период классической генетики и Менделевская концепция гена
2. Становление молекулярной генетики и современная концепция гена
3. Основные открытия молекулярной генетики
4. Зарождение и становление молекулярной диагностики как самостоятельного раздела молекулярной генетики

Стремительное развитие в конце XX и начале XXI века молекулярной генетики, генной инженерии, а так же геномики и внедрение достижений этих наук в современную биотехнологию, медицину и сельское хозяйство остро поставило вопрос о подготовке соответствующих кадров и соответствующей учебной литературы.

На наших глазах происходит “генетическая революция” с ее фантастическими достижениями в диагностики и излечения наследственных болезней, создании современных медицинских технологий, производстве новых высокоурожайных сортов и продуктов питания, внедрение молекулярно-генетических биотехнологий в различные сферы народного хозяйства.

Развитие генетики исторически делят на два больших периода – **классическая** или **менделевская генетика** и **современная** или **молекулярная генетика**.

Классическая генетика берет свое начало от открытия (1965 год), законов наследственности сделанных **Менделем**, а точнее от переоткрытия этих законов в 1900 году ДеФризом, Чермаком и Корренсом. В период классической генетики господствовала концепция, по которой гены контролируют формирование фенотипических признаков (ген → признак), таких как форма цвет, чувствительность к патогенам и др. Эти признаки и соответствующие гены **наследуются по законам Менделя**, они **необратимы** и **устойчивы** в онтогенезе, а также **дискретны**, т.е. не смешиваются, **мутируют** и наследуются **независимо** друг от друга.

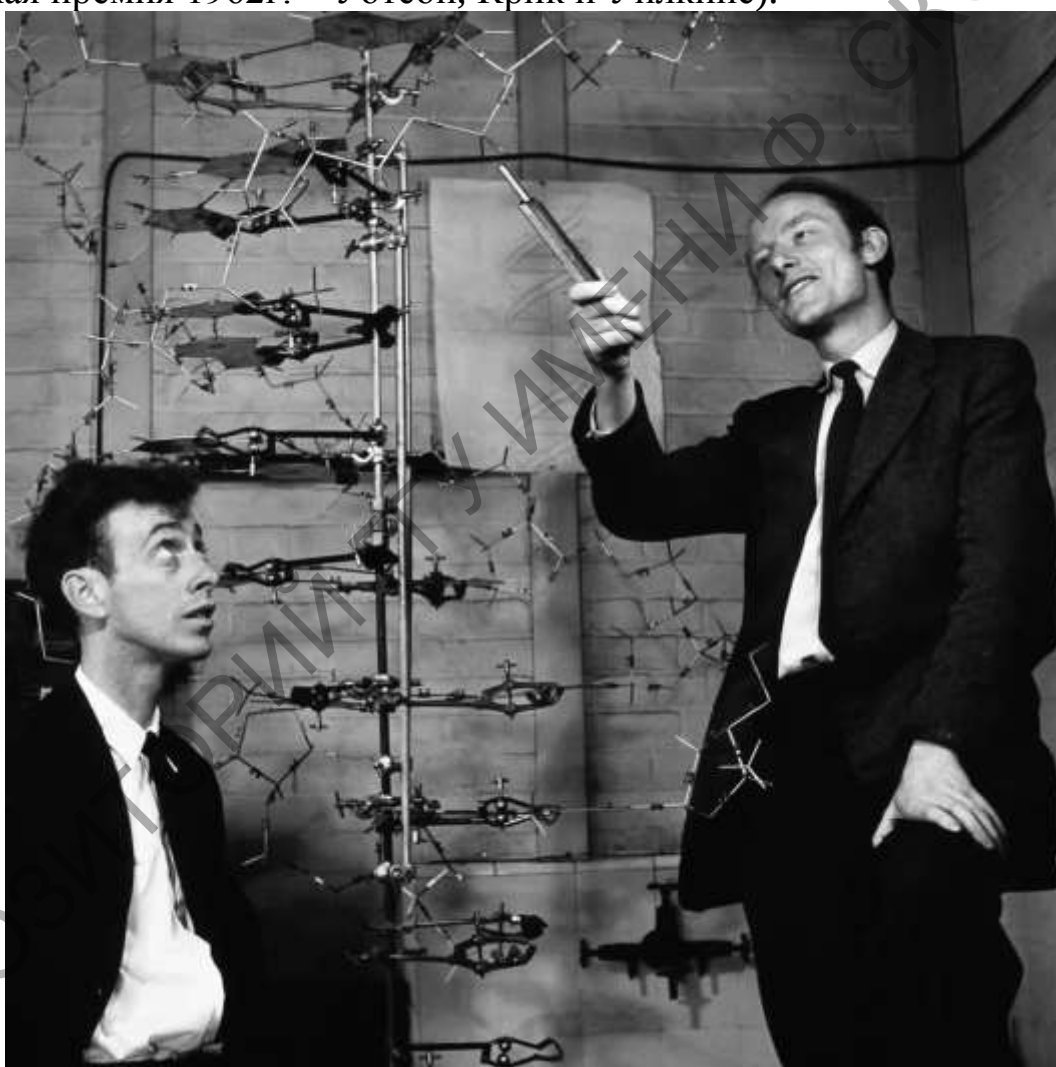
Началом периода **молекулярной генетики** считается 1953 год, когда **Уотсон и Крик**, опираясь на результаты исследований Бидла и Тейтума (1941г), МакКарти, МакЛеода и Эвери (1944г), Хирши и Чейз (1952г) и особенно на данные Франклин и Уилкинса (1952г) и Чаргаффа с сотрудниками (1953г) построили пространственную модель молекулы ДНК и истолковали ее роль в передаче

наследственной информации в ряду поколений.

Позднее в середине 60-х годов на основе серии фундаментальных открытий Крик сформулировал новую концепцию современной генетики, которая получила название “центральная догма молекулярной генетики” и ее суть заключается в том, что генетическая информация передается по схеме: ДНК → РНК → белок.

3. Основные открытия молекулярной генетики

1953 – Уотсон и Крик создали модель двойной спирали ДНК на основе рентгенограмм, полученных Франклин и Уилкинс. (Нобелевская премия 1962г. – Уотсон, Крик и Уилкинс).



1956 – Корнберг открыл фермент ДНК-полимеразу, с помощью которого синтезировал биологически активную молекулу ДНК (Нобелевская премия 1959г. – Корнберг, Очоа).

1958 – Мезельсон и Ф. Сталь доказали полуконсервативный механизм репликации ДНК.

За установление структуры инсулина и других белков (Нобелевская премия 1958г – Сэнгер).

1959 – описан фермент РНК-полимераза, полимеризующий нуклеиновые кислоты (Вейс, Гурвич, Стивенс).

1961 – Жакоб и Моно разработали модель оперона. (Нобелевская премия 1965г. – Жакоб, Моно и Львов).

1965-1967 – Холли выяснил первичную структуру аланиновой т-РНК, а Баев – валиновой т-РНК.

1966 – Ниренберг с сотрудниками осуществил серию прорывных исследований по расшифровке генетического кода. Они испытали все 64 теоретически возможных триплета и создали генетический кодовый словарь. (Нобелевская премия 1968г. – Ниренберг, Холли и Корана).

1967 – Открыта ДНК-лигаза – фермент, сшивающий фрагменты ДНК (Геллер).

Крик сформулировал центральную догму молекулярной генетики: генетическая информация передается по схеме ДНК → РНК → белок (у некоторых вирусов схема имеет отличие).

1970 – Темин и Балтимор открыли обратную транскриптазу в вирусе саркомы птиц – фермент, синтезирующий ДНК, по матрице и-РНК у РНК-содержащих вирусов (Нобелевская премия 1975 г. – Темин, Балтимор и Дюльбекко).

Корана впервые синтезировал химическим путем ген аланиновой т-РНК дрожжей.

Открыта рестрикционная нуклеаза Hind II – фермент, разрезающий ДНК в строго определенном месте. (Нобелевская премия 1978 г. – Арбер, Натанс и Смит).

1972 – 1973 – Бойер, Коэн и Берг впервые получили рекомбинантные молекулы, соединив ДНК фага лямбда, обезьяньего вируса SV-40 и лас-оперона *E. coli*. Они же провели **первый генноинженерный эксперимент**, встроив в плазмиду *E. coli* фрагменты чужеродной ДНК, в результате чего получены химерные плазмиды и установили, что их можно вводить в клетки бактерии *E. coli* в функционально активном состоянии. (Нобелевская премия 1980г. – Берг и др.).

1975 – Осуществлено первое клонирование к-ДНК.

1976 – Гвоздев и Хогнесс открыли подвижные генетические элементы (транспозоны) у дрозофилы.

1975 – 1977 – Сэнджер, Максам и Гилберт разработали методы определения нуклеотидных последовательностей ДНК (прямое секвенирование). Они же обнаружили мозаичную экзон-интронную струк-

туру гена у эукариот. (Нобелевская премия 1980г. – Сэнджер, Гилберт и Берг).

1977 – Сэнджер с соавторами установили последовательность нуклеотидов в геноме фага фХ174 (кольцевая одноцепочечная ДНК размером 5386 п. н.). В геноме фага обнаружены перекрывающиеся гены. (Нобелевская премия 1980г. – Сэнджер).



1978 – Определена полная нуклеотидная последовательность генома вируса SV-40 размером 5243 п. н.

1980 – В геноме человека обнаружены гипервариабельные области ГЦ-(ГВО), содержащие короткие, обогащенные и тандемно повторяющиеся единицы. Их используют в качестве маркеров-зондов при картировании генов.

1980 – Шелл с соавт. доказали, что почвенная бактерия *Agrobacterium tumefaciens*, вызывающая у растений болезнь «корончатые галлы», способна переносить и встраивать часть своей Ti-плазмиды (Т-ДНК) в ядерный геном растений. Эта работа легла в основу генетической инженерии растений.

1981 – Определена полная нуклеотидная последовательность митохондриального генома человека (мт-ДНК).

1982 – Определена полная нуклеотидная последовательность генома бактериофага лямбда размером 48 502 п. н.

1984 – Макгинис, Скотт и Вейнер открыли гомеобоксодержащую ДНК (Нох-гены). Гомеобокс ДНК найден у всех эукариот от дрожжей до человека (размером 180 п. н.). Соответствующая последовательность белка из 60 аминокислот, кодируемых этим геном была обозначена термином гомеодомен. Они ответственны за построение общего плана тела животных.

1985-1988 – Мюллис и Сайки разработали метод амплификации (умножения числа копий) фрагментов нуклеиновых кислот *in vitro*, с помощью которого можно достаточно быстро (в течение нескольких часов) получить миллионы копий определенных нуклеотидных последовательностей-генов – метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). (Нобелевская премия 1993г – Мюллис и Сайки).

1987 – Проведено клонирование и определение нуклеотидной последовательности ДНК, выделенной из древней египетской мумии.

Созданы первые дрожжевые искусственные хромосомы – YAC (Yeast Artificial Chromosomes). Они сыграют большую роль как векторы для клонирования больших фрагментов геномов.

1990 – Создан Международный консорциум по секвенированию генома человека (IHGSC).

Определена полная нуклеотидная последовательность генома вируса осповакцины размером 192 т. п. н.

Осуществлено первое успешное применение генной терапии для лечения больной с наследственным иммунодефицитом. К 1997 – в США и Европе одобрено 100 проектов генотерапии.

1992 – В Китае впервые начали выращивать в промышленных масштабах трансгенный табак, устойчивый к насекомым.

1994 – В США зарегистрировано первое трансгенное растение, предназначенное для употребления в пищу – помидор «Флавр-Савр» с длительным сроком хранения.

1995 – Закончено секвенирование геномов у бактерий *Mycoplasma genitalium* (0,6 млн. п. н.) и первого самостоятельно существующего организма бактерии *Haemophilus influenzae* (1.830.137 п. н.).

Появление новых научных дисциплин, таких как генетическая инженерия и **геномика** явилось логичным результатом развития и совершенствования методов и достижений молекулярной генетики. Важным событием в молекулярной генетике явилось полное секвенирование кольцевого генома ДНК бактериофага фХ174 размером 5386 п.н. Это достижение ознаменовало собой начало нового мощного направления современных исследований – **геномики**. Человечество вступило в новую эру – **эру геномики**. В конце 80-х годов были начаты первые международные проекты по секвенированию полных геномов бактерий, грибов, насекомых, растений, млекопитающих и человека.

4. Становление молекулярной диагностики как самостоятельного раздела молекулярной генетики

1996 – Определены полные нуклеотидные последовательности геномов:

- архебактерии *Methanococcus jannaschii* ($1,7 \times 10^6$ п. н.),
- микоплазмы *Mycoplasma pneumoniae* ($0,8 \times 10^6$ п. н.),
- бактерии *Synechocystis* PCC6803 ($3,6 \times 10^6$ п. н.),
- эукариот – дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (12×10^6 п. н.).

1996 – Группой Я. Вилмута (Англия) получен клон овец (5 идентичных животных), донором ядер которых была культура эмбриональных клеток.

1996 – Открытие С. Прузинером существования прионов – инфекционных агентов, вызывающих трансмиссивные спонгиозные (от «спонги» – губка) энцефалопатии человека и животных (скреппи овец, губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота, трансмиссивная энцефалопатия норки, куру человека). Возбудители этих наследственных болезней не содержат генов. Прион – особая изоформа нормального клеточного белка, отличающаяся от него плохой растворимостью и склонностью к агрегации, которая и является причиной образования амилоидов в тканях мозга. Присвоена Нобелевская премия 1997 г.

1996 – Секвенированные последовательности генов накапливаются в компьютерных банках данных, обрабатываются, сравниваются и классифицируются. Это основной источник информации о структуре генов (М. Дайхоф, У. Фитч и др.).

1993–1996 Обычно гены наследуются и передаются по «вертикальному» пути – от родителей к потомкам, но не исключены явления «горизонтального переноса», особенно у бактерий, когда переносчики генов – вирусы, плазмиды, мобильные генетические элементы – преодолевают барьеры видовой изоляции (М, Кидуэлл, 1993)

1997 – Определены нуклеотидные последовательности геномов

1997 – Определены нуклеотидные последовательности геномов:

- архебактерий *Archaeoglobus fulgidis* ($2,3 \times 10^6$ п. н.),
- *Methanobacterium thermoautotrophicum* ($1,8 \times 10^6$ п. н.),
- бактерий *Bacillus subtilis* ($4,2 \times 10^6$ п. н.),
- *Borrelia burgdorferi* ($1,3 \times 10^6$ п. н.),
- *Helicobacter pylori* ($1,7 \times 10^6$ п. н.),
- *Escherichia coli* ($4,6 \times 10^6$ п. н.).

1998 – Разработана технология синтеза моноклональных антител для терапии определенного типа метастазирующего грудного рака.

Определена полная нуклеотидная последовательность генома первого высшего организма – *Caenorhabditis elegans* (нематода) размером 8×10^7 п.н.

Определена полная нуклеотидная последовательность геномов прокариот:

- архебактерии *Pyrococcus horikoshii* ($1,7 \times 10^6$ п.н.),
- бактерий *Aquilex aecolicus* ($1,5 \times 10^6$ п. н.),
- туберкулезной палочки *Mycobacterium tuberculosis* ($4,4 \times 10^6$ п. н.),
- *Rickettsia prowasekii* ($1,1 \times 10^6$ п.н.),
- бледная спирохета *Treponema pallidum* ($1,1 \times 10^6$ п.н.),
- *Chlamydia trachomatis* (1×10^6 п.н.)

1999 – Расшифрован геном арабидопсиса размером 8×10^7 п. н. Трансгенные растения выращивают в 11 странах в промышленных масштабах на общей площади $39,9 \times 10^6$ гектаров (исключая Китай).

2000 – Полностью секвенированы геномы дрозофилы (размер $1,75 \times 10^8$ п. н.) и риса.

Американские и японские исследователи получили клон телят путем трансплантации ядер фибробластов в хвост 17-летнего быка

2001 – Полное секвенирование генома человека двумя коллективами исследователей:

1) IHGSC (International Human Genome Sequencing Consortium – Международный консорциум по секвенированию генома человека.) – Nature, 2001. Vol. 409. P. 860-921;

2) Частная фирма Celera Genomics – Venter J.C. [et al.] Science, 2001. Vol. 291. P. 1304-1351.

Размер генома человека $3,2 \times 10^9$ п. н.

2002 – Полностью секвенирован геном мыши размером $2,2 \times 10^9$ п. н.

2006 – Секвенирован геном неандертальца.

Литература:

1. Попов, В.В. Геномика с молекулярно-генетическими основами. / В.В. Попов. – Москва: Книжный дом “ЛИБРОКОМ”, 2009. – 304 с.

2. Reece, R.J. Analysis of Genes and Genomes / R.J. Reece, 2004. – 469 p.

3. Hartwell, L.H. Genetics: From Genes to Genomes / L.H. Hartwell [et al.]. – New York: McGraw-Hill, 2011. – 817 p.

4. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome / International Human Genome Sequencing Consortium // Nature. – 2001. – Vol. 409. – P. 860-921. – doi:10.1038/35057062.

5. Venter, J. C. The sequence of the human genome / J.C. Venter [et al.] // Science. – 2001. – Vol. 291. – P. 1304-1351. – doi:10.1126/science.1058040.

ЛЕКЦИЯ 2. СТРОЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. Доказательство роли ДНК в передаче наследственности
2. Состав и строение нуклеиновых кислот

1. Доказательство роли ДНК в передаче наследственности

Большую роль в выяснении молекулярных основ наследственности сыграли эксперименты Ф. Гриффитса, который в 1928 г. обнаружил явление **трансформации**. Ученый вводил мышам **вирулентный** капсульный (S) и **невирулентный** бескапсульный (R) штаммы пневмококков, *Streptococcus pneumoniae*. При введении мышам вирулентного штамма S они заболевали пневмонией и погибали, а при введении невирулентного R – оставались живыми (рис. 2.1 а, b). Мыши также не погибали, если им вводили вирулентный штамм S, но убитый нагреванием (рис. 2.1c). В решающем эксперименте Гриффитс ввел смесь невирулентного штамма R со штаммом убитого нагреванием вирулентного S и получил неожиданный результат – мыши заболели пневмонией и погибли. Из погибших животных были выделены бактерии, которые обладали вирулентностью и были способны образовать капсулу (рис. 2.1d). Следовательно, живые бактерии невирулентного бескапсульного штамма R **трансформировались** – приобрели свой-

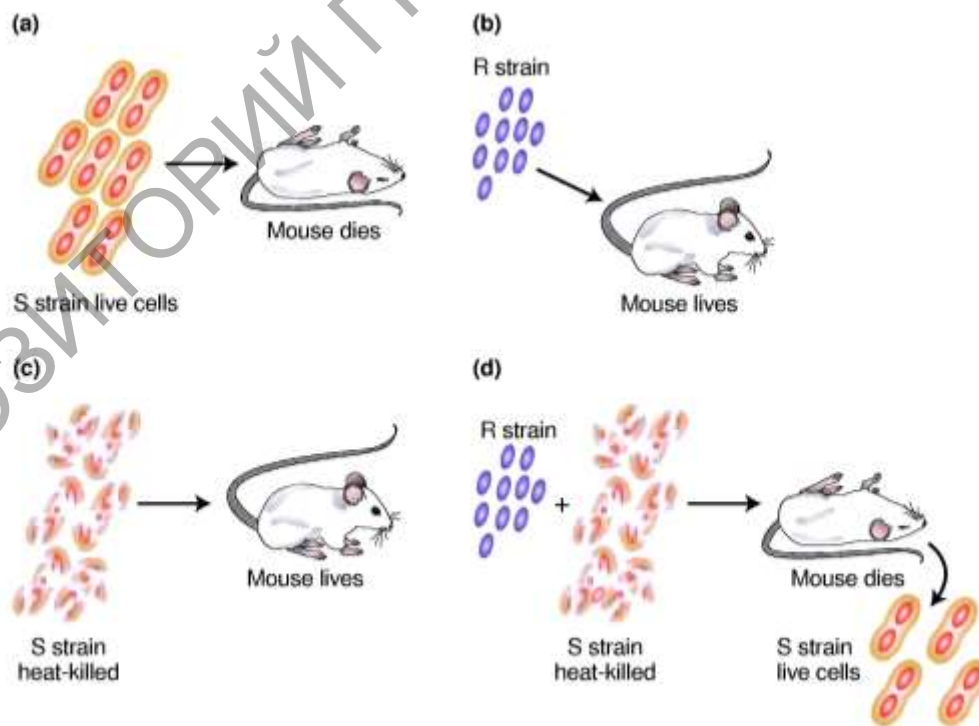


Рисунок 2.1 – Схема экспериментов Ф. Гриффитса на мышах по трансформации у пневмококков, *Streptococcus pneumoniae*

ства убитых болезнетворных капсульных бактерий *S.* Однако химическая природа «**трансформирующего фактора**», обеспечивающего наследуемое превращение бактерии одного типа в другой в результате экспериментов Гриффитса, осталась неустановленной.

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

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

Эксперименты Эвери с соавторами, а также Херши и Чейз позволили сделать заключение, что именно **молекула ДНК**, по крайней мере у бактерий и фагов является носителем наследственной

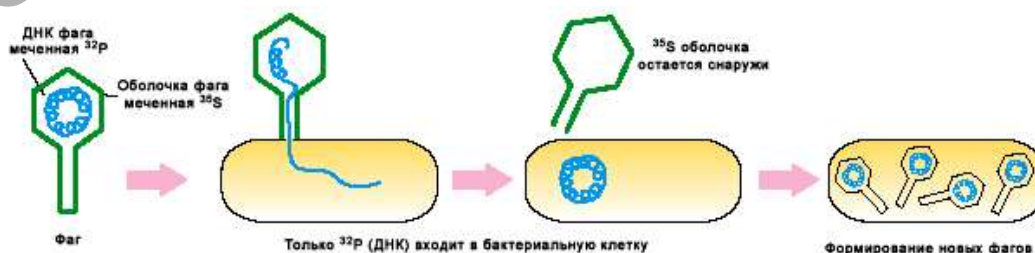


Рисунок 2.2 – Схема эксперимента Херши и Чейз, демонстрирующего, что генетическим материалом фага является ДНК

информации. В последующем было установлено, что у некоторых прокариот наследственная информация зашифрована в молекулах РНК.

1.2 Состав и строение нуклеиновых кислот

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

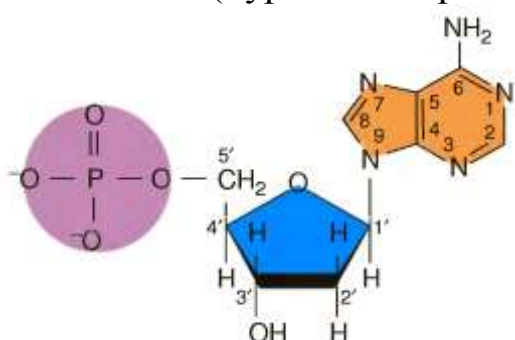


Рисунок 2.3 - Нуклеотид аденин состоящий из дезоксирибозы, остатка фосфорной кислоты и азотистого основания аденина

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

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

На основе рентгеноструктурного

К 30-м годам XX века П. Левен с сотрудниками установил, что азотистое основание, углевод и фосфорная кислота соединены в блоки – **нуклеотиды** (рисунок 2.3), расположенные вдоль линейной молекулы нуклеиновой кислоты.

Нуклеотиды в оказались четыре:

аденин,

Поскольку

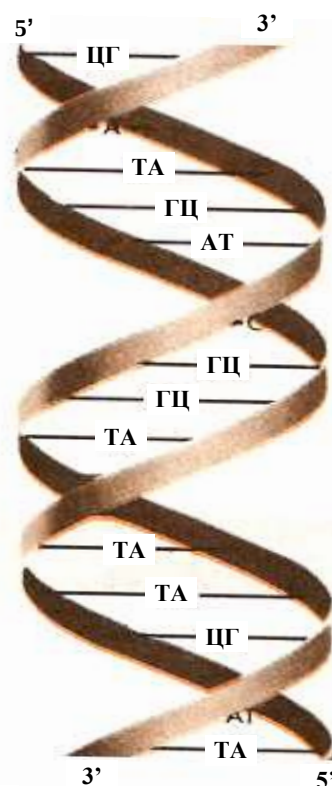


Рисунок 2.4 - Модель двухцепочечной структуры ДНК по Уотсону и Крику

анализа М. Уилкинс и Р. Франклин в 1953 г. получили данные, указывающие на то, что ДНК имеет двухцепочечную структуру в форме спирали.

В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик основываясь на данных Чаргаффа и Франклин построили пространственную модель молекулы ДНК и истолковали ее роль как носителя генетической информации. Согласно их модели **молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных комплементарных цепочек, закрученных в двойную спираль** (рисунок 2.4).

Азотистые основания нуклеотидов обеих цепей ДНК заключены внутри между витками спирали и соединены водородными связями. В соответствии с правилами Чаргаффа аденин одной цепи связан только с тимином другой цепи, а гуанин – только с цитозином. Пара **аденин-тимин** соединена двумя водородными связями, а пара **гуанин-цитозин** – тремя (рисунок 2.5). Такой порядок соответствия азотистых оснований (A=T и Г=Ц) называется **комплементарностью**, и, следовательно, цепи в ДНК комплементарны друг другу.

В каждой из цепей ДНК нуклеотиды последовательно соединены друг с другом с помощью остатка фосфорной кислоты и молекулы дезоксирибозы.

Дезоксирибоза связывается с одной молекулой фосфорной кислоты через углерод в положении 3', а с другой – через углерод 5', образуя сахаро-фосфатный остов.

Следует отметить, что обе цепи в молекуле ДНК имеют противоположную направленность. Межнуклеотидная связь в одной цепи имеет направление 5'-3', а в другой 3'-5' (рисунок 2.5).

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

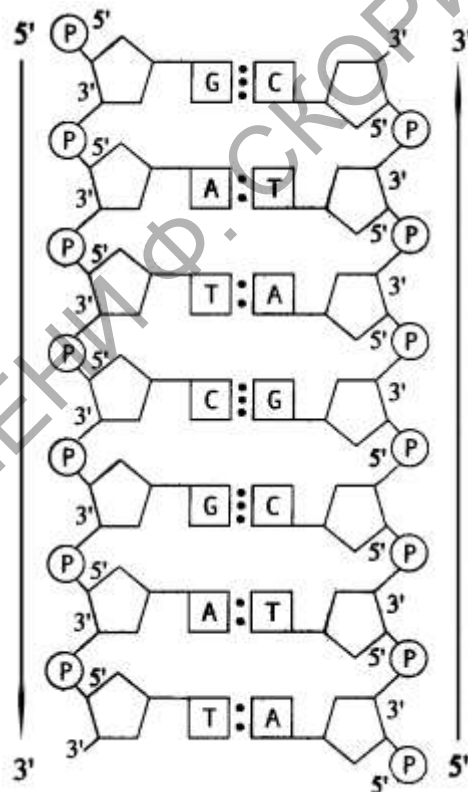
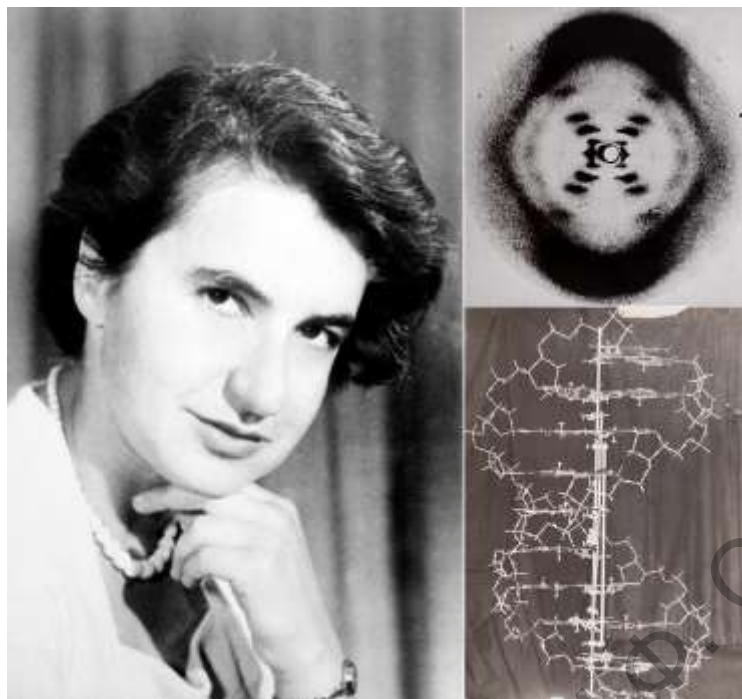


Рисунок 2.5 - Схема отрезка молекулы ДНК



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

Литература:

1. Попов, В.В. Геномика с молекулярно-генетическими основами. / В.В. Попов. – Москва: Книжный дом “ЛИБРОКОМ”, 2009. – 304 с.
2. Примроуз, С. Геномика: роль в медицине / С. Примроуз, Р. Твеймен. – М.: БИНОМ, 2008. – 277 с.
3. Сингер, М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг. – М.: Мир, 1998. – 391 с.
4. Reese, R.J. Analysis of Genes and Genomes / R.J. Reese, 2004. – 469 p.
5. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.
6. Hartwell, L.H. Genetics: From Genes to Genomes / L.H. Hartwell [et al.]. – New York: McGraw-Hill, 2011. – 817 p.

ЛЕКЦИЯ 3. СТРОЕНИЕ БЕЛКОВЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ

1. Состав и строение белков
2. Этапы трансляции белков

1. Состав и строение белков

Белки – это полимеры мономерами, которых являются аминокислоты. В состав природных белков входит только 20 аминокислот (таблица 3.1). *Аминогруппа* одной аминокислоты способна взаимодействовать с *карбоксильной* группой другой аминокислоты с образованием пептидной связи ($-\text{CO}-\text{NH}-$) и выделением молекулы воды. При этом образуется дипептид:

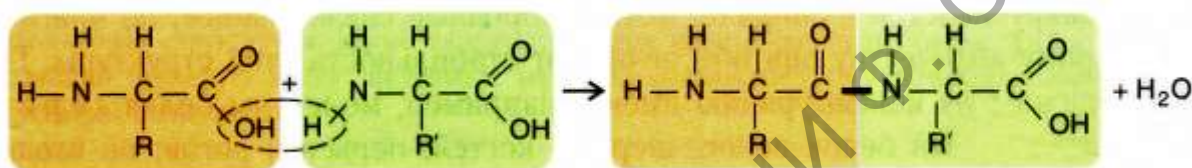


Таблица 3.1 – Аминокислоты, входящие в состав белков

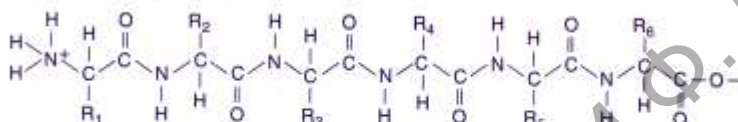
A $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$ Gly (G)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Ala (A)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3 \end{array}$ Val (V)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3 \end{array}$ Leu (L)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Ile (I)
$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Pro (P)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ Phe (F)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{NH} \end{array}$ Trp (W)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$ Cys (C)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Met (M)
Б $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ Ser (S)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3 \end{array}$ Thr (T)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \end{array}$ Tyr (Y)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O}) \end{array}$ Asn (N)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O}) \end{array}$ Gln (Q)
В $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}(=\text{NH}_2)-\text{NH}_2 \end{array}$ Arg (R)	1. Basic (positively charged) $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{NH}_3^+ \end{array}$ Lys (K)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}=\text{N}^+-\text{H} \end{array}$ His (H)	2. Acid (negatively charged) $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ Asp (D)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ Glu (E)

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

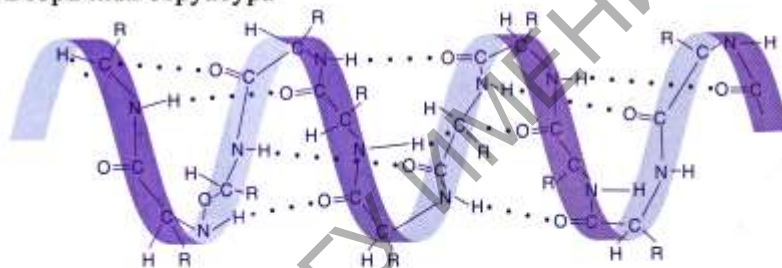
Белки делятся на простые и сложные. При полном гидролизе простых белков образуются только аминокислоты, а в случае полного гидролиза сложных белков – и другие вещества.

Выделяют четыре уровня структурной организации белков: первичный, вторичный, третичный и четвертичный (рисунок 3.1). Последовательность аминокислот определяет первичную структуру белка. Каждая аминокислота содержит центральный атом C_α – углерод, водород, группы NH^{+3} и COO^- и боковой радикал R (рисунок 3.2). Общая характеристика аминокислот (название, аббревиатура, год открытия, источник получения и кто впервые открыл) приведена в таблице 3.2.

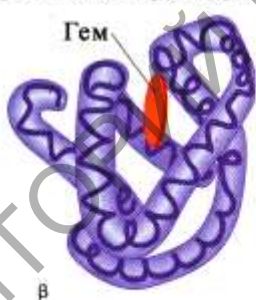
(а) Первичная структура



(б) Вторичная структура



(в) Третичная структура



(г) Четвертичная структура

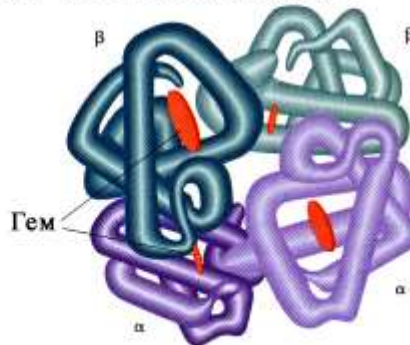


Рисунок 3.1 – Четыре уровня организации белков

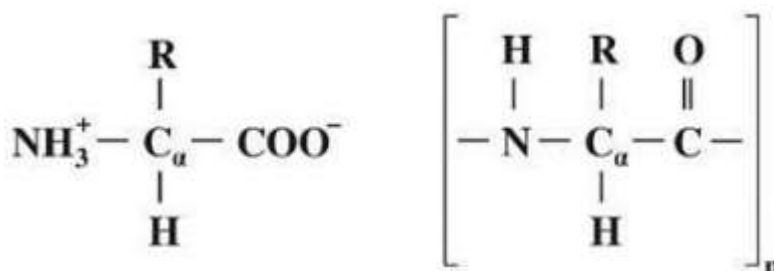


Рисунок 3.2 – Структурная формула аминокислоты

Таблица 3.2 – Общая характеристика аминокислот

Аминокислота	аббревиатура	Год	Источник	Кто впервые выделил
Цистеин	Cys	1899	Вещество рога	К. Мёрнер
Фенилаланин	Phe	1881	Ростки люпина	Э. Шульце, Й. Барбьери
Триптофан	Trp	1902	Казеин	Ф. Гопкинс, Д. Кол
Треонин	Thr	1925	Белки овса	С. Шрайвер и др.
Тирозин	Tyr	1848	Казеин	Ф. Бопп
Серин	Ser	1865	Шёлк	Э. Крамер
Пролин	Pro	1901	Казеин	Э. Фишер
Метионин	Met	1922	Казеин	Д. Мёллер
Лизин	Lys	1889	Казеин	Э. Дрексель
Лейцин	Leu	1820	Мышечные волокна	А. Браконно
Изолейцин	Ile	1904	Фибрин	Ф. Эрлих
Глутаминовая кислота	Glu	1866	Растительные белки	Г. Риттхаузен
Глицин	Gly	1820	Желатин	А. Браконно
Гистидин	His	1896	Стурин, гистоны	А. Кессель, С. Гедин
Гидроксипролин		1902	Желатин	Э. Фишер
Гидроксилизин		1925	Белки рыб	С. Шрайвер и др.
Валин	Val	1901	Казеин	Э. Фишер
Аспарагиновая кислота	Asp	1868	Конглутин, легумин	Г. Риттхаузен
Аргинин	Arg	1895	Вещество рога	С. Гедин
Аланин	Ala	1888	Фиброин шелка	Т. Вейль

2. Этапы трансляции белков

Трансляция наряду с репликацией и транскрипцией является еще одним важнейшим этапом реализации генетической информации в клетке. В самом общем виде **трансляция** – это *процесс биосинтеза белка по матрице иРНК*, который протекает на рибосомах. В этом процессе кроме информационной РНК принимают активное участие еще два типа РНК – транспортные и рибосомные.

Транспортные РНК. Роль **тРНК** заключается в том, что они *переносят аминокислоты к рибосомам и участвуют в процессе синтеза белка*. Транспортные РНК, которых насчитывается более 60-ти, состоят из 75-90 нуклеотидов и имеют структуру в виде клеверного листа (рисунок 3.3). Каждая аминокислота присоединяется к определенной тРНК. На одном конце тРНК находится **акцепторный триплет ЦЦА**, к аденину которого присоединяется специфическая аминокислота. На другом конце (в антикодонной петле) каждой тРНК находится **антикодон** – специфический триплет, с помощью которого **тРНК «узнает»** соответствующий **комплементарный кодон** в **иРНК**, и тем самым

определяет место, куда должна быть поставлена данная аминокислота в синтезируемой молекуле белка. Боковые петли тРНК, по-видимому, используются для связывания с рибосомой и со специфической аминоацил-тРНК-синтетазой.

Рибосомные РНК. Размер рибосомных **рРНК** составляет 120-3100 н. Они служат *каркасом рибосом* и способствуют *первоначальному связыванию иРНК с рибосомой* при биосинтезе белка.

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

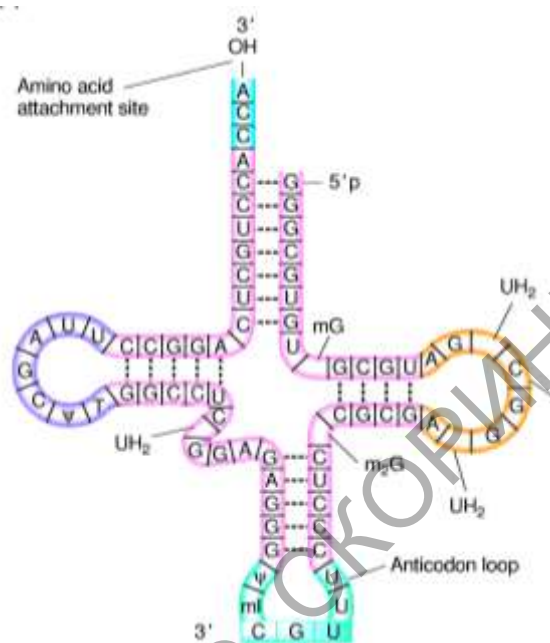


Рисунок 3.3 - тРНК с антикодоном ЦГУ, доставляющая к месту синтеза белка аминокислоту аланин

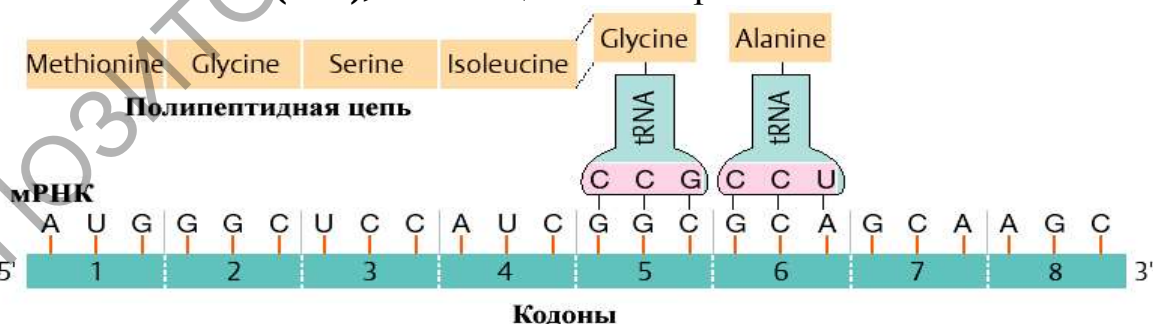


Рисунок 3.4 – Схематическое изображение принципа трансляции

Как уже отмечалось, трансляция заключается в том, что последовательность расположения кодонов в иРНК переводится в строго упорядоченную последовательность расположения аминокислот в молекуле синтезируемого белка (рисунок 3.4).

Процесс трансляции включает два этапа: активирование аминокислот и присоединение их к «своим» тРНК и непосредственно синтез белковой молекулы.

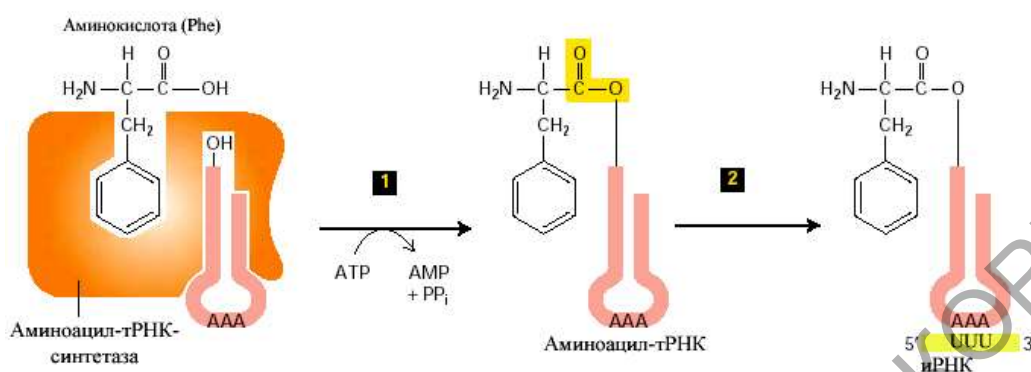


Рисунок 3.5 - Присоединение аминокислоты фенилаланина к терминальному аденозину соответствующей тРНК с помощью фермента аминоксил-тРНК-синтетазы (этап 1) и соединение антикодона AAA аминоксил-тРНК^{Phe} с соответствующим кодоном УУУ мРНК (этап 2).

Активирование свободных аминокислот и присоединение их к тРНК осуществляется при помощи специализированных ферментов – **аминоацил-тРНК-синтетаз**. В молекуле каждой аминоксил-тРНК-синтетазы имеется по крайней мере три центра связывания: для аминокислоты, тРНК и АТФ. Сначала осуществляется связь аминоксил-тРНК-синтетазы с определенной аминокислотой, а затем активированная с помощью АТФ аминокислота присоединяется к аденину акцепторного триплета ЦЦА тРНК (рисунок 3.5).

В результате образуется **аминоацил-тРНК (aa-тРНК)**. Аминоацил-тРНК взаимодействует с одним из белковых факторов, который в комплексе с **ГТФ** необходим для транспорта и связывания aa-тРНК с рибосомой.

Процесс синтеза белка на рибосомах подразделяется на три стадии: инициация, элонгация и терминация (рисунок 3.6).

Инициация. Инициация синтеза полипептидной цепи начинается с присоединения малой субъединицы рибосомы к соответствующему центру связывания на иРНК (рисунок 3.6, А). Сигналом инициации трансляции служит кодон для метионина АУГ, который расположен в начале иРНК. К кодону АУГ своим антикодоном УАЦ присоединяется aa-тРНК с метионином (у бактерий с формилметионином). Затем к этому комплексу, присоединяется большая субъединица рибосомы. В результате образуется полная рибосома (80S), включающая молекулу иРНК и инициаторную aa-тРНК с метионином, которая располагается в *пептидильном центре* большой субъединицы (рисунок 3.6, А).

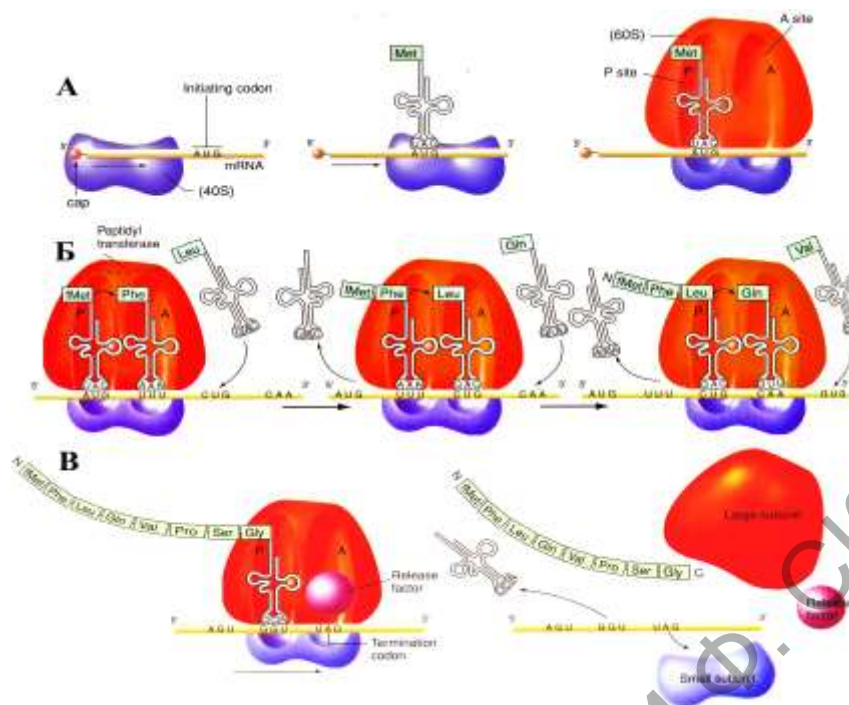


Рисунок 3.6 - Схема основных этапов трансляции на рибосомах (А - инициация, Б - элонгация, В - терминация)

Элонгация. В свободный *аминоацильный центр* рибосомы со второй аминокислотой поступает следующая аа-тРНК, которая своим антикодоном соединяется со строго с комплементарным кодоном иРНК (рисунок 3.6, Б). В этот момент при помощи фермента **пептидилтрансферазы** предшествующая аминокислота (метионин) своей карбоксильной группой (COOH) соединяется с аминогруппой (NH₂) вновь пришедшей аминокислоты. Между ними образуется пептидная связь (–CO–NH–). В результате тРНК, принеся метионин, освобождается, а в аминоацильном центре к тРНК присоединен уже дипептид. Дипептидил-тРНК благодаря перемещению рибосомы на один кодон при участии фермента **транслоказы** и белкового **фактора элонгации** продвигается из аминоацильного центра в пептидилный. Освободившаяся тРНК и связанный с ней кодон иРНК АУГ выходят из рибосомы (рисунок 6.9, 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 (рисунок 3.6, Б).

Терминация. Как только в аминоацильный центр рибосомы поступит один из завершающих кодонов иРНК (УАА, УАГ или УГА), к нему присоединяется белковый фактор терминации и блокирует дальнейшую элонгацию цепи (рисунок 3.6, В). После этого

синтезированная полипептидная цепь отделяется от тРНК, рибосомные субъединицы диссоциируют и освобождают тРНК и иРНК, которые могут принять участие в синтезе следующей полипептидной цепи (рисунок 3.6, В).

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

Литература:

1. Попов, В.В. Геномика с молекулярно-генетическими основами. / В.В. Попов. – Москва: Книжный дом “ЛИБРОКОМ”, 2009. – 304 с.
2. Примроуз, С. Геномика: роль в медицине / С. Примроуз, Р. Твеймен. – М.: БИНОМ, 2008. – 277 с.
3. Reese, R.J. Analysis of Genes and Genomes / R.J. Reese, 2004. – 469 p.
4. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.
5. Hartwell, L.H. Genetics: From Genes to Genomes / L.H. Hartwell [et al.]. – New York: McGraw-Hill, 2011. – 817 p.

ЛЕКЦИЯ 4. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Методы разделения биополимеров (хроматография)
2. Методы разделения биополимеров (электрофорез)

1. Методы разделения биополимеров (хроматография)

Для того чтобы исследовать молекулярно-биологические процессы, связанные с жизнедеятельностью клетки и организма, необходимо из многообразия компонентов живого вещества выделить то, что планируется исследовать, и уже с этим материалом работать дальше. Основными методами, позволяющими разделить биологические макромолекулы является хроматография и электрофорез.

Хроматография – метод разделения и определения веществ, основанный на разделении компонентов между двумя фазами – подвижной (*элюант*) и неподвижной (*элюат*, стационарная фаза).

Метод основан на различии силы взаимодействия разных веществ с неподвижной фазой. Менее взаимодействующие вещества движутся быстрее и все вещества движутся в колонке относительно элюата с разной, характерной для данного вещества скоростью. Неподвижной фазой служит твердое пористое вещество, которое называют сорбентом или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ с растворенными в них анализируемыми веществами, протекающие через неподвижную фазу самотеком или под давлением.

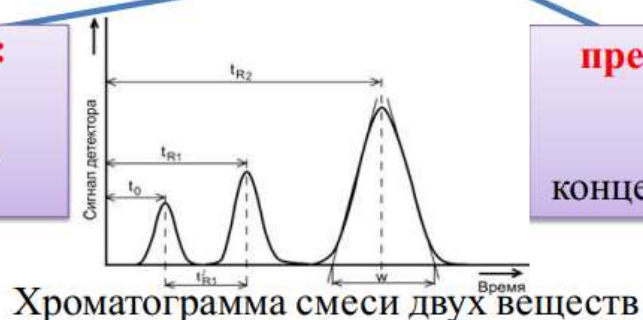
Неподвижная фаза заранее размещается в хроматографической колонке, либо представляет собой хроматографическую бумагу, либо слой оксида алюминия на алюминиевой фольге.

Вещества, покидающие колонку вместе с подвижной фазой, называются неудерживаемыми, а время их удерживания определяет т.н. «мертвое время» колонки.

Хроматография позволяет решать задачи

аналитические:
разделение,
идентификация,
определение.

препаративные:
очистка,
выделение,
концентрирование.



На разделяемые вещества можно накладывать различные дополнительные поля (гравитационное, электрическое, магнитное и др.), которые, изменяя условия разделения, расширяют возможности хроматографии.

Время от момента ввода анализируемой пробы до момента регистрации максимума хроматографического пика называют **временем удерживания** и обозначают – **tR**.

Время удерживания складывается из двух составляющих:

- 1) времени пребывания веществ в подвижной фазе – **tm**,
- 2) времени пребывания в неподвижной фазе – **ts**.

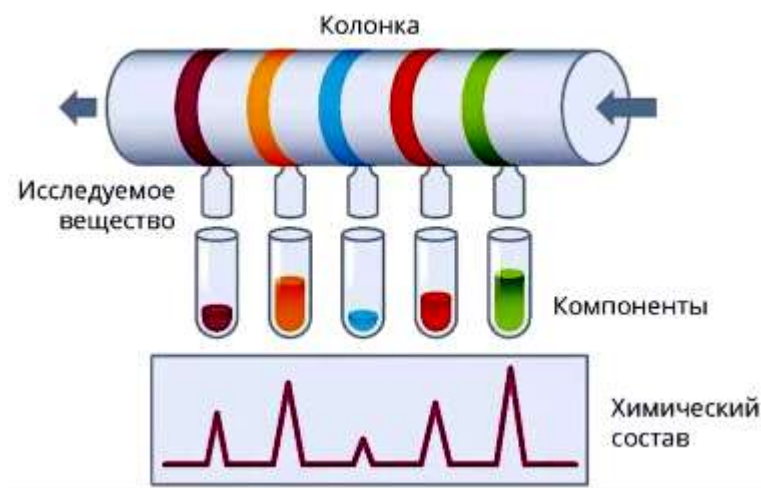
Значение **tm** фактически равно времени прохождения через хроматограф несорбируемого компонента.

Значение **tR** не зависит от количества пробы, вводимой в колонку, но зависит от природы вещества и сорбента, а также от упаковки сорбента и может меняться от колонки к колонке. Поэтому для характеристики истинной удерживающей способности колонки следует ввести **исправленное время удерживания** – **t'R = tR – tm**.

Для характеристики удерживания используют понятие **удерживаемый объем** – **VR** (объем подвижной фазы, который нужно пропустить через колонку с определенной скоростью, чтобы элюировать вещество): **VR = F × tR**, где F – объемная скорость потока подвижной фазы (см³/с) или (мл/мин).

По полученной хроматограмме смеси можно рассчитать экспериментальные значения хроматографических параметров: **фактор удерживания (емкости)** – **k**, показывает во сколько раз дольше вещество пребывает в неподвижной фазе, чем в подвижной, эта величина должна составлять от 1,5 до 4 к; **коэффициент селективности** – **α**, мера относительного удерживания или относительной подвижности двух разделяемых веществ; **разрешение** – **RS**, разделение двух соседних, является мерой полноты разделения двух веществ. Разделение считается полным, если Rs равно или больше 1,5.

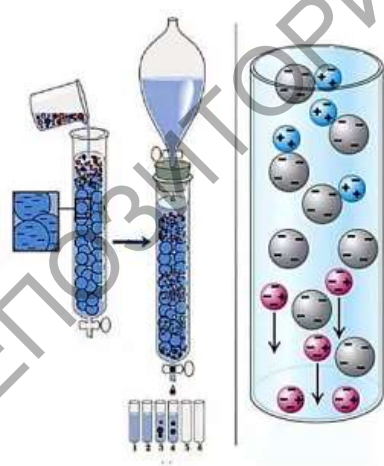
Количество исследуемого вещества в пробе может быть оценено методом **абсолютной калибровки** хроматографа с помощью ГСО (государственных стандартных образцов) с последующим построением калибровочного графика. Либо методом **внутренней нормализации**, при котором предполагается, что пики всех возможных компонентов смеси зафиксированы на хроматограмме, и сумма их площадей (S) равна 100%. Либо методом **внутреннего стандарта**, при котором в анализируемый образец вводят известное количество эталонного соединения.



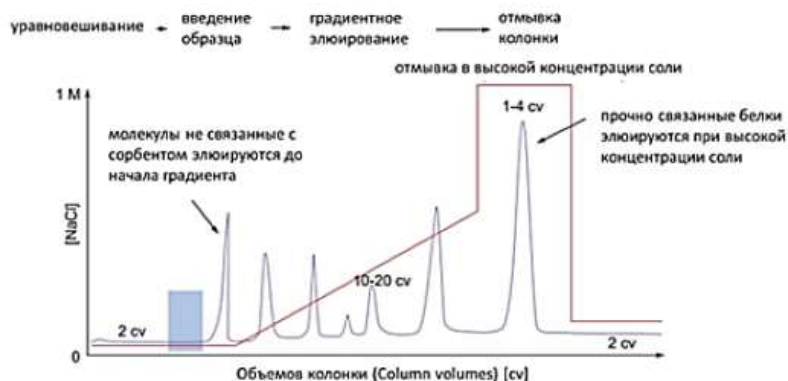
Ионообменная хроматография (ИОХ) – метод, разделяющий ионы и полярные молекулы на основе их заряда. Взаимодействие образца и сорбента основано на обратимом кулоновском взаимодействии. Сорбент имеет на поверхности ионные функциональные группы, которые взаимодействуют с ионами аналита противоположного заряда.

Катионообменная ИОХ – отрицательно заряженный сорбент связывает положительно заряженные молекулы анализируемого вещества (аналит).

Аниообменная ИОХ – отрицательно заряженный аналит связывает положительно заряженный сорбент. ИОХ используется для разделения практически любых заряженных молекул, в том числе крупных белков, небольших нуклеотидов и аминокислот.

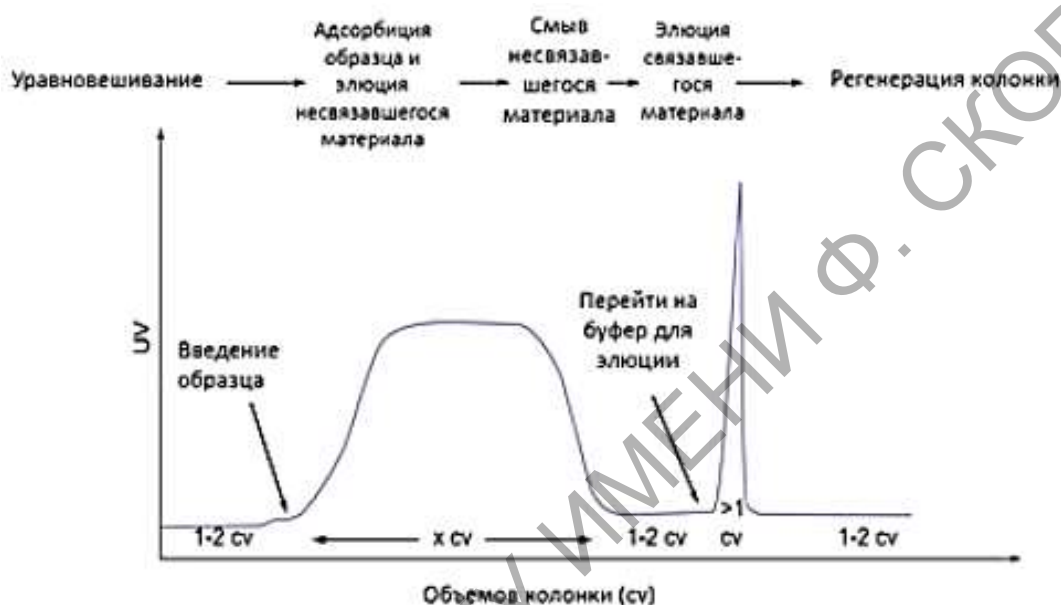


Ионообменная хроматография



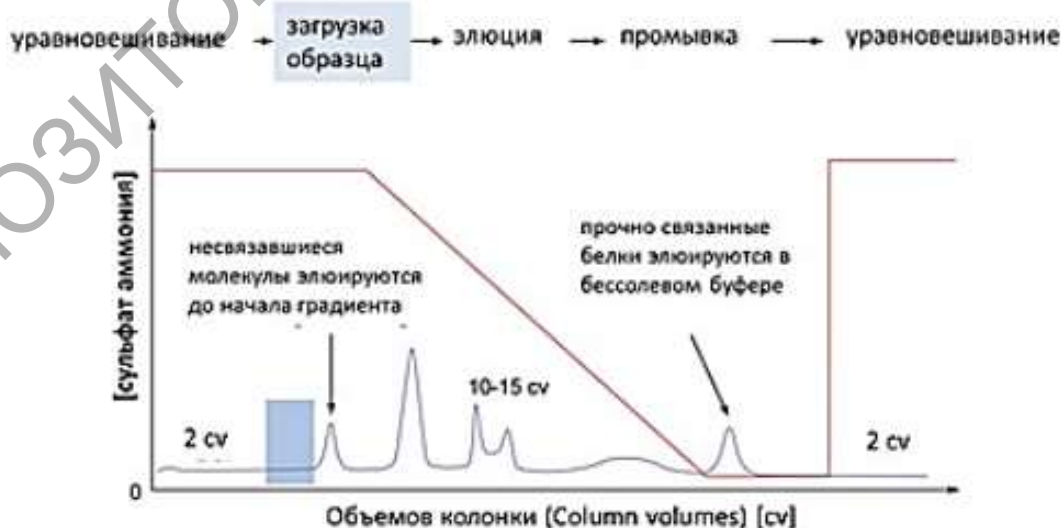
Типичная хроматограмма ионообменного разделения

Аффинная хроматография (АХ) – разделение биологических молекул, основанное на селективном взаимодействии между белком (или белковым компонентом) и специфическим лигандом, связанным с матрицей. Метод позволяет очистить вещество (увеличить его концентрацию) в несколько тысяч раз. Аффинная хроматография является уникальной технологией очистки поскольку только она позволяет очистить биомолекулы на основе их биологических функций или химической структуры.



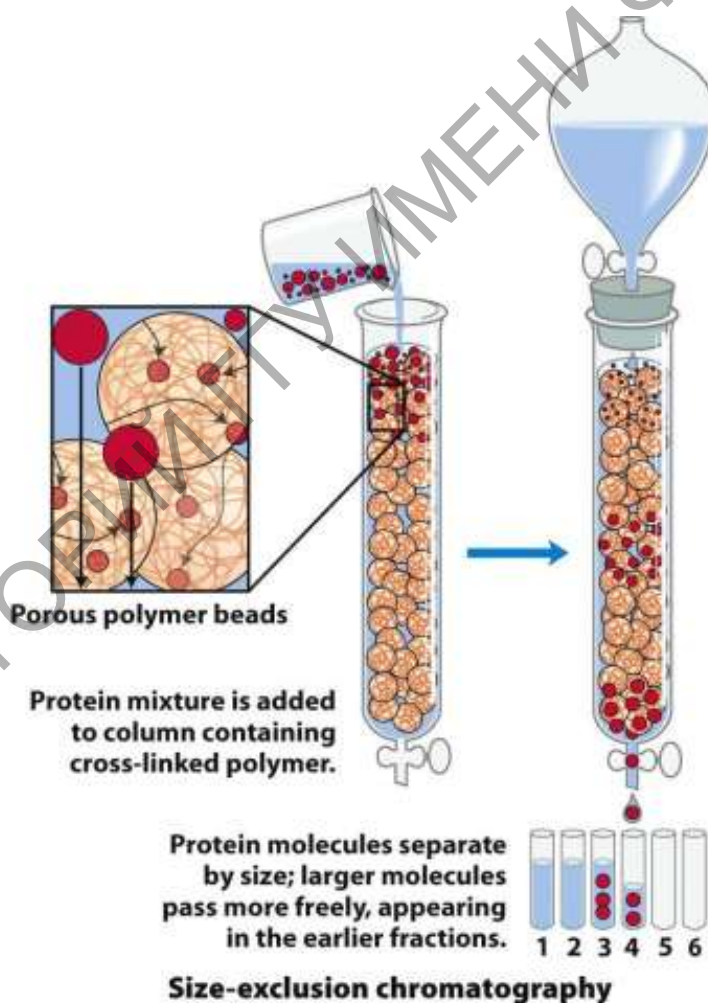
Этапы аффинного разделения белков

Гидрофобная хроматография (ГХ) основана на гидрофобности белков. Белки, содержащие гидрофобные аминокислоты на поверхности, могут обратимо связываться с гидрофобными группами сорбента.



Типичная хроматограмма гидрофобного разделения

Гель-фильтрация (ГФ) или эксклюзионная хроматография (ситовая, гель-проникающая, гель-фильтрационная хроматография) – метод разделения молекул в соответствии с их размером. В отличие от ионообменной и аффинной хроматографии молекулы образца не связываются с сорбентом, но чем меньше молекулы, тем быстрее они пройдут через слой геля. Важное преимущество ГФ – условия среды могут быть изменены в соответствии с типом образца или требованиями для дальнейших шагов очистки и хранения. ГФ хорошо подходит для биомолекул, чувствительных к изменениям pH, концентрации ионов металлов, кофакторов и других условий среды. Разделение может быть выполнено в присутствии необходимых ионов, кофакторов, детергентов, мочевины, гуанидин гидрохлорида, при высокой или низкой ионной силе, при 37°C или на холоде, в соответствии с требованиями эксперимента.

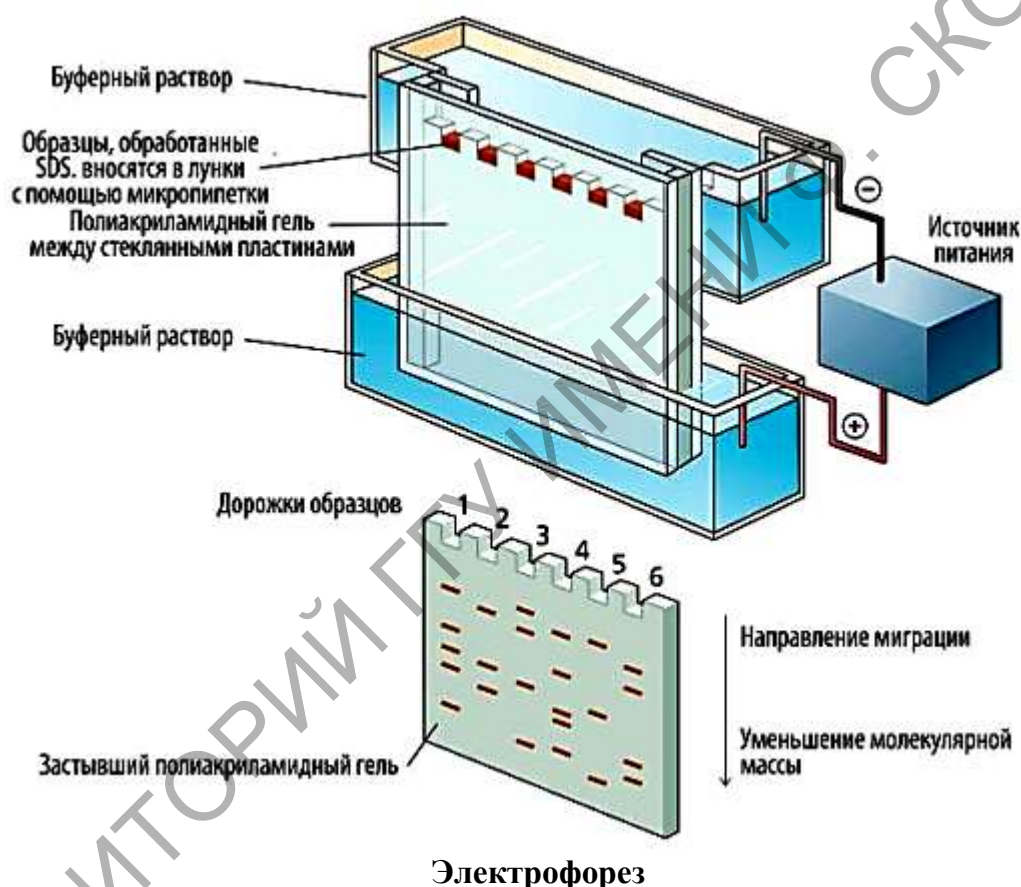


2 Методы разделения биополимеров (электрофорез)

Электрофорез – это перемещение частиц дисперсной фазы (коллоидных или белковых растворов) в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля. Впервые было открыто профессорами Московского университета П. И. Страховым и Ф. Ф. Рейссом в 1809 году. Различают две разновидности электрофореза:

катафорез – обрабатываемая поверхность имеет отрицательный электрический заряд (то есть подключена к отрицательному контакту источника тока) и

анафорез – заряд обрабатываемой поверхности положительный.



Виды электрофореза принятые в молекулярной биологии:

Вертикальный электрофорез – позволяет проводить разделение белков и ДНК с высоким разрешением.

Двумерный гель-электрофорез (2D) и изоэлектрическое фокусирование.

Горизонтальный электрофорез – позволяет проводить разделение белков и ДНК.

TGGE гель-электрофорез с температурным градиентом.

В настоящее время основная область применения гелеэлектрофореза с температурным градиентом – скрининг мутаций и анализ мик-

робных популяций, гетеродуплексный анализ, изучение метилирования ДНК, анализ вторичной структуры РНК, изучение белок-белковых взаимодействий и анализа термостабильности белков.

Электрофорез в пульсирующем поле – идеальное решение для разделения высокомолекулярной ДНК.

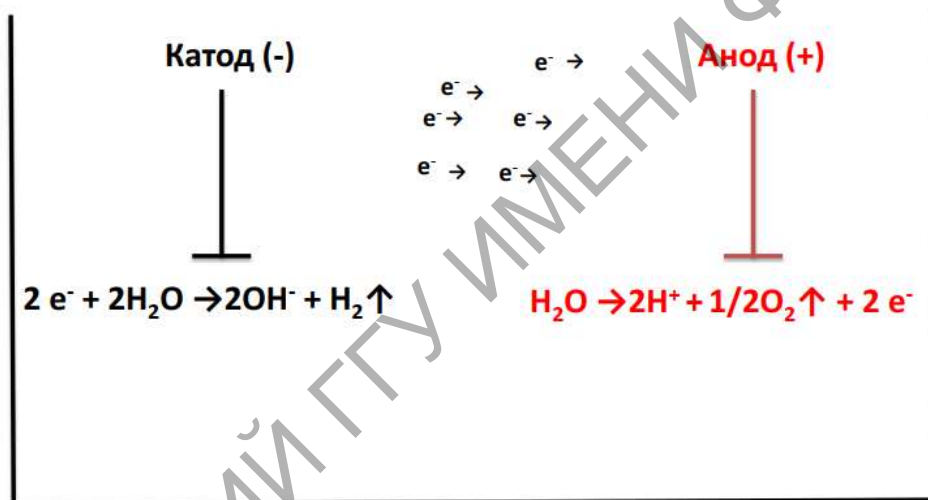
Иммуноэлектрофорез.

Гель-электрофорез – метод пространственного разделения ДНК, белков или макромолекул в целом по их весу (или заряду).

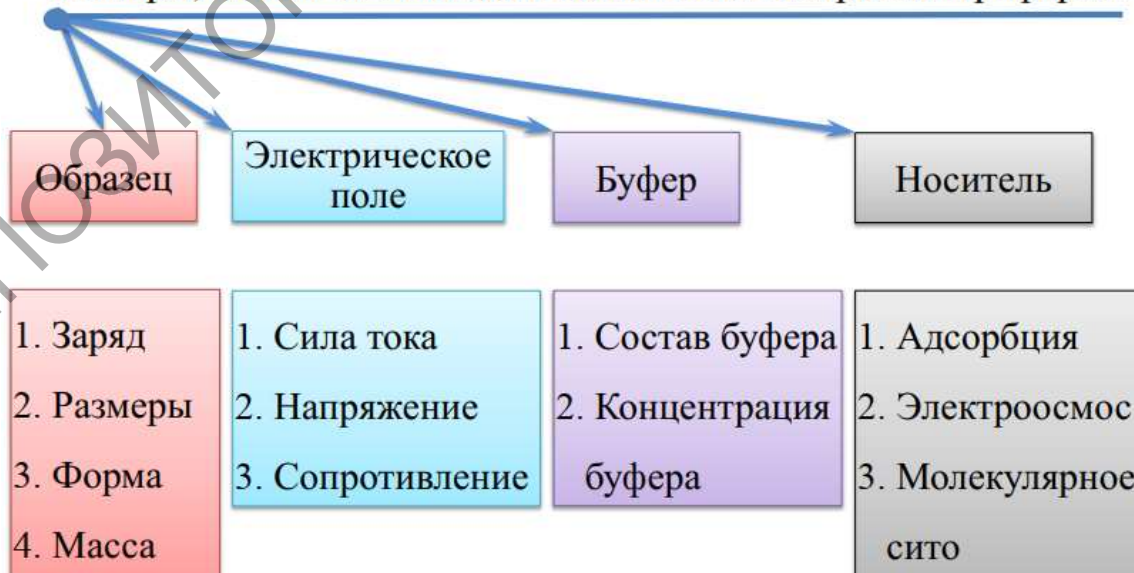
Базовые сведения о теории электрофореза.

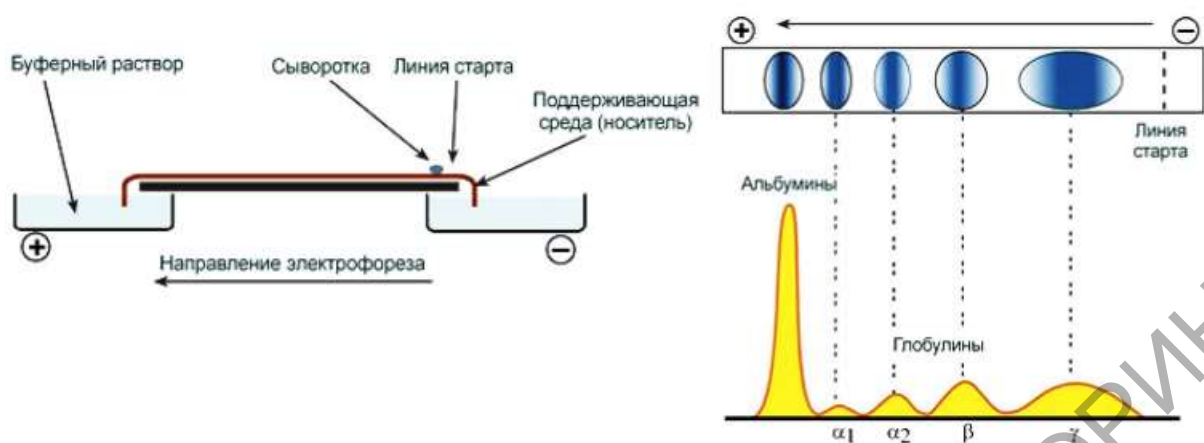
1. В растворе между электродами ток обусловлен ионами буфера и образца, а в остальной части цепи электронами.

2. Ток в цепи поддерживается за счет электролиза, происходящего на электродах, каждый из которых погружен в большую буферную камеру.



Факторы, влияющие на подвижность веществ при электрофорезе

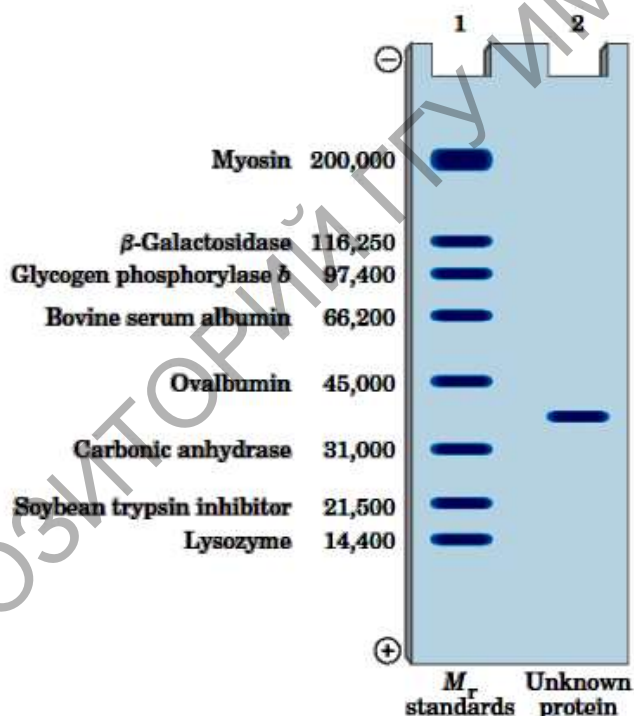




Пример проведения электрофореза

Отрицательно заряженные белки движутся в сторону катода. Быстрее движутся белки с меньшей массой. Плотность окрашивания пятна тем выше, чем больше белка в нем содержится. Размытие пятен обусловлено наличием изоформ одного типа белка, несколько различающихся аминокислотным составом и, соответственно, массой, но не функцией.

Определение молекулярной массы белка методом электрофореза



Вносятся аликвоты белков с известной массой (стандарт) и отдельно – аликвота белка с неизвестной массой. Поскольку скорость движения белков во внешнем электрическом поле зависит от их массы, то масса неизвестного белка рассчитывается с помощью прямой пропорции по известной скорости его движения (расстояние от линии

старта/длительность электрофореза) и скорости движения белков стандарта с известной массой.

Заряд. Подвижность возрастает с увеличением суммарного заряда. Величина заряда обычно зависит от рН.

Размеры. Чем крупнее молекулы, тем меньше их подвижность; это связано с возрастанием сил трения и электростатических взаимодействий крупных молекул с окружающей средой по сравнению с молекулами меньших размеров.

Форма. Молекулы одинакового размера, но различной формы, например фибриллярные и глобулярные белки, обладают разной подвижностью; это обусловлено различиями в силе трения и электростатическом взаимодействии.

Масса. Чем больше масса молекулы, тем она менее подвижна.

Согласно закону Ома, сила тока I (в амперах), напряжение V (в вольтах) и сопротивление R (в омах) связаны следующим соотношением: $I = V/R$. На разделение ионов в электрическом поле влияют все три фактора.

Сила тока. Поскольку ток в растворе между электродами обусловлен исключительно переносом ионов буфера и образца, скорость их перемещения прямо пропорциональна силе тока. Длина пути, пройденного ионами, будет пропорциональна времени пропускания тока. Следовательно, для максимальной воспроизводимости результатов сила тока в процессе электролиза не должна меняться. Само собой разумеется, что ток должен быть постоянным.

Напряжение. Оно связано с силой тока приведенным выше соотношением; отсюда следует, что скорость миграции пропорциональна падению напряжения в поддерживающей среде, или градиенту напряжения, обычно выражаемому в В/см-1 (приложенное напряжение, деленное на длину слоя носителя). Используются как низкие (100–500 В), так и высокие (500–10 000 В) напряжения с градиентами до 20 и 200 В/см-1 соответственно.

Сопротивление. Скорость миграции обратно пропорциональна сопротивлению, которое в свою очередь зависит от типа и размеров носителя и от ионной силы буфера. Сопротивление возрастает с увеличением длины слоя носителя и уменьшается при увеличении его ширины, а также с возрастанием концентрации буферных ионов.

Буфер создает и стабилизирует рН носителя, а также самым различным образом влияет на скорость миграции веществ.

Состав буфера. Наиболее широко применяемые буферы – формиатный, ацетатный, цитратный, вероналовый, фосфатный, трис,

ЭДТА и пиридиновый. Для разделения углеводов часто используют боратные буферы, преимущество которых заключается в том, что они образуют с углеводами заряженные комплексы.

Концентрация буфера. По мере увеличения ионной силы буфера компонент тока, обусловленный переносом ионов буфера, будет возрастать, а доля, приходящаяся на ток за счет ионов образца, уменьшаться. Таким образом, скорость миграции образца уменьшится. При высокой ионной силе буфера суммарный ток увеличивается, а следовательно, возрастает и количество выделяемого тепла. При низкой ионной силе ток, обусловленный переносом ионов буфера, уменьшается, а доля, приходящаяся на ток за счет ионов образца, возрастает. Таким образом, миграция образца ускоряется. В буфере с низкой ионной силой общая сила тока и выделение тепла уменьшаются, но диффузия возрастает, вследствие чего разрешающая способность хуже, чем при высокой ионной силе. В качестве носителей используют относительно инертные вещества, однако их состав все же не безразличен для подвижности разных веществ, и выбор соответствующей среды зависит поэтому от природы образца.

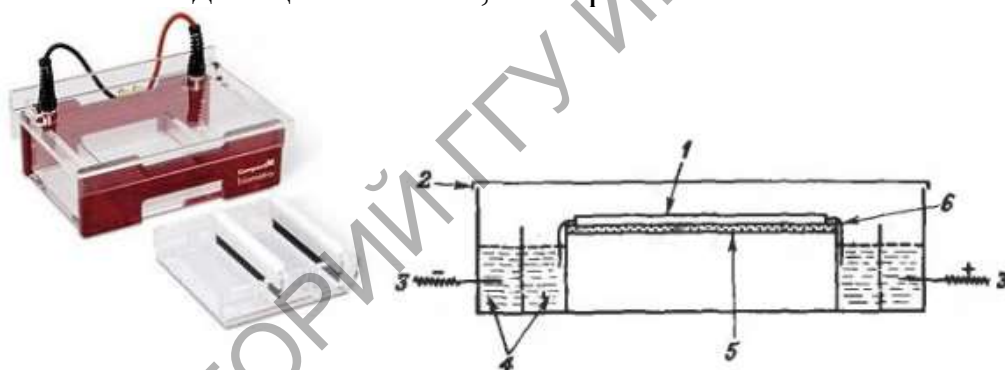
Адсорбция. Адсорбция – удерживание молекул образца носителем, как при адсорбционной хроматографии. Это приводит к размыванию пятен на хроматограмме, в результате чего образец движется не в виде четкой полосы, а имеет вид кометы; разрешающая способность метода при этом уменьшается. Адсорбция приводит также к уменьшению скорости миграции. Наибольшей способностью к адсорбции обладает бумага, однако это нежелательное ее свойство удается устранить, если использовать ацетат целлюлозы.

Электроосмос (электроэндосмос), это явление обусловлено возникновением относительного заряда между молекулами воды буферного раствора и поверхностью носителя. Ионизация групп носителя и поверхностная адсорбция ионов буфера обычно приводит к образованию из молекул воды ионов гидроксония (H_3O^+). Так как эти ионы заряжены положительно, они движутся к катоду, захватывая растворенные нейтральные вещества и убыстряя движение катионов; скорость движения анионов при этом падает. Обычно данными эффектами можно пренебречь, однако, если определяют изоэлектрическую точку вещества, нужно вводить соответствующую поправку. Как правило, это делают, следя за движением электрически нейтральных соединений, таких, как мочевины или глюкоза.

Молекулярное сито. Свойствами молекулярного сита обладает применяемый в гель-электрофорезе полужесткий носитель (гель);

такие его свойства способствуют разделению смесей заряженных макромолекул, например белков, которые различаются не только по электрофоретической подвижности, но также формой и размерами. Гели состоят из беспорядочно переплетающихся молекулярных цепей, распределенных по всему объему геля и образующих ситоподобную структуру. В соответствии с конкретными требованиями разделения размер пор гелей можно варьировать в некоторых пределах. Принцип действия молекулярного сита в агаровом, крахмальном и полиакриламидном гелях заключается в том, что крупные молекулы движутся сквозь него тем медленнее, чем меньше размер пор, который определяется числом поперечных сшивок в геле. При использовании гелей типа сефадекса ситуация обратная.

Горизонтальный электрофорез. Насыщенный буфером носитель, на который нанесен образец, обычно располагают горизонтально (горизонтальный электрофорез) на плоской поверхности изолирующего материала, например, плексигласа. При горизонтальном электрофорезе разделение можно проводить на бумаге, ацетате целлюлозы, в гелевых пластинах и в тонком слое, хотя работа с тонкими слоями при более высоких напряжениях требует применения металлических охлаждающих пластин, как при высоковольтном электрофорезе

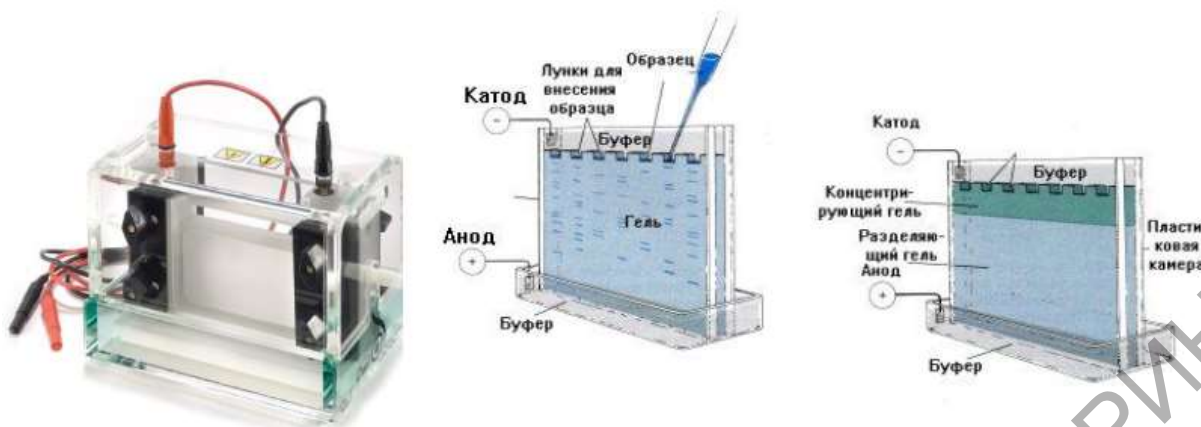


Прибор для горизонтального электрофореза.

1 — носитель; 2 — крышка; 3 — электрод; 4 — отсеки буферной камеры; 5 — изолирующая пластина; 6 — фитиль-мостик.

Вертикальный электрофорез. Насыщенный буфером носитель, на который нанесен образец, обычно располагают вертикально (вертикальный электрофорез) на вертикальной поверхности изолирующего материала, например, плексигласа. При вертикальном электрофорезе разделение как правило проводят в полиакриламидном геле.

Иммуноэлектрофорез (ИЭФ) — метод исследования антигенного состава биологических материалов, сочетающий электрофорез и иммунодиффузию. Впервые описан Грабаром и Уильямсом в 1953 году, в 1965 году метод был модифицирован Шейдеггером с целью минимизации (т.н. микромодификация метода ИЭФ).



Прибор для вертикального электрофореза

Образец антигенного материала разделяют электрофорезом в геле (обычно агарозном), в результате чего формируются характерные зоны. Далее параллельно зонам электрофореза вносится преципитирующая антисыворотка, антигены и антисыворотка диффундируют навстречу друг к другу, и в месте встречи антисыворотки с антигеном появляются линии преципитации, имеющие форму дуги. После проведения иммунодиффузии и элюирования непреципитировавших молекул из геля гель окрашивают специальными красителями.

Капиллярный электрофорез. Метод **капиллярного электрофореза** основан на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Микрообъем анализируемого раствора вводят в капилляр, предварительно заполненный подходящим буфером – электролитом. После подачи к концам капилляра высокого напряжения (до 30 кВ), компоненты смеси начинают двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей в первую очередь от заряда и массы (точнее – величины ионного радиуса) и, соответственно, в разное время достигают зоны детектирования. Полученная последовательность пиков называется электрофореграммой, при этом качественной характеристикой вещества является **параметр удерживания (время миграции)**, а количественной – **высота или площадь пика**, пропорциональная концентрации вещества.

Литература:

1. Dennison, C. A guide to protein isolation. Springer Science & Business Media, 2013. – 249 p
2. Попов, В.В. Геномика с молекулярно-генетическими основами. / В.В. Попов. – Москва: Книжный дом “ЛИБРОКОМ”, 2009. – 304 с.
3. Примроуз, С. Геномика: роль в медицине / С. Примроуз, Р.

Твеймен. – М.: БИНОМ, 2008. – 277 с.

4. Сингер, М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг. – М.: Мир, 1998. – 391 с.

5. Reese, R.J. Analysis of Genes and Genomes / R.J. Reese, 2004. – 469 p.

6. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.

7. Hartwell, L.H. Genetics: From Genes to Genomes / L.H. Hartwell [et al.]. – New York: McGraw-Hill, 2011. – 817 p.

ЛЕКЦИЯ 5. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Реакции агглютинации и преципитации
2. Методы иммуноанализа с применением радиоактивной метки
3. Методы иммуноанализа с применением флуоресцентной метки
4. Методы иммуноанализа с применением ферментной метки

1. Реакции агглютинации и преципитации

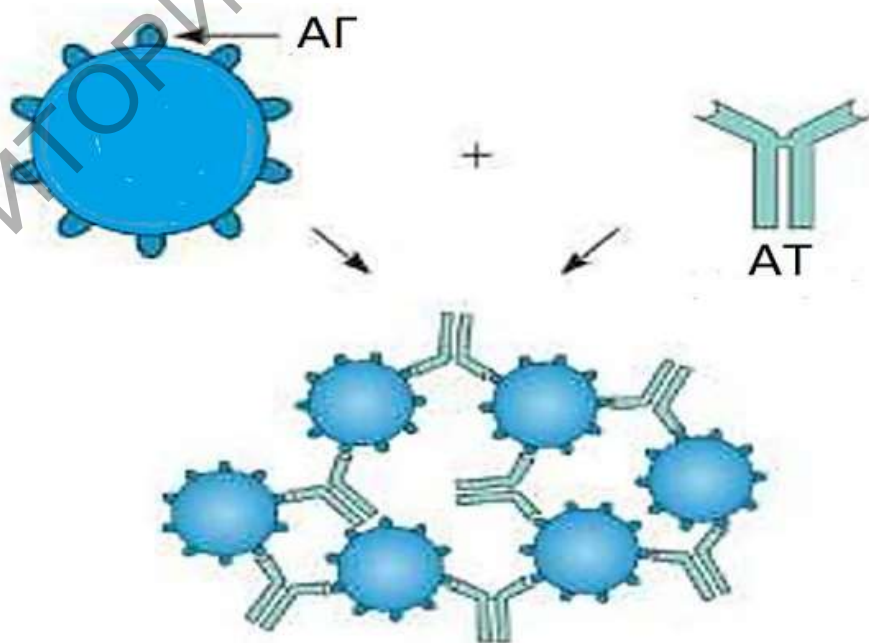
Особенности взаимодействия **антитела (АТ)** с **антигеном (АГ)** являются основой диагностических реакций (или серологических лат. *serum* – сыворотка), поскольку один из компонентов всегда известен.

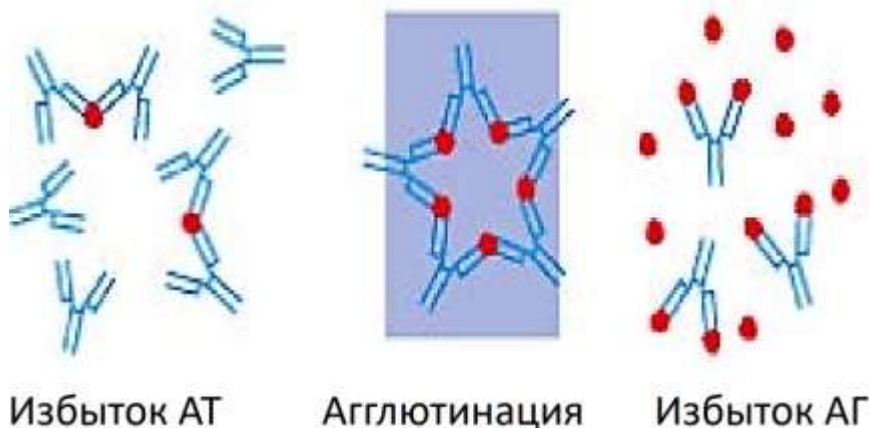
Реакции агглютинации (лат. *agglutinacion* – склеивание). Проявляется в склеивании и выпадении в осадок корпускулярных антигенов (бактерий, эритроцитов), а также частиц с адсорбированными на них антигенами под влиянием антител в среде с электролитом. Реакция протекает в 2 фазы:

1 – специфическая адсорбция АТ на поверхности клетки или частицы, несущей соответствующие АГ;

2 – образование агрегата (агглютината) и выпадение его в осадок. Происходит в присутствии электролита (раствор NaCl).

Механизм реакции описывается **теорией «решётки»**, согласно которой агглютинат образуется при соединении одного активного центра двухвалентного АТ с эпитопом одного АГ, а второго активного центра – с эпитопом другого АГ. Избыток или недостаток антител препятствует проявлению агглютинации.

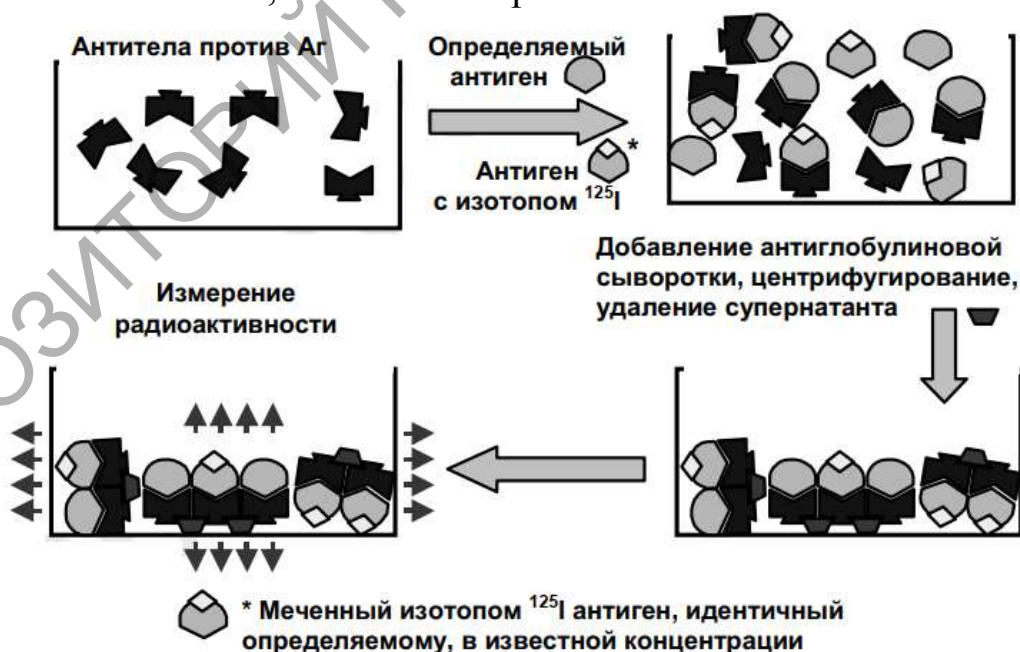




Реакция преципитации (лат. praecipito – осаждать) – это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого преципитатом. Механизм реакций преципитации также объясняется теорией «решетки». При этом АГ и АТ также должны быть смешаны в эквивалентных количествах.

2 Методы иммуноанализа с применением радиоактивной метки

Радиоиммунный анализ (РИА) был разработан в 50-х гг. прошлого века R. S. Yalow и S. A. Berson (определение инсулина). РИА основан на конкуренции определяемого антигена из клинического материала с определенным количеством идентичного, меченного изотопом, антигена с ограниченным количеством антител.



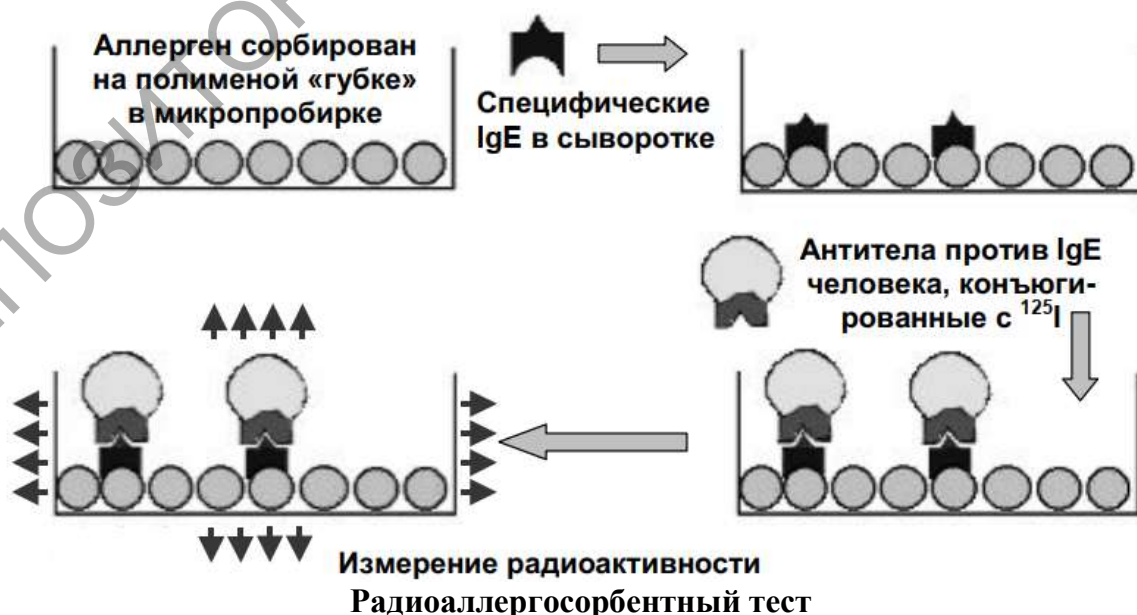
Радиоиммунный анализ (схемы РИА, ИРМА и тИФА созданы по мотивам рисунков, опубликованных на сайте Томского медицинского университета <http://biotech.city.tomsk.net>)

Связанные антигены отделяются от свободных добавлением антиглобулиновой сыворотки, белка А стафилококков или микробус, меченных антителами к иммуноглобулинам, и центрифугированием. Супернатанты отбрасываются, а остаточная радиоактивность измеряется на гаммасчетчике. При указанной схеме постановки радиоактивность обратно пропорциональна содержанию антигена в образце.

Таким образом, РИА является конкурентным гетерогенным методом исследования. Основные его преимущества – высокая чувствительность и специфичность. Применение изотопной метки и мечение антигена обеспечивают высокий уровень соотношения сигнал/шум и низкое неспецифическое связывание метки.

Разработан также твердофазный РИА (разделение связавшихся и свободных антигенов достигается простой промывкой флаконов/планшетов).

Иммунорадиометрический анализ (ИРМА). Определение антител с помощью изотопной метки получило название *иммунорадиометрического анализа*. В качестве примера ИРМА рассмотрим **радиоаллергосорбентный тест (РАСТ)**. РАСТ был разработан в начале 1970-х (L. Wide) для определения аллерген-специфических IgE в сыворотке крови. Аллерген сорбировали на пористом носителе (бумага, полимерные мембраны, гранулы, губки). Далее добавляли сыворотку пациента, инкубировали 3 ч, отмывали и добавляли антиглобулиновую сыворотку (против IgE), меченную радиоактивным изотопом. После отмывки несвязавшихся реагентов, радиоактивность учитывали на счетчике.



Первые тесты характеризовались низкой чувствительностью, плохо коррелировали с клиникой и другими аллергологическими тестами (прик-тесты) и не нашли широкого применения. В конце 70-х были предложены РАСТ второго поколения (большая чувствительность за счет меньшей специфичности и большей продолжительности теста; тесты по-прежнему носили качественный характер). Наконец, в 80–90-х гг. распространились РАСТ третьего поколения (большая чувствительность и специфичность за счет применения моноклональных антител против IgE, автоматизации, использования флуорохромных, ферментных меток или электрохемолуминисценции; применение IgE стандартов ВОЗ позволило получать количественные результаты).

В целом, применение изотопных меток (РИА, ИРМА) сыграло важную роль в становлении иммуноанализа. Именно эти методы впервые раскрыли потенциал иммуноанализа и дали толчок к его разработке и коммерческому применению. Тем не менее, недостатки данного подхода (в первую очередь, небезопасность, трудности разработки, транспортировки, хранения, утилизации отходов, необходимость применения дорогостоящего оборудования и др.) привели к вытеснению методов, основанных на радиоактивной метке, альтернативными.

3. Методы иммуноанализа с применением флуоресцентной метки

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ). Впервые предложена Coombs в 1942 г. РИФ основана на выявлении антигенов в клиническом материале, препаратах клеток крови и др. с помощью моноклональных антител или сывороток, меченных флуорохромом (прямая РИФ). Первые (диагностические) антитела можно выявлять антииммуноглобулиновой сывороткой, меченной флуорохромами (непрямая РИФ). Существуют модификации РИФ для выявления антител к инфекционным агентам в сыворотке крови или антител в сыворотке крови.

Популярность РИФ объясняется экономичностью, наличием широкого спектра диагностических наборов, быстротой получения ответа. Сегодня в этой реакции используются как поликлональные сыворотки, так и моноклональные антитела, меченные флуоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ). Для уменьшения неспецифического свечения фона применяют обработку препаратов бычьим

сывороточным альбумином, меченным родамином или синькой Эванса.

Чаще всего РИФ используют для быстрого обнаружения возбудителя в патологическом материале. В этом случае из исследуемого материала готовят мазок на предметном стекле, как для обычной микроскопии. Препарат фиксируют метиловым спиртом, ацетоном или другим химическим фиксатором. На поверхность фиксированного мазка наносят меченные ФИТЦ сыворотки или моноклональные антитела (в случае непрямой РИФ препарат сначала обрабатывают сывороткой против искомого антигена, а затем мечеными антителами к иммуноглобулинам, использованным на первом этапе). Поскольку РИФ является разновидностью гетерогенного анализа, один этап отделяется от другого промывкой.

Учет результатов реакции осуществляется с помощью люминесцентного микроскопа, в оптическую систему которого устанавливается набор светофильтров, обеспечивающих освещение препарата ультрафиолетовым или сине-фиолетовым светом с заданной длиной волны. Исследователь оценивает характер свечения, форму, размер объектов и их взаимное расположение.

При постановке РИФ для обнаружения антител готовят мазки из эталонного штамма возбудителя. Исследуемую сыворотку наносят на мазок. Если в ней присутствуют искомые антитела, то они связываются с антигенами микробных клеток. Промывка препарата буферным раствором позволяет удалить несвязавшиеся антитела. Затем препарат обрабатывают меченой сывороткой против иммуноглобулинов человека. В случае положительного результата реакции при микроскопии мазка в люминесцентном микроскопе наблюдают специфическое свечение эталонной культуры.

Основным недостатком РИФ является ее субъективность.

Классическими критериями специфичности этой реакции являются: характерная морфология, размеры и расположение возбудителя в мазке; периферический характер свечения объекта; цвет флюоресценции; интенсивность флюоресценции.

При исследовании крупных объектов (трихомонады, клетки человека, клетки, пораженные бактериями или вирусами) эти критерии позволяют получить достоверный результат. В то же время, элементарные тельца хламидий и микоплазмы имеют размеры, лежащие на пределе разрешающей способности люминесцентного микроскопа. При этом оценка морфологии микроорганизмов затруднена, а свечение теряет периферический характер. Остающихся

критериев явно недостаточно для уверенной идентификации наблюдаемого микроорганизма. В связи с вышесказанным, субъективный характер учета реакции предъявляет особые требования к квалификации персонала, проводящего исследования.

4. Методы иммуноанализа с применением ферментной метки

Иммуноферментный анализ (ИФА), как и другие системы иммуноанализа, основан на специфическом распознавании и взаимодействии антигенов и антител. Процесс образования иммунных комплексов носит равновесный характер и зависит от аффинности компонентов, их концентрации и других условий реакции. Для оценки их количества возможно прямое определение концентрации образующихся иммунокомплексов либо измерение оставшихся свободными мест специфического связывания. Второй общей стадией любого метода ИФА является формирование связи меченого ферментом соединения со специфическим комплексом или свободными центрами связывания. И, наконец, заключительным обязательным процессом в ИФА является трансформация ферментной метки в соответствующий сигнал, измеряемый каким-либо физико-химическим методом (спектрофотометрическим, флуориметрическим и т. д.), что достигается путем измерения скорости превращения субстрата или количества продукта, образующегося за фиксированный промежуток времени.

Основные **достоинства ИФА**, обеспечившие широкую распространенность метода: высокая чувствительность, позволяющая выявлять концентрации антигена до 10 пг/мл; высокая стандартность и воспроизводимость; возможность использовать минимальные объемы исследуемого материала; стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более); простота проведения реакции; наличие как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета; возможность автоматизации всех этапов реакции; относительно низкая стоимость диагностических наборов и оборудования.

Применение ИФА: диагностика инфекционных заболеваний: обнаружение антигенов возбудителя; обнаружение антител к антигенам возбудителя; мониторинг заболевания, определение ответа на терапию, прогноза развития заболевания и его исхода; контроль поствакцинального иммунитета; диагностика аутоиммунных заболеваний: определение аутоантител; диагностика аллергических заболеваний:

определение общего и специфического IgE; определение продуктов активированных эозинофилов, базофилов и тучных клеток; диагностика злокачественных опухолей: определение в сыворотке маркеров опухолевого роста; фенотипирование опухолевых клеток (тканей) для уточнения происхождения и дифференцировки опухоли; определение концентрации гормонов, параметров менструальноовуляторного цикла; диагностика беременности; определение концентрации лекарственных препаратов; определение допинга; определение загрязнения окружающей среды и мн. др.

В зависимости от подхода к измерению результата реакции выделяют **неконкурентный** и **конкурентный** ИФА.

Если на первой стадии в системе присутствует только определяемый реагент – антиген или антитела – то метод является **неконкурентным**.

Если на первой стадии анализа в системе одновременно присутствуют анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за имеющиеся центры специфического связывания, то метод является **конкурентным**.

Выделяют также **гомогенный** и **гетерогенный** ИФА.

Гомогенные методы иммуноферментного анализа.

К *гомогенным* относятся методы, осуществляемые в однофазной системе, и не требующие стадии механического разделения образовавшихся комплексов. Все *гомогенные* методы относятся к *конкурентным* и основаны на одновременном взаимодействии с антителами анализируемого и меченого антигенов. После образования в растворе соответствующего иммунохимического комплекса проводят измерение ферментативной активности, которая пропорциональна концентрации свободного или связанного меченого лиганда.

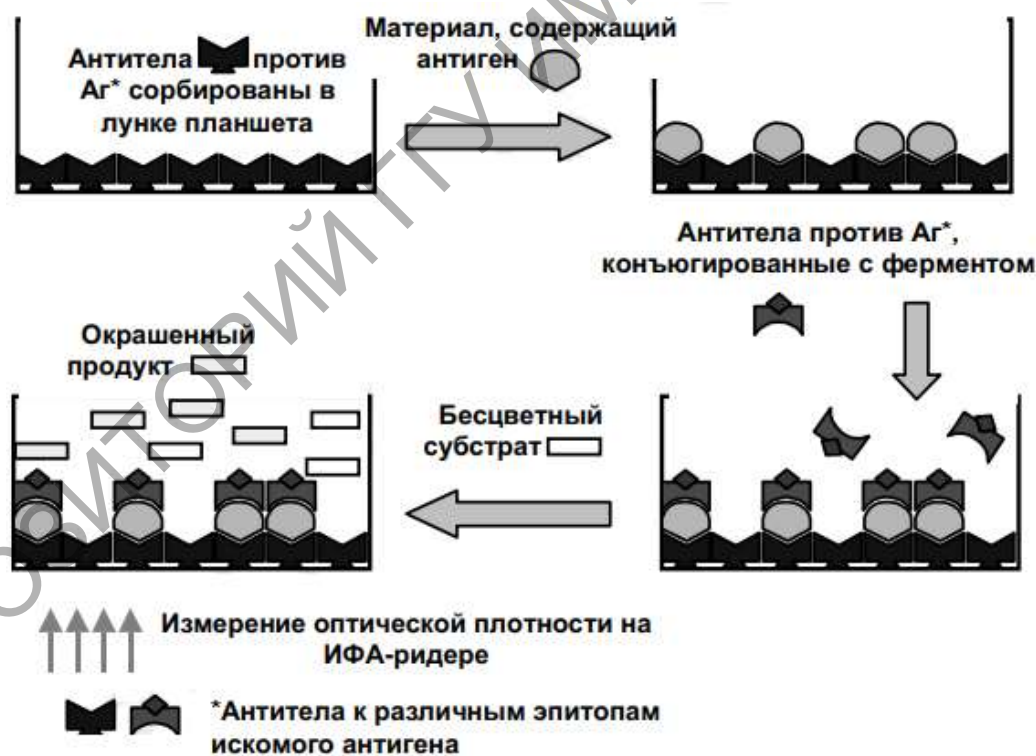
Одним из распространенных методов является *ЕМИТ-анализ* (*enzyme monitored immunoassay technique*), основанный на изменении активности ферментной метки в конъюгате «фермент-антиген» при образовании комплекса с антителами. Обычно взаимодействие приводит к снижению активности вследствие конформационных перестроек в молекуле фермента или стерического исключения доступа молекулы субстрата к активному центру фермента. Достоинствами гомогенных методов является значительное сокращение времени проведения анализа (несколько минут), недостатками – меньшая чувствительность и возможность влияния состава анализируемого образца на результаты анализа.

Гетерогенные методы иммуноферментного анализа.

Гетерогенный ИФА объединяет методы, в которых анализ проводится в двухфазной системе, при этом разделение на фазы может происходить на любой стадии определения (однако первый этап имеет решающее значение). Если на первой стадии антиген или антитело используют в иммобилизованном состоянии и формирование специфического иммунокомплекса проходит на твердой фазе, то метод относится к *твердофазным*.

Гетерогенный твердофазный ИФА (ELISA = enzyme linked immunosorbent assay) получил наибольшее распространение в медицинской и лабораторной практике. Для его осуществления обычно применяют 96-луночные полистирольные планшеты, т. к. на полистироле можно легко адсорбировать антитела, а с помощью специальной обработки и различные антигены.

В случае применения ИФА для поиска антигена диагностическую систему строят по принципу «сэндвича» (двухцентровый ИФА). Это означает, что для захвата искомого антигена и его детекции используют различные антитела к разным неинтерферирующим детерминантам.



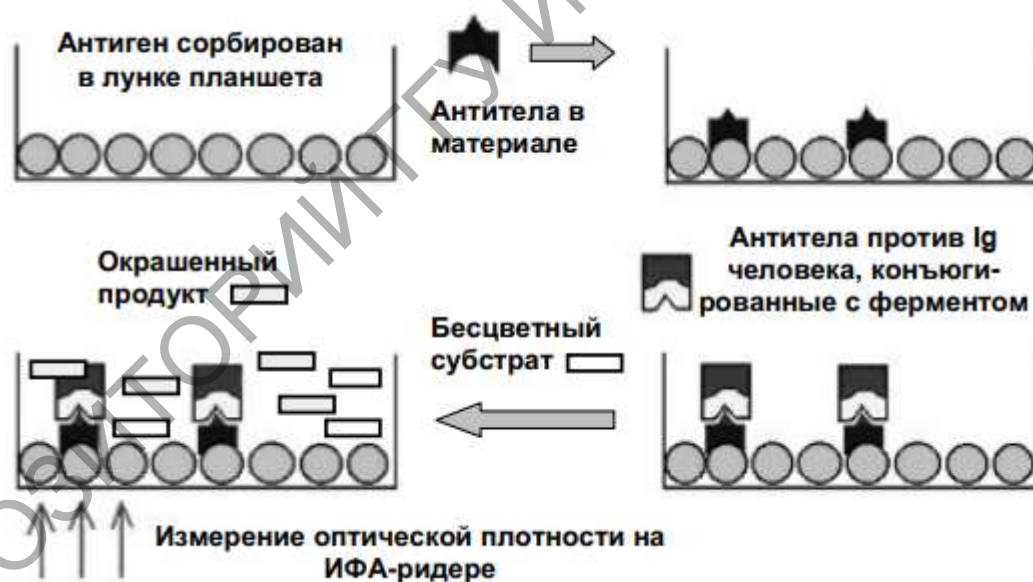
Твердофазный ИФА для определения антигена

Первые (захватывающие) антитела сорбируют на стенках лунок. Исследуемый материал вносят в лунку, при этом антиген, взаимодействуя с антителами, фиксируется в ней. Лунки тщательно

промывают буферным раствором, чтобы удалить неадсорбировавшиеся вещества. Затем вносят вторые (детектирующие) антитела против искомого антигена, меченные ферментом. В качестве фермента-метки обычно используют пероксидазу хрена. После инкубации лунку снова промывают, чтобы удалить несвязавшиеся меченые антитела. На заключительном этапе в лунку вносят хромогенный субстрат (например, ортофенилендиамин или тетраметилбензидин). Ферментативное расщепление субстрата приводит к образованию окрашенных продуктов реакции.

Таким образом, изменение окраски содержимого лунки будет свидетельствовать о положительном результате реакции. Более того, интенсивность окрашивания характеризует количество антигена (антител) в образце. Измерение окрашивания раствора обычно проводят на ИФА-ридере (планшетном фотометре).

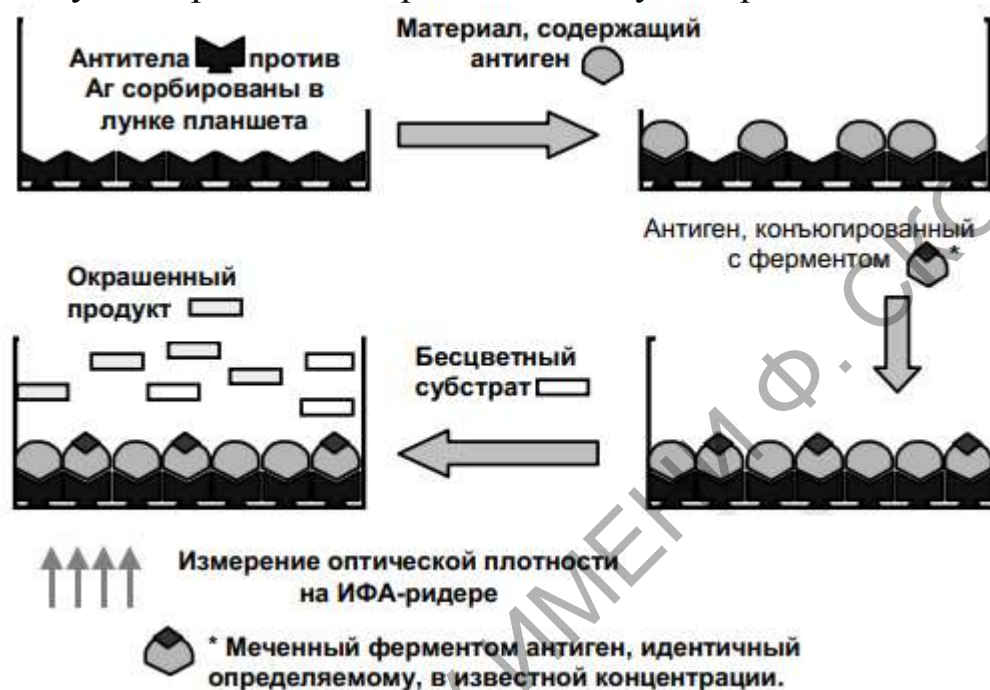
При серодиагностике используют полистирольные планшеты, на стенках которых заранее с помощью тех или иных методов адсорбируется («нагружается») антиген. Для предотвращения неспецифического связывания антител с полистиролом оставшаяся свободной поверхность полистирола блокируется (белки молока, бычий сывороточный альбумин).



Твердофазный ИФА для определения антител

Исследуемая сыворотка вносится в лунку планшета. При этом гомологичные антигену антитела прикрепляются к сорбированному антигену. Не прикрепившиеся антитела удаляют промыванием. Затем в лунку вносят антитела против иммуноглобулинов (антител) человека, меченные ферментом (используя антитела против

иммуноглобулинов различных классов, можно получить ценную информацию о характере иммунного ответа). Если в исследуемой сыворотке присутствовали искомые антитела, то они на данном этапе выступят в роли антигенов, с которыми прореагируют меченые антитела. Добавление после промывки хромогенного субстрата позволит учесть реакцию по развивающемуся окрашиванию в лунках.



Конкурентный твердофазный ИФА для определения антигена

Конкурентный твердофазный ИФА низкомолекулярных антигенов может быть реализован следующим образом: к иммобилизованным на носителе антителам добавляют материал, содержащий анализируемый антиген и определенное количество антигена, меченного ферментом. После проведения инкубации носитель отмывают от несвязавшихся свободного и меченого антигена и регистрируют ферментативную активность на носителе, которая обратно пропорциональна концентрации определяемого антигена.

Литература:

- 1.Примроуз, С. Геномика: роль в медицине / С. Примроуз, Р. Твеймен. – М.: БИНОМ, 2008. – 277 с.
- 2.Черношей, Д.А. Методы иммуноанализа, основанные на применении меченых компонентов / Д.А. Черношей, Т.А. Канашкова. – Минск: БГМУ, 2007. – 28 с.
- 3.Бурместер, Г.-Р. Наглядная иммунология / Г.-Р. Бурместер, А. Пецутто. – М.: Лаборатория знаний, 2014. – 320 с.

ЛЕКЦИЯ 6. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

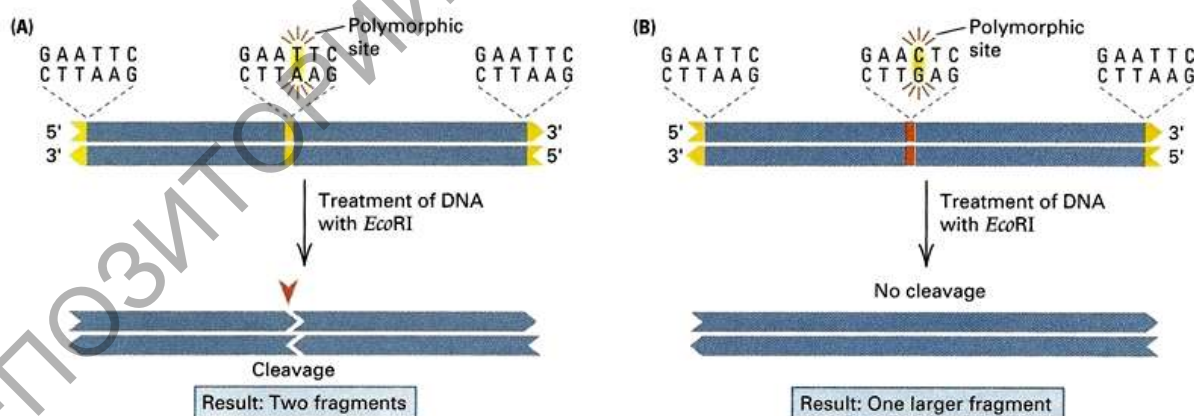
1. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов
2. Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот

1. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) (Restrictions Fragment Length Polymorphism (RFLP)) – это способ исследования ДНК, путем разрезания аплифицированных фрагментов с помощью рестриктаз и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путем гель-электрофореза (ДНК электрофореза).

ПДРФ включает в себя фрагментацию ДНК посредством рестриктазы. Далее продукты рестрикции разделяются электрофоретически, переносятся на нитроцеллюлозную, или нейлоновую мембрану (посредством Саузерн-блоттинга) после чего их гибридизуют с мечеными ДНК-зондами. Далее сравнивают размеры прогибридизовавшихся фрагментов у разных генотипов.

Различные длины фрагментов свидетельствуют о различиях на уровне последовательности ДНК – мутациях в районе рестрикционных сайтов, делециях, захватывающих рестрикционные сайты, инсерциях в области, гибридизуемой с зондом (Botstein et al., 1980; Landry, Michelmore, 1987).

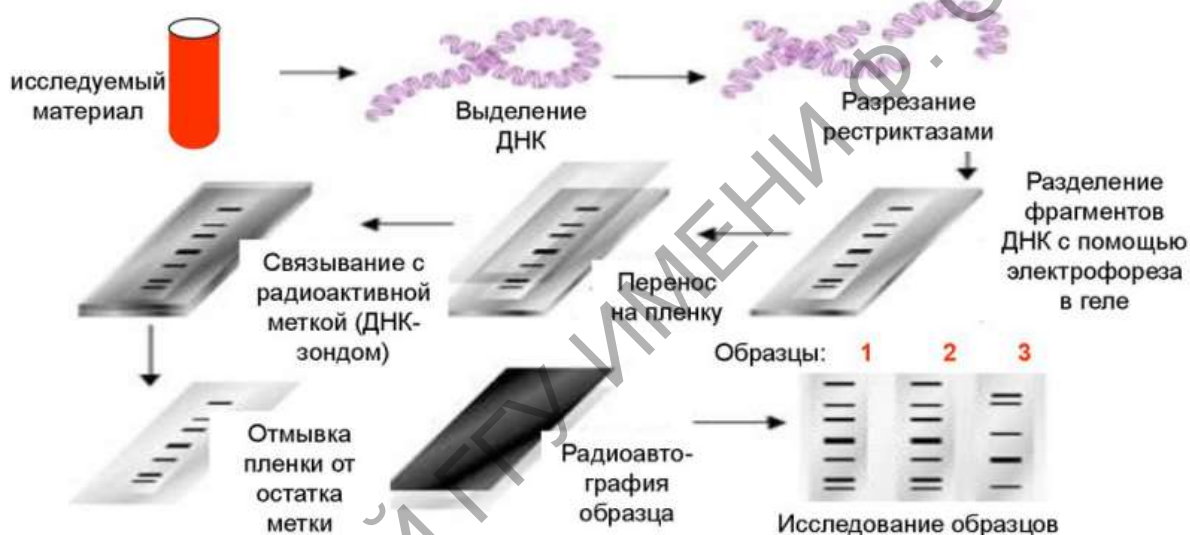


Выявление мутаций методом ПДРФ

В последнее время этот метод используется все реже ввиду трудоемкости, невозможности автоматизации процесса и необходимости наличия большого количества ДНК для анализа.

Метод ПДРФ широко используется в генетических исследованиях популяций, поскольку наличие в геноме исследуемого организма

рестрикционного фрагмента ДНК определенной длины является прекрасным генетическим маркером и одновременно фенотипическим признаком, тесно связанным с генотипом организма. Это позволяет следить за распространением такого маркера в популяциях, передачей его от родителей к потомству при скрещиваниях и использовать для построения генетических карт исследуемых организмов классические генетические методы. ПДРФ-маркеры благодаря их четкой принадлежности определенным генетическим локусам не уступают по информативности распространенным биохимическим маркерам и во многих случаях оказываются удобнее сложных фенотипических признаков (таких, как цвет глаз, окраска волос или шерсти, форма цветков и листьев), определяемых многими генами.



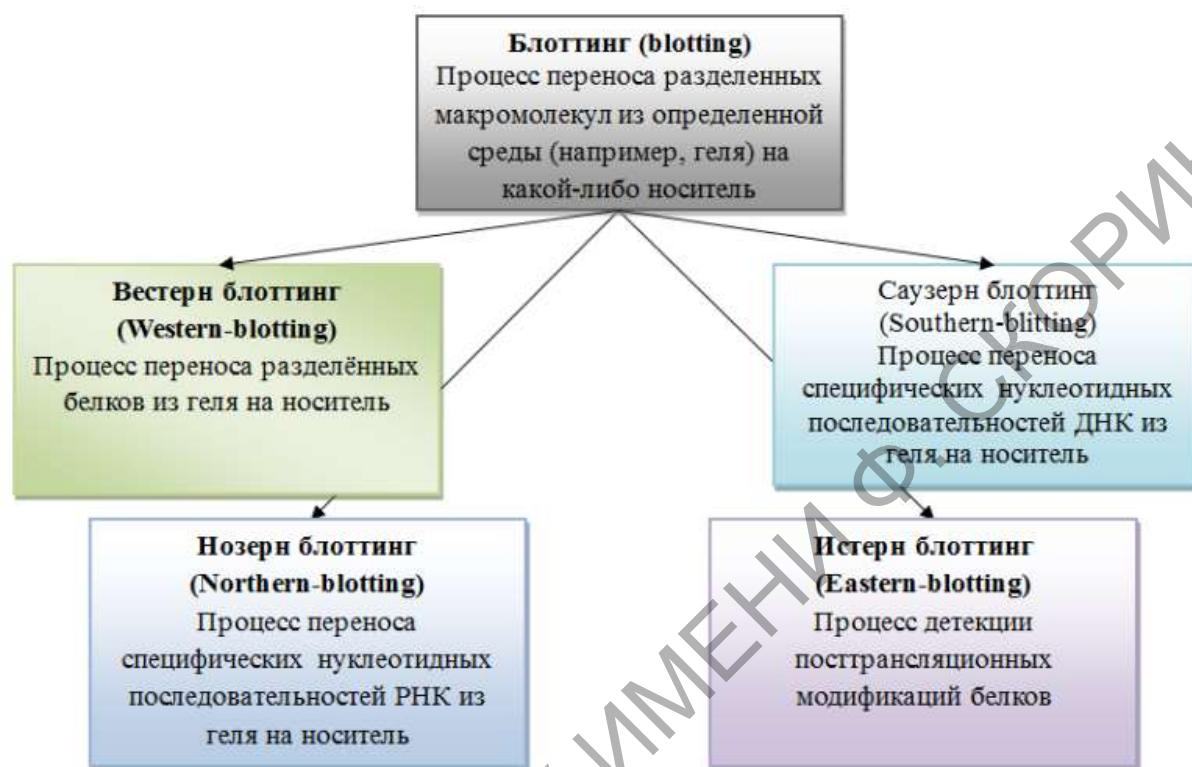
2. Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот

Блоттинг (англ., blott – промокашка, blotting – промакивание) – комплекс методик, включающих этап переноса разделенных макромолекул из определенной среды (например, геля) на какой-либо носитель (специальная бумага, нитроцеллюлозные фильтры и т.п.).

Существует два основных типа блоттинга – капиллярный (например, Саузерн-блоттинг), в основе которого – перемещение молекул благодаря капиллярному эффекту, и электроблоттинг, при котором перенос молекул обеспечивается путем электрофореза.

Саузерн-блоттинг (Southern-blotting) – обнаружение специфических нуклеотидных последовательностей, путем переноса электрофоретически разделенных фрагментов ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный (бумажный) фильтр за счет капиллярного эффекта (blotting – «промокание») и гибридизации с меченым ДНК-

или РНК-зондом, комплементарным искомой последовательности. Образование гибридов обнаруживают методом автордиографии. Метод разработан Э. Саузерном и Р. Дэйвисом в 1975.



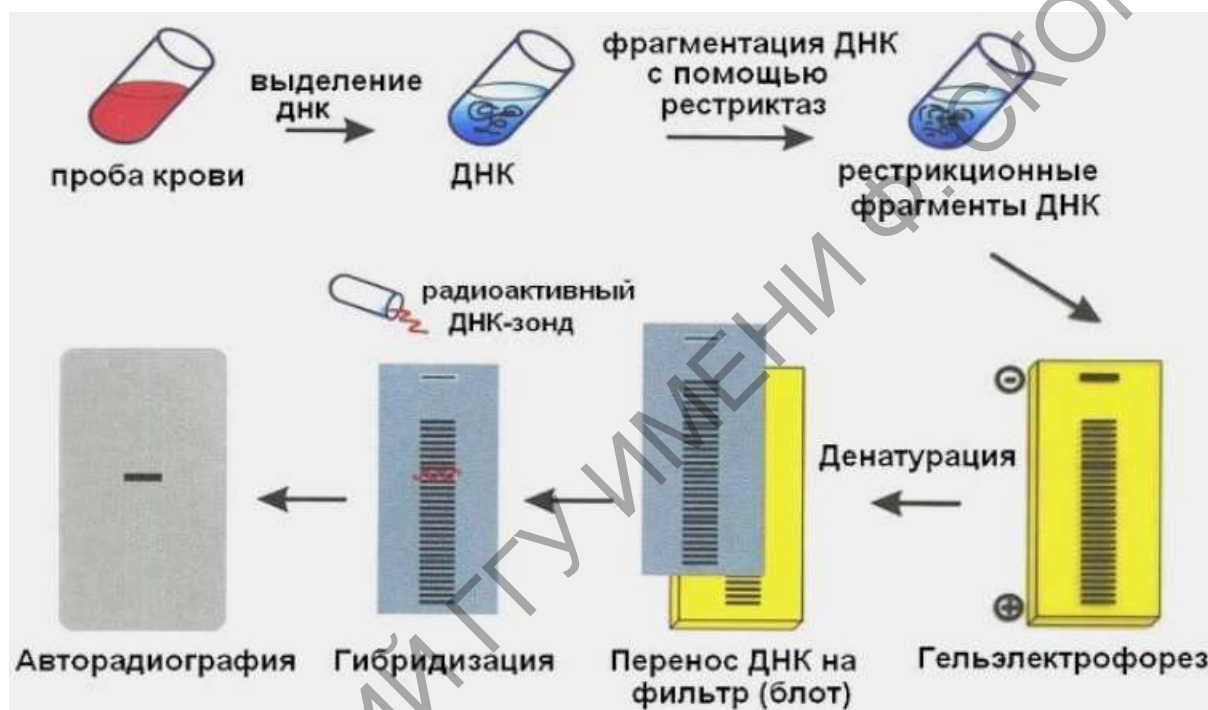
Нозерн-блоттинг (Northern-blotting) – метод, аналогичный методу Саузерн-блоттинга и применяемый для тестирования фрагментов и молекул РНК (вместо нитроцеллюлозного используется фильтр из диазобензилоксиметил-целлюлозы, в качестве зондов используют комплементарные молекулы ДНК. Метод нозерн-блоттинга предложен Дж. Олвайном с сотрудниками в 1977.

Истерн-блоттинг (Eastern blotting) – детекция посттрансляционных модификаций белков.

Вестерн-блоттинг (белковый иммуоблот, Western blotting) – аналитический метод, используемый для определения специфичных белков в образце. Вестерн-блоттинг разработан в лаборатории Джорджа Старка (George Stark) в Стэнфорде. Название вестерн-блот было дано технике У. Нейлом Бурнеттом (W. Neal Burnette) и является игрой слов от названия Саузерн-блоттинг, – методики определения ДНК, разработанной ранее Эдвином Саузерном.

Саузерн (Southern, 1975) предложил оригинальную идею по переносу фрагментов ДНК из агарозного геля на гибридизационную мембрану. Гель помещают на фильтровальную бумагу, находящуюся в контакте с буфером. Мембрану накладывают на гель, а сверху

укладывают несколько слоев фильтровальной бумаги, легко абсорбирующей влагу. Бумага служит своеобразным капиллярным насосом, способствуя вымыванию фрагментов ДНК током буфера из геля и переносу их на мембрану. Далее ДНК денатурируют щелочью, а мембрану выдерживают при 80 °С или облучают УФ-светом, что позволяет фиксировать ДНК на мембране. Затем мембрану помещают в раствор с меченым зондом, в котором и происходит гибридизация. После отмывки несвязавшихся радиоактивных меток результат выявляют с помощью радиоавтографии.



Метод блот-гибридизации по Саузерну

Стандартные условия блоттинга по Саузерну не применимы к РНК, так как она не связывается с обычными нитроцеллюлозными и нейлоновыми мембранами. Для иммобилизации РНК вначале был предложен специальный вид бумаги с диазобензилоксиметилем (DMB-целлюлоза), а затем были найдены условия для нековалентного связывания РНК с нитроцеллюлозой (предварительная денатурация РНК диметилсульфоксидом, формальдегидом и др.) и разработаны для этого подходящие нейлоновые фильтры.

Отметим, что в описанных видах блоттинга для организации потока ДНК, РНК и белков через гель в мембране вместо капиллярных сил используют также электрофорез и вакуум.

Литература:

1. Попов, В.В. Геномика с молекулярно-генетическими основами. / В.В. Попов. – Москва: Книжный дом “ЛИБРОКОМ”, 2009. – 304 с.
2. Примроуз, С. Геномика: роль в медицине / С. Примроуз, Р. Твеймен. – М.: БИНОМ, 2008. – 277 с.
3. Сингер, М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг. – М.: Мир, 1998. – 391 с.
4. Reese, R.J. Analysis of Genes and Genomes / R.J. Reese, 2004. – 469 p.
5. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.
6. Hartwell, L.H. Genetics: From Genes to Genomes / L.H. Hartwell [et al.]. – New York: McGraw-Hill, 2011. – 817 p.

ЛЕКЦИЯ 7. МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. Характеристика полимеразной цепной реакции (ПЦР)
2. ПЦР в реальном времени (Real-time PCR)
3. Применение ПЦР

1. Характеристика полимеразной цепной реакции (ПЦР)

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 Мюллісом. 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 Таg-ДНК-полимеразой, присоединяющейся к **3'-концам праймеров** и достраивающие их до заданной длины. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) протекает в три стадии (рисунок 7.1, 7.2).

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.

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°C. 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°C гибрид праймер-ДНК не денатурирует, а Таг-полимераза способна работать с большой скоростью. За 20 циклов амплификации количество копий ДНК достигает величины 10^6 .

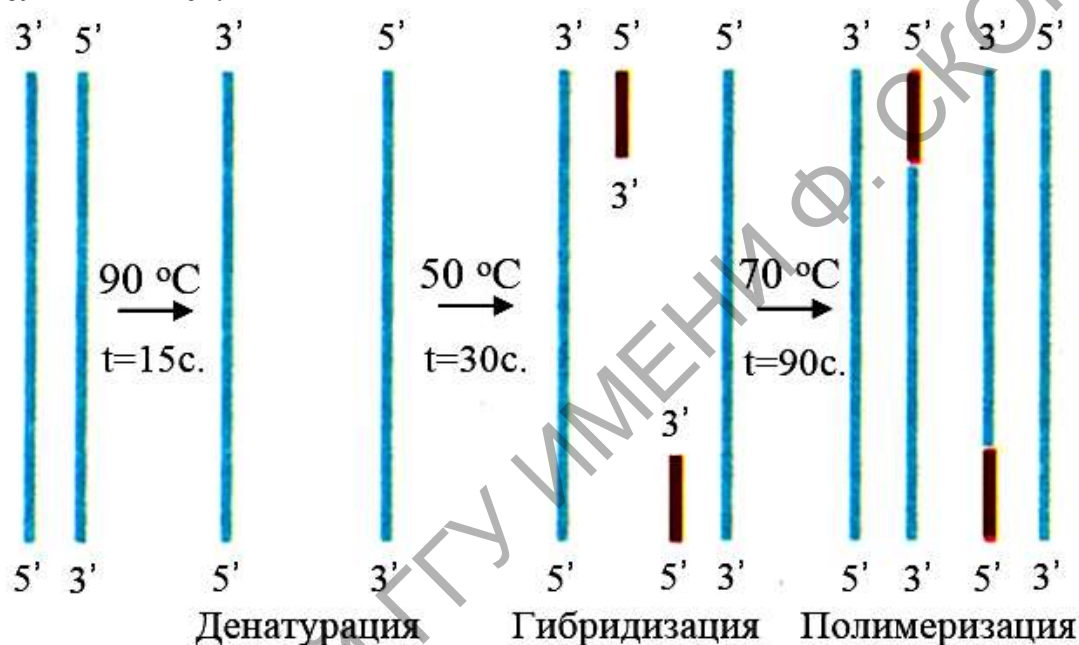


Рисунок 7.1 – Схема стадий одного цикла амплификации (размножения) фрагмента ДНК с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

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

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

ПЦР технологии позволили ученым без огромных временных и материальных затрат получать точные данные по **структуре генов и фрагментов ДНК** при наличии **самого минимального количества** биологического материала. Одним из важнейших применений ПЦР стала **диагностика наследственных заболеваний** человека, особенно на **пренатальных стадиях развития** при наличии малого количе-

ства ДНК из фетальных клеток. Не менее важным применением

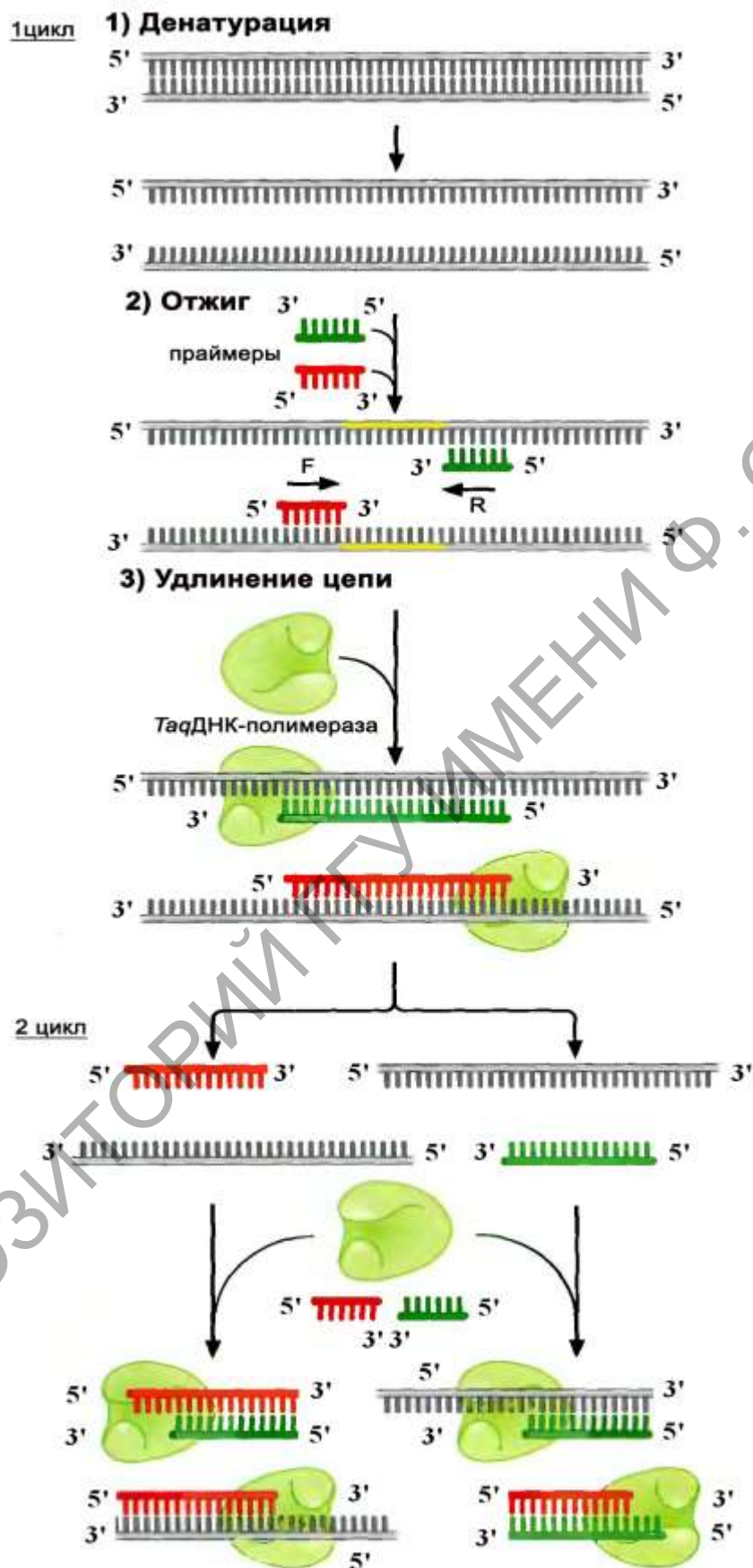


Рисунок 7.2 – Развернутая иллюстрация ПЦР

технологий стала **дактилоскопия и идентификация индивидуумов**, используя материал ДНК, полученный из нескольких сперматозоидов, одного волоса и, в некоторых случаях, даже из одного **бластомера**, выделенного из **зародыша (пре-эмбриона)** на стадии восьми зародышевых клеток. Метод ПЦР успешно используется также для **направленного получения точковых мутаций**.

Конструирование праймеров.

При конструировании праймеров необходимо соблюдать ряд требований:

длина праймера (18 до 24 нуклеотидов)

- **температура плавления (T_m)**

$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ (формула Уоллеса (Wallace))

- **специфичность**

- **комплементарная последовательность праймера**

• **G/C содержание и полипиримидиновые (Т, С) или полипуриновые (А, G) протяженные участки** (Состав нуклеотидов в праймере должен быть между 45% и 55% содержанием GC)

- **3'-концевая последовательность.**

Таким образом, можно сказать, что праймер должен содержать почти случайную смесь нуклеотидов, иметь содержание GC – 50% и длину ~ 20 оснований. Это даст T_m в пределах 56° - 62°C.

Ключевые свойства Taq-ДНК-полимеразы

1. Наличие 5' → 3' экзонуклеазной активности.
2. Отсутствие 3' → 5' экзонуклеазной активности.
3. Высокая термостабильность (время полужизни: ~2 часа при 95°C).
4. Скорость синтеза ДНК ~ 50 н/сек при 72°C.

Гнездовой и мультиплексный метод ПЦР

Гнездовой метод ПЦР может быть использован для улучшения выхода последовательности целевой ДНК (Newton and Graham, 1994). ПЦР с гнездовыми праймерами осуществляется за **15 – 30 циклов с одним набором праймеров**, а затем в течение **дополнительных 15 – 30 циклов со вторым набором праймеров**, – к внутреннему участку первого амплифицированного ДНК продукта. Таким образом, наибольший фрагмент, полученный после первого раунда ПЦР, используется в качестве матрицы для второго раунда ПЦР. Использование гнездового метода ПЦР может резко повысить чувствительность и специфичность амплификации ДНК.

В отличие от стандартного метода в мультиплексном методе ПЦР используют для амплификации не одну пару праймеров, а множество пар праймеров многих последовательностей одновременно.

Для этого типа ПЦР амплификации **выбирают праймеры с близкой температурой отжига. Длина продуктов для амплификации должна быть также сходной; большая разница в длине целевых ДНК будет способствовать амплификации более коротких целевых последовательностей в ущерб более длинным**, и это приведет к различному уровню выхода продуктов амплификации. В дополнение, буфер для мультиплексного ПЦР содержит добавки для Таq полимеразы, которые уменьшают конкуренцию между ампликонами и дискриминацию более длинных фрагментов ДНК в процессе мультиплексного ПЦР.

Продукты мультиплексного ПЦР можно впоследствии гибридизовать с ген-специфичными зондами для проверки.

2. ПЦР в реальном времени (Real-time PCR)

ПЦР в реальном времени (или количественная ПЦР, кПЦР, ПЦР-РВ, англ. Real-time PCR, qPCR) – лабораторный метод, основанный на классическом ПЦР, позволяющий определять не только присутствие целевой нуклеотидной последовательности в образце, но и измерять количество её копий.

Принципиальной особенностью реакции является мониторинг и количественный анализ накопления продуктов с применением флуоресцентных методов, а также автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов. Реакцию проводят в особом приборе, представляющем собой амплификатор, совмещенный с флуориметром. На сегодняшний день единственным препятствием широкого использования ПЦР в реальном времени является довольно высокая стоимость прибора.

Для количественной оценки ПЦР применяют либо флуоресцентные красители, интеркалирующие в двухцепочечные молекулы ДНК, либо модифицированные праймеры, которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК.

В качестве интеркалирующего красителя используют флуоресцентный цианиновый краситель SYBR Green I. Его добавляют в реакционную смесь, которая, в остальном, не будет принципиально отличаться от смеси стандартной ПЦР. Возрастание количества двухцепочечных продуктов ПЦР будет приводить к увеличению флуоресценции (рисунок 7.3).

Недостаток метода состоит в том, что краситель будет одинаково эффективно связываться как со специфичным ПЦР-продуктом, так и с неспецифичным. Кроме того, SYBR Green I с низкой эффективностью способен связываться с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами. Все это может приводить к снижению точности количественной оценки ПЦР.

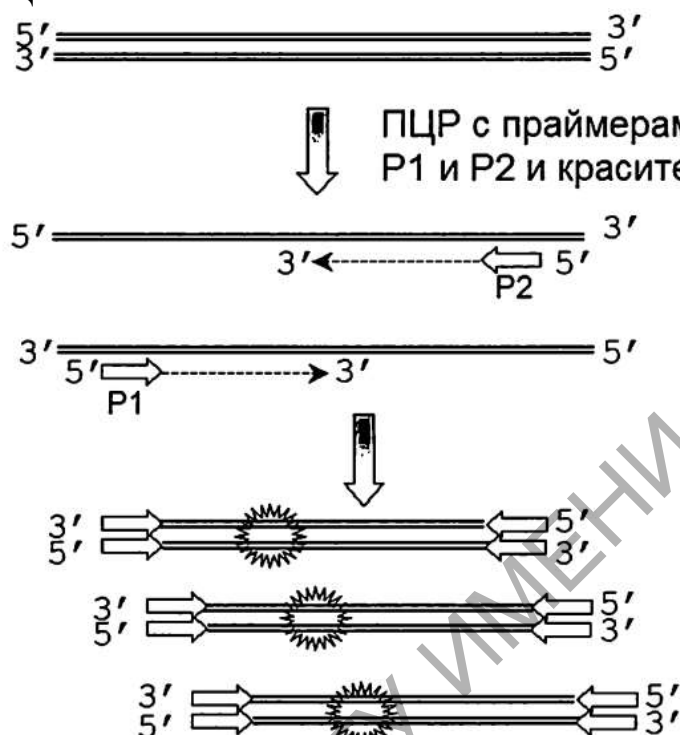


Рисунок 7.3 – ПЦР (qPCR) - метод с использованием интеркалирующего красителя

В методе с использованием репортерного праймера используют олигонуклеотид, который способен отжигаться внутри амплифицируемой последовательности ДНК. Его длина составляет 20-24 н., на 5'-конце он несет флуоресцентную группу, на 3'-конце - «гасящую» флуоресценцию группу. Меченый олигонуклеотид добавляют в ПЦР-смесь вместе со специфичными прямым и обратным праймерами. Он отжигается на одной из цепей ДНК параллельно с одним из специфичных праймеров (рисунок 7.4).

Когда флуоресцентная и гасящая группы находятся в составе праймера, любая эмиссия репортерной группы поглощается гасителем, и флуоресценция близка к нулю. На стадии синтеза Taq-полимераза, обладающая 5'-3'-экзонуклеазной активностью, отщепляет флуорофор. Будучи больше не связанным физически с гасителем, он начинает флуоресцировать.

Для повышения специфичности детекции вместо одного меченого праймера можно использовать сразу два. Праймеры подбирают

таким образом, чтобы они отжигались на одной из цепей последовательно на расстоянии 1-3 нуклеотида друг от друга, и метят флуорофорами: первый - на 3'-конце, второй - на 5'-конце. Принцип метода – перенос энергии от одного флуорофора, находящегося на 3'-конце первого праймера, ко второму флуорофору, находящемуся на 5'-конце второго праймера. При одновременном связывании обоих праймеров с ДНК матрицей испускаемое первым флуорофором излучение передается на второй флуорофор, а его излучение детектируется прибором. Таким образом, возрастает специфичность анализа. Основным недостатком методов с использованием репортерных праймеров, по сравнению с методами, использующими интеркалирующие красители, является их высокая стоимость.

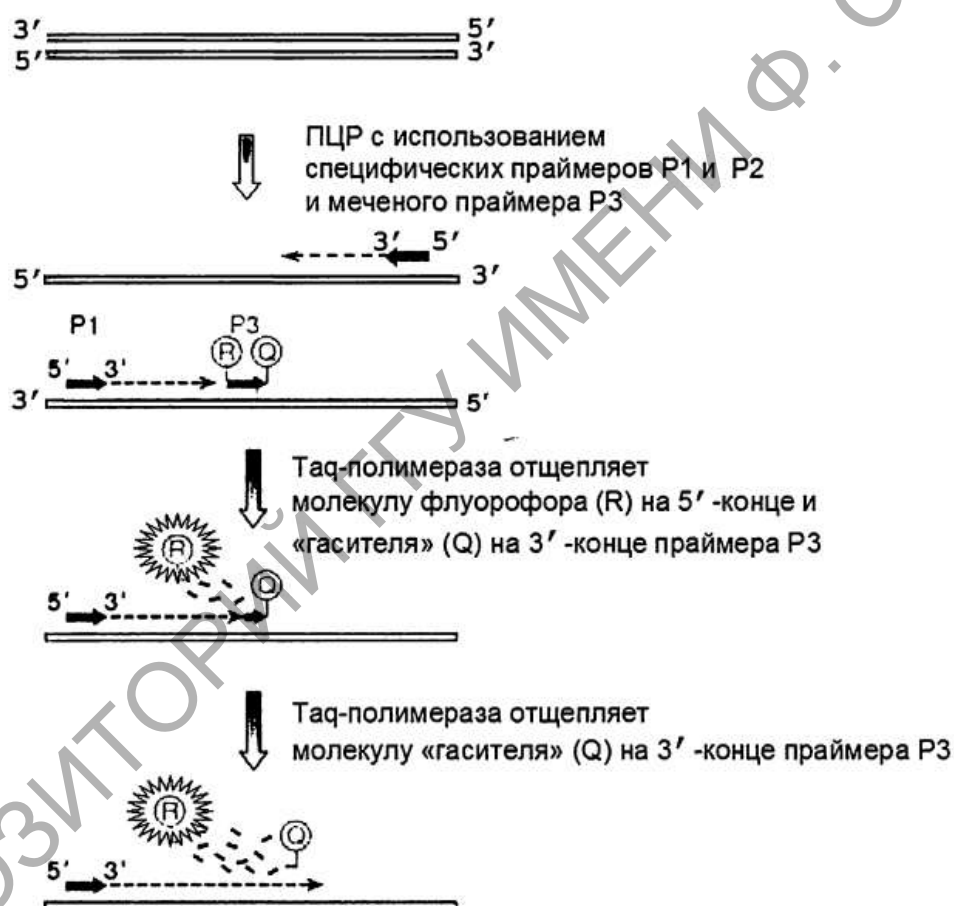


Рисунок 7.4 – ПЦР в реальном времени - метод с использованием репортерного праймера

Самое трудное в методе ПЦР в реальном времени – это интерпретация результатов. Высокая чувствительность метода даже к малейшим изменениям условий реакции приводит к искажениям результатов. Поэтому необходимо очень внимательно относиться к подбору условий и ставить эксперимент в нескольких повторах с хорошими контролями.

При оценке результатов ПЦР исходят из того, что через n циклов сигнал флуоресценции (F_n) в пробе должен быть с некоторым коэффициентом (k) пропорционален числу молекул ДНК (N^n): $F_n = kN^n$, или, учитывая эффективность (E): $F_n = kN_0(1+E)^n$, где N_0 - исходное количество молекул ДНК. Коэффициент k может отличаться в разных экспериментах и пробах. На коэффициент также влияют настройки приборов, параметры пробирок, точность разнесения реактивов по пробиркам и т.п.

Для сравнения графиков ПЦР часто используют пороговый метод - определение порогового цикла реакции C_t (threshold cycle), который задаёт точка пересечения графика накопления ДНК и пороговой линии. Величина C_t выражается в циклах ПЦР, когда количество ДНК в пробирке (и флуоресцентный сигнал) достигает одинаковой, обычно заданной пользователем, пороговой величины N_t . Сравнивая значения C_t можно судить о начальных концентрациях ДНК в исследуемых образцах. Чем меньше значение C_t , тем больше было ДНК в образце в начальный момент времени. Сравнительный анализ значений C_t проводят во время экспоненциальной фазы ПЦР. Очевидно, что на значения C_t большое влияние будет оказывать эффективность реакции. Эффективность реакции можно определить путем проведения ПЦР с последовательными десятикратными разведениями исследуемого образца. После реакции для каждого разведения определяют значение C_t . Затем строят калибровочную кривую.

Часто ПЦР в реальном времени используют для количественной оценки транскрипции генов в комбинации с методом обратной транскрипции. Считается, что при правильной постановке эксперимента метод ПЦР в реальном времени в несколько раз эффективнее Нозерн-блоттинга. При оценке экспрессии генов на уровне транскрипции используют внешние контроли – стабильно экспрессирующиеся в тестируемых условиях гены, например, гены рРНК или гены домашнего хозяйства глицеральдегиддегидрогеназы, β -актина, гистона 3 и др.). В опыте анализируют относительную экспрессию исследуемых генов, нормированную на экспрессию референсных генов. Однако к выбору референсного гена, от которого зависит трактовка результатов, необходимо относиться аккуратно и учитывать стабильность его транскрипции в тестируемых условиях.

3. Применение ПЦР

Метод ПЦР, в сочетании с другими молекулярными методами, представляет собой мощный инструмент генетического анализа. Благодаря простоте исполнения и доступности, ПЦР в ряде случаев

служит альтернативой молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот, а иногда даже заменяет ее.

Тестирование наличия мутации - ПДРФ-анализ

Метод ПЦР, как и Саузерн-блоттинг, можно применять в анализе полиморфизма длин рестриктивных фрагментов (ПДРФ). Допустим, аллель А содержит сайт рестрикции R, аллель а содержит мутацию, изменяющую сайт рестрикции, в результате чего рестриктаза R перестает его узнавать. Для выявления мутации у диплоидного организма амплифицируем фрагмент, включающий область мутации. Затем ПЦР-продукт обрабатываем рестриктазой R и образующиеся фрагменты разделяем в геле. Если исследуемый образец ДНК содержит два аллеля А, ПЦР-продукт расщепляется рестриктазой на два фрагмента. Если исследуемый образец ДНК содержит два аллеля а, ПЦР-продукт не расщепляется рестриктазой. В том случае, если исследуемый образец ДНК гетерозиготен, в геле будут присутствовать три фрагмента, поскольку один из фрагментов (А) будет расщепляться, а другой (а) - нет (рисунок 7.5).

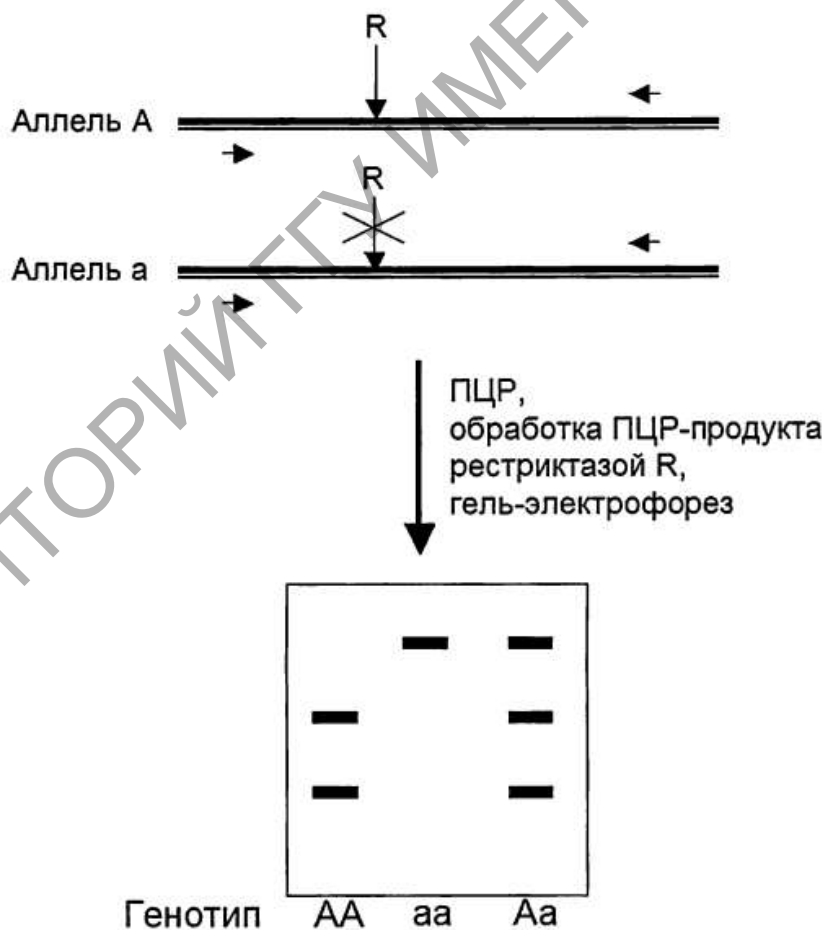


Рисунок 7.5 – ПДРФ-анализ

Тестирование наличия мутации - аллель-специфичная ПЦР

Метод применяют для выявления точечных мутаций, он служит альтернативой Саузерн-блоттингу с использованием аллель-специфичных зондов. В основе метода лежит особенность *Taq*-полимеразы (отсутствие 3'-5'-экзонуклеазной активности), не позволяющая ей синтезировать вторую цепь ДНК в случае некомплементарности последнего (3'-концевого) нуклеотида в удлиняемой цепи. Эту особенность используют для подбора аллель-специфичных праймеров. К тестируемому аллелю подбирают пару прямых праймеров с различными нуклеотидами на 3'-конце таким образом, чтобы с одного могла амплифицироваться последовательность без мутации, а с другого - с мутацией. Обратный праймер подбирают к не содержащему изменений в структуре ДНК участку аллеля.

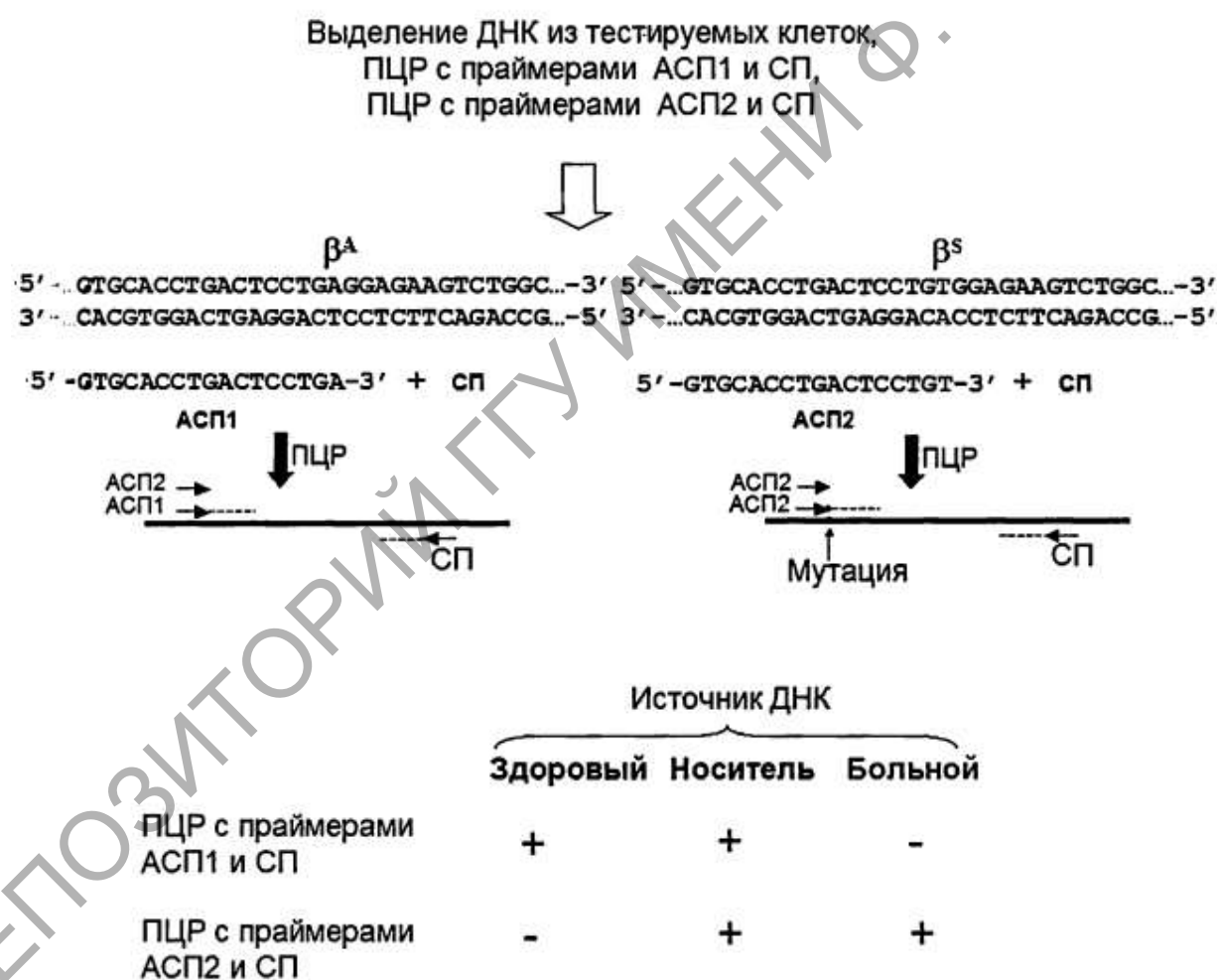


Рисунок 7.6 – Аллель-специфичная ПЦР

На рисунке 7.6 показан пример тестирования мутации в гене β -глобина. В данном случае подбираем к соответствующим аллелям β^A и β^S (аллель-специфичные праймеры АСП1 и АСП2). Затем тестируемую ДНК амплифицируем отдельно с парой праймеров АСП1 и СП (специфичным праймером - обратным праймером к неизменной об-

ласти гена) и с парой праймеров АСП2 и СП. В случае прохождения реакции только в первой пробе, делаем вывод об отсутствии мутации в гене β -глобина. В случае прохождения реакции только во второй пробе, делаем вывод об наличии мутации в гене β -глобина. Если реакция идет в обеих пробах, делаем вывод о гетерозиготности анализируемого индивида по этому гену (рисунок 7.6).

Введение модификаций и мутаций методом ПЦР

С помощью ПЦР можно вводить различные модификации и мутации в амплифицируемую последовательность ДНК. Изменения вводят в один или в оба праймера.

Для модификации концевых последовательностей ПЦР-продукта дополнительные нуклеотиды вводят на 5'-конец праймера так, чтобы хотя бы 10-15 нуклеотидов на 3'-конце были комплементарны матричной цепи. Так можно добавить к амплифицируемой последовательности небольшую репортерную группу или промотор (если амплифицируемая последовательность - это, ген без промотора), последовательность сайта рестрикции и т.п. На рисунке 7.7 показан способ введения промотора фага Т7 в амплифицируемую последовательность гена без промотора. Таким образом, транскрипция гена будет контролироваться Т7-РНК-полимеразой.

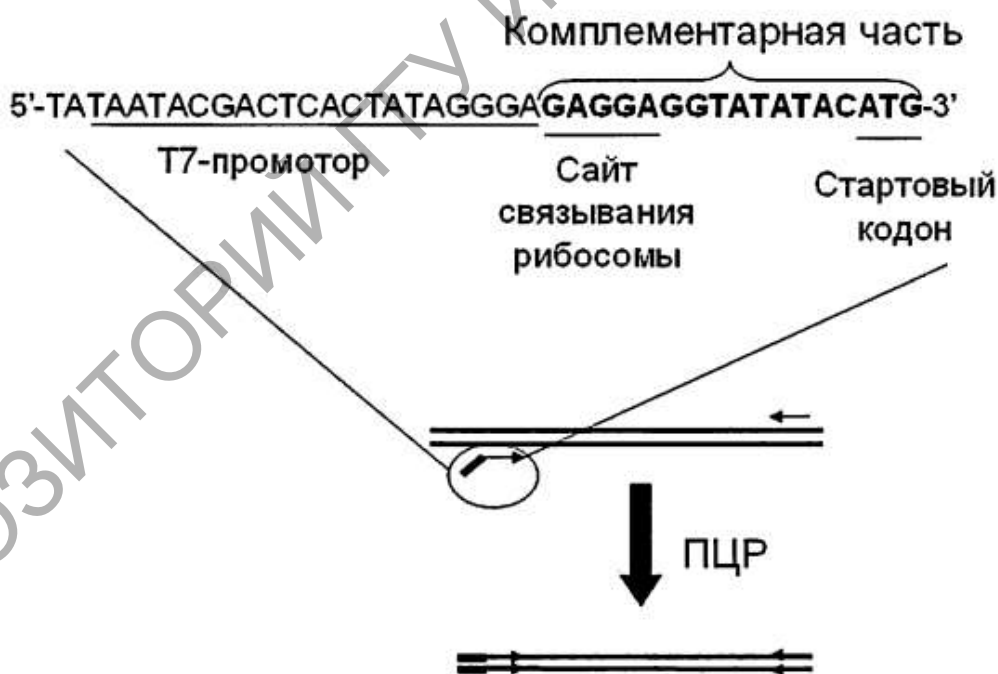


Рисунок 7.6 – Введение в последовательность ДНК промотора Т7 с использованием модифицированного праймера

На рисунке 7.7 рассмотрен пример модификации праймера в ПЦР, в результате которой в продукт будет введена замена кодона (Thr→Ser). Кроме того, продукт приобретает сайт рестрикции *XhoI*.



Рисунок 7.7 – Введение сайта рестрикции и замены кодона методом ПЦР

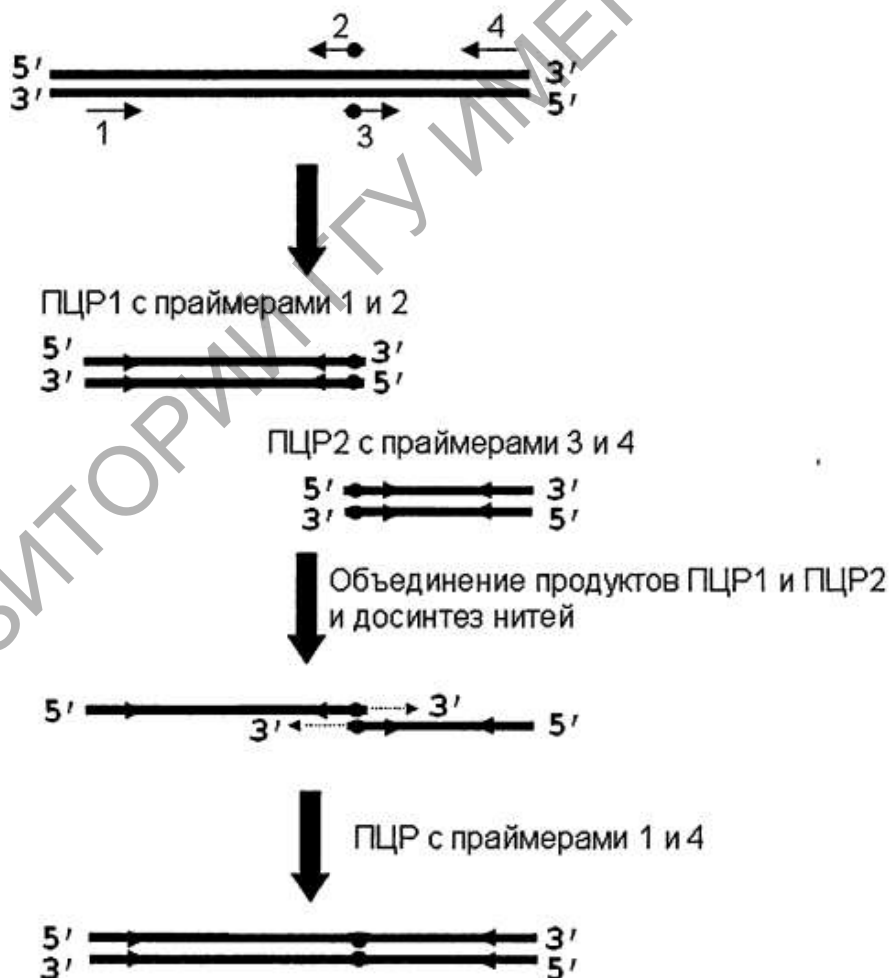


Рисунок 7.8 – Введение мутации в середину ПЦР-продукта

С помощью комбинированной реакции ПЦР мутации можно вводить не только на концах ПЦР-продукта, но и в его середину. Для этого подбираем две пары праймеров. Один праймер из пары – к концу фрагмента, а другой - к той части, которая будет содержать мутацию (рисунок 7.8). Неспаренное основание (или основания) должно находиться ближе к 5-концу праймера. Последовательности праймеров, содержащих неспаренный нуклеотид (праймеры 2 и 3), должны перекрываться минимум на 10-15 н. Эти перекрывающиеся последовательности будут служить затравками для синтеза полноразмерного продукта.

Литература:

1. Сингер, М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг. – М.: Мир, 1998. – 391 с.
2. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.
3. Hartwell, L.H. Genetics: From Genes to Genomes / L.H. Hartwell [et al.]. – New York: McGraw-Hill, 2011. – 817 p.
4. Newton, C.R. PCR / C.R. Newton, A. Graham // Oxford: Bios Scientific Publishers. - 1996. P.18 - 9.
5. Saiki, R.K. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia / R.K. Saiki, S.J. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, N. Arnheim // Science, 1985. – Vol. 230. – P. 1350.
6. Mullis, K.B. Specific synthesis of DNA in vitro a Polymerase Catalysed Chain Reaction / K.B. Mullis, F.A. Faloona // Method in Enzymol. – 1987. – Vol. 155. – P. 335-349.
7. Sharrocks, A.D. The design of primers for PCR / A.D. Sharrocks // In: Griffin, H.G. and Griffin, A.M (Eds.) PCR Technology: Current Innovations. London: CRC Press, 1994. – P. 5-11.
8. Нефедова, Л.Н. Применение молекулярных методов исследования в генетике / Л.Н. Нефедова. – М.: ИНФРА-М, 2013. –104 с.

ЛЕКЦИЯ 8. МЕТОДЫ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. Секвенирование по Сэнгеру и Максому-Гилберту
2. Автоматическое секвенирование
3. Анализ больших последовательностей ДНК

1. Секвенирование по Сэнгеру и Максому-Гилберту

Первый прямой метод определения последовательности ДНК был предложен Ф. Сэнгером в 1975 г. Он основан на элонгации ДНК при помощи фермента ДНК-полимеразы. Этим способом была быстро секвенирована короткая ДНК фага $\phi\chi 174$, длиной 5,4 кб.

Первоначально Ф. Сэнгер и А. Коулсон разработали так называемый «плюс-минус» метод секвенирования ДНК (рисунок 8.1), который можно подразделить на две основных стадии.

На первом этапе проводится полимеразная цепная реакция. Для проведения используется ДНК (например, ДНК человека), фермент – ДНК-полимераза /фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы I, олигонуклеотидные праймеры и смесь четырех дезоксинуклеотидов (dNTPs) (А, Т, G и С), причем один из дезоксинуклеотидов радиоактивно помечен по α -положению фосфата (^{32}P).

На втором этапе происходит очистка смеси амплифицированных фрагментов от дезоксинуклеозидтрифосфатов, не вступивших в реакцию (например, на колонках). Смесь делится на восемь равных частей (в разных пробирках). В «плюс»-системе проводится четыре ПЦР-реакции в присутствии каждого из четырех типов дезоксинуклеозидтрифосфатов; параллельно в «минус»-системе проводится четыре ПЦР-реакции в отсутствии каждого из них. Далее результаты визуализируются с помощью электрофореза, и определяется последовательность ДНК, исходя из того, что в «плюс»-системе терминация ПЦР происходит после конкретного dNTP, а в «минус»-системе — перед ним (рисунок 8.1).

Столь же мощный метод секвенирования ДНК был разработан А. Максом и У. Гилбертом в 1977 г. в Гарвардском университете. С его помощью менее чем за год удалось установить последовательность ДНК для вируса sv-40 (5,2 кб) и плазмиды pBR322 (4,3 кб).

Метод секвенирования ДНК по Максому-Гилберту (рисунок 8.2) заключается в следующем. Один из концов фрагмента ДНК, последовательность которого нужно прочесть (секвенировать) метят с помощью ^{32}P . Препарат меченой ДНК делят на четыре порции и

каждую из них обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно из четырех оснований ДНК.

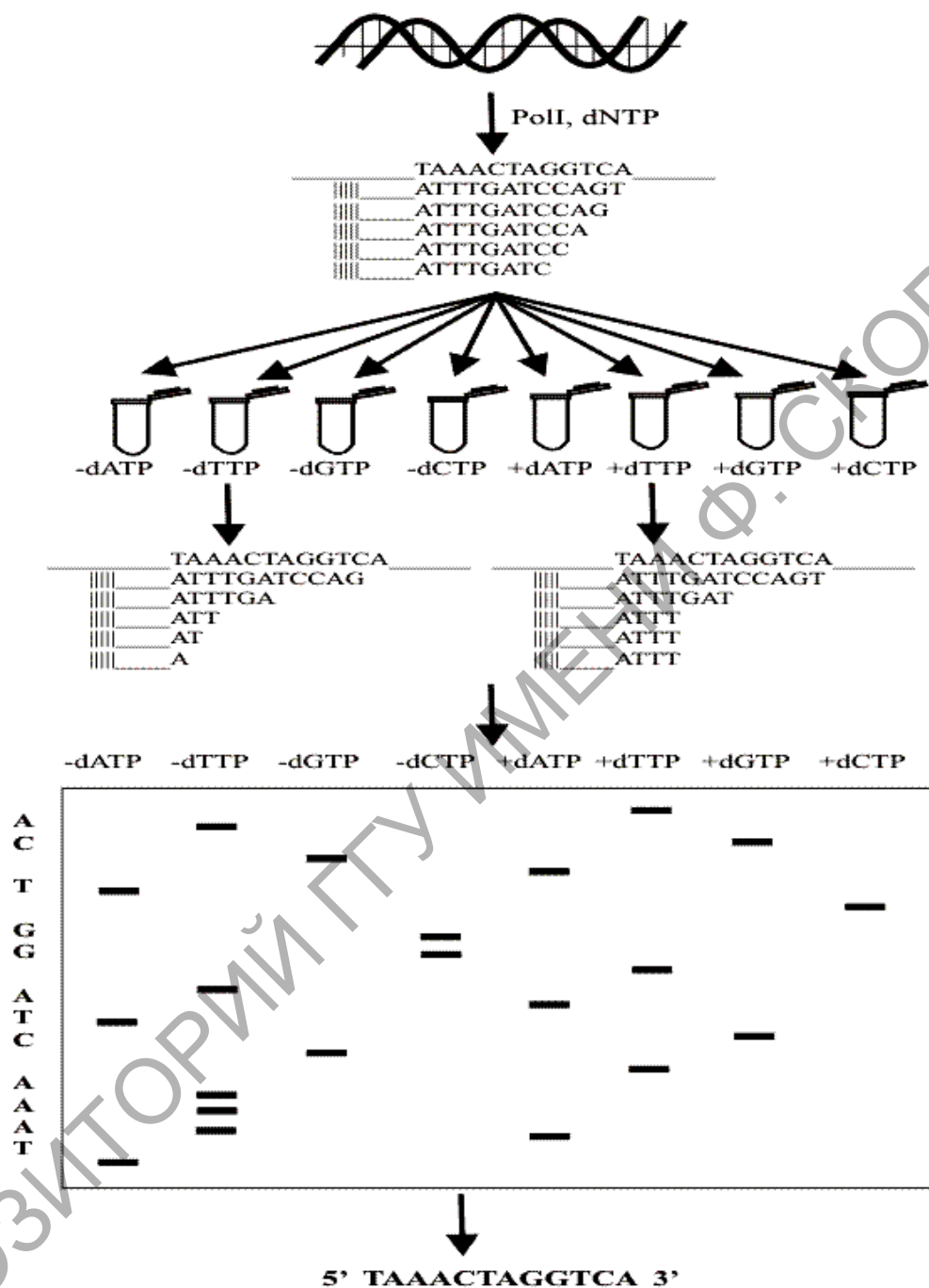


Рисунок 8.1 – Схема «плюс-минус» метода Сэнгера

Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений. Когда эти повреждённые молекулы обрабатывают пиперидином, в ДНК образуется разрыв в том месте, где находилось разрушенное основание. В результате получается **набор меченых фрагментов**, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца мо-

лекулы. Например, если остатки Г находятся на расстоянии 2, 5, 8 и 13 нуклеотидов от меченого конца, как в случае, рассмотренном на рисунке слева, то обработка данной цепи ДНК реагентами, разрушающими Г, приведёт к образованию меченых фрагментов длиной 2, 5, 8 и 13 нуклеотидов (при этом, естественно образуются еще и фрагменты длиной 2 и 4 нуклеотида, но эти фрагменты, расположенные между остатками Г будут не мечеными). Наборы меченых фрагментов, образующихся при каждой из четырёх реакций, подвергают электрофорезу в соседних дорожках полиакриламидного геля, при этом происходит разделение фрагментов ДНК в соответствии с их размерами. Затем проводят радиоавтографию геля. Набор полос, регистрируемых на рентгеновской плёнке, «**читают**», определяя таким образом **нуклеотидную последовательность ДНК**. Так в примере, представленном на рисунке 8.2 последовательность цепочки ДНК от меченого конца будет следующая ТАГТЦГЦАГТАЦЦТА.

Спустя пару лет Ф. Сэнгер с коллегами предложил еще один способ секвенирования, получивший название метода «терминаторов» или метода «обрыва цепи». Суть этого метода заключается в том, что в реакционную смесь добавляются аналоги привычных нуклеотидов (дидезоксинуклеозидтрифосфаты), включение которых в синтезируемую цепь приводит к невозможности ее дальнейшего синтеза (терминации), а по образовавшемуся “обрыву” можно установить последний нуклеотид секвенируемого фрагмента ДНК (рисунок 8.2).

2. Автоматическое секвенирование

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

Автоматизация процесса секвенирования была проведена в **1986 году Лерроем Худом**. Был усовершенствован метод Сэнгера и вместо радиоактивных меток при анализе последовательностей ДНК стал использовать **флюорисцентные красители** разного цвета для четырех дидезоксинуклеотидов - ddNTP (рисунки 8.3 и 8.4).

Флюорисцентный анализ позволил все четыре смеси электрофорезировать вместе, что дало возможность определять последовательность ДНК автоматически и выводить результат на экран компьютера.

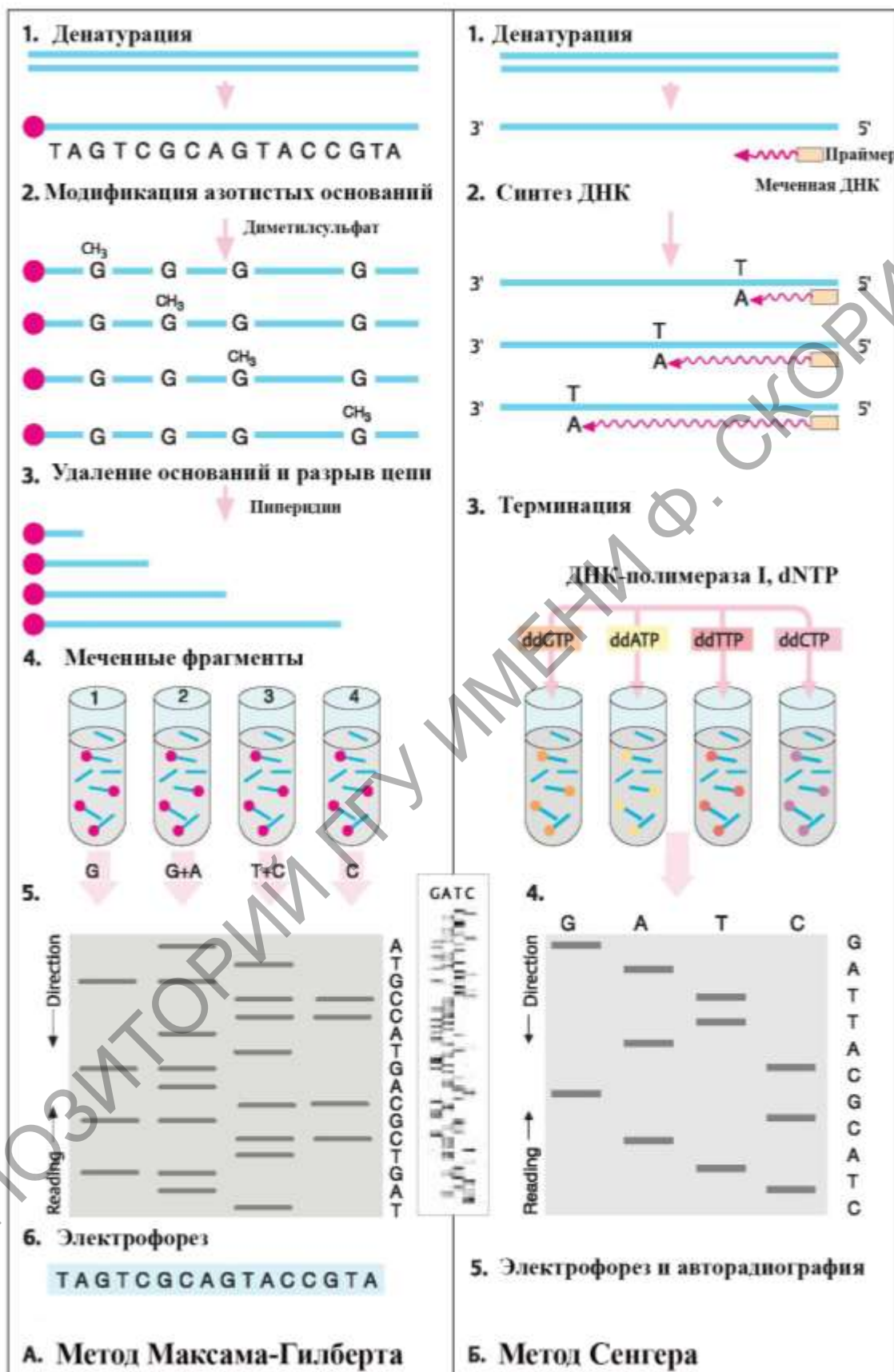


Рисунок 8.2 – Общая схема секвенирования по Максиму-Гилберту (А) и Сэнгеру (методом «терминаторов») (Б)

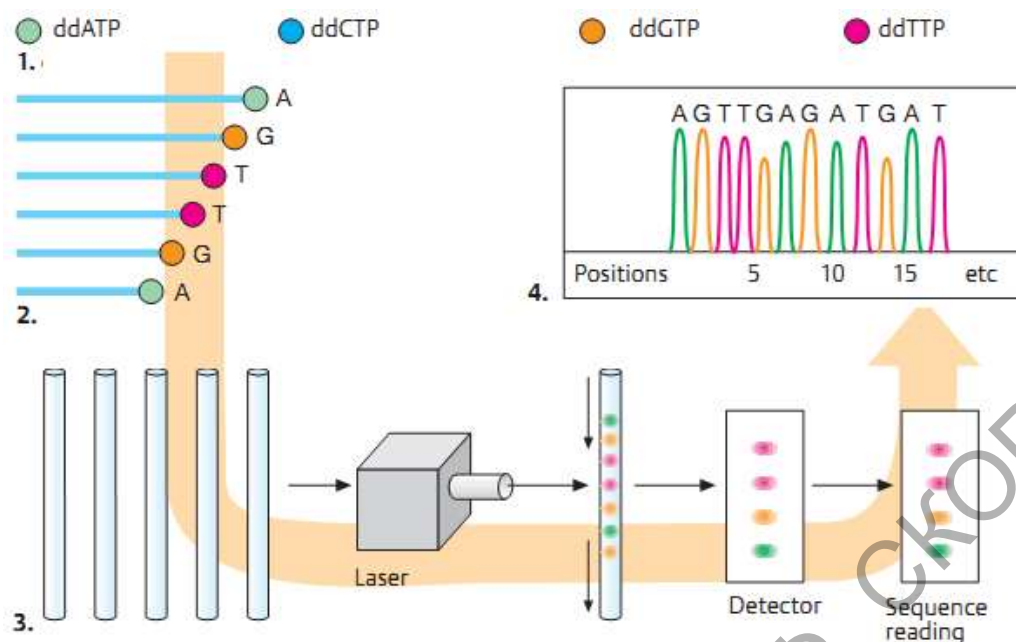


Рисунок 8.3 – Схема автоматического секвенирования

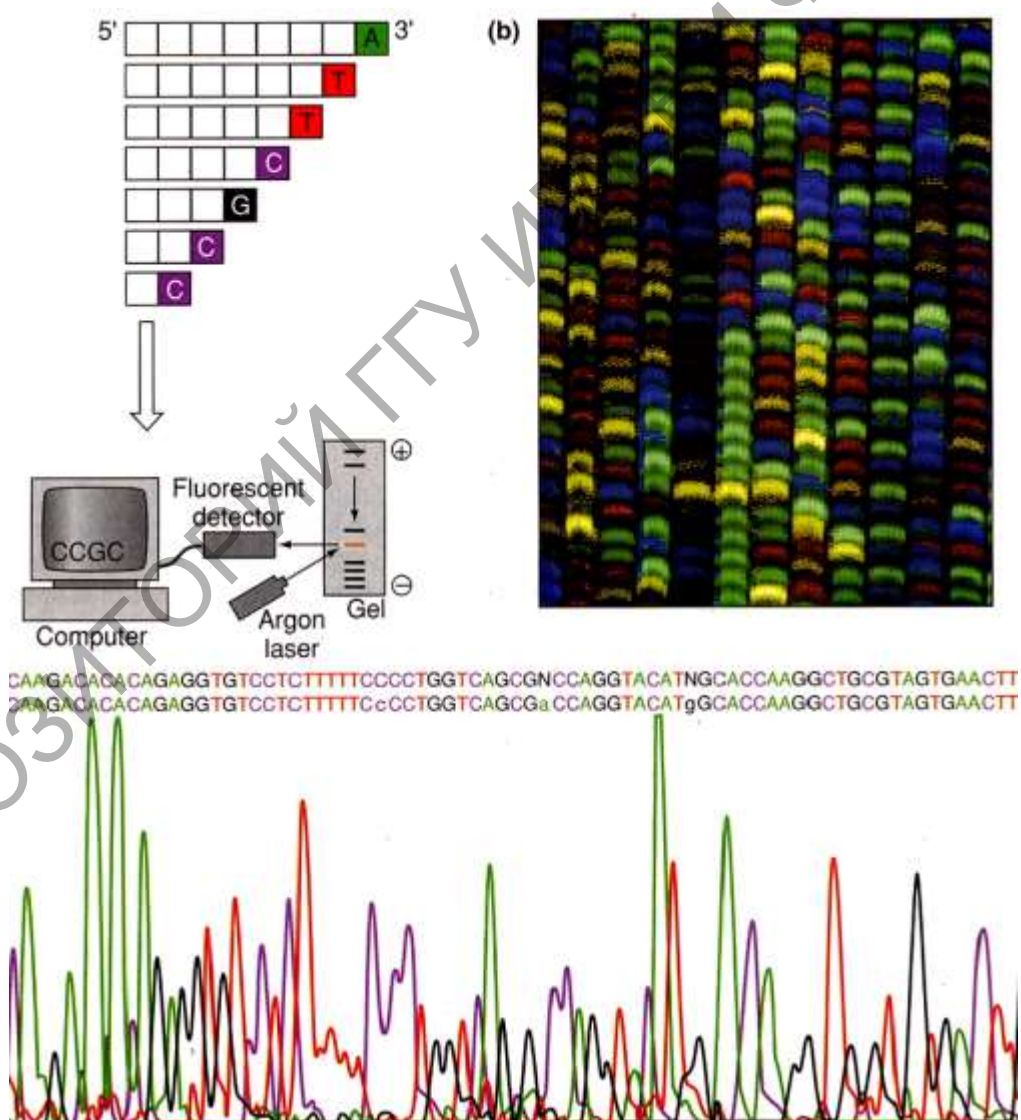


Рисунок 8.4 – Компьютерное отображение автоматического секвенирования

В основу автоматического секвенирования заложен уже упоминавшийся метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих ddNTP (*). 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 полиакриламидном геле (ПААГ), получение спектра эмиссии флуорофоров и последующая обработка собранных данных. Таким образом, автоматическое секвенирование отличается от современного ему ручного секвенирования только типом используемой метки.

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(й) на одной дорожке.

Полимеразы, используемые при секвенировании ДНК

В оригинальной работе Ф. Сэнгера для проведения секвенирования был использован Кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I из *E. coli*. В настоящее время для секвенирования используют рекомбинантные ДНК-полимеразы, отвечающие следующим требованиям: отсутствие 3'- и 5'-экзонуклеазной активности, отсутствие дискриминации по включению в растущую цепь как обычных, так и модифицированных (меченных) ddNTP. Выбор конкретной полимеразы зависит от условий проведения секвенирования. Всего существует два разных подхода. В первом случае копирование осуществляется при 37°C высокопроцессивными термолабильными полимеразми (например, T7 DNA polymerase - Sequenase v1.0 и v2.0, Amersham Pharmacia Biotech). Во втором - реализуется циклический процесс, который включает денатурацию, отжиг и элонгацию, и предполагает использование термостабильных полимераз (например, Thermo Sequenase™, Amersham Pharmacia Biotech и AmpliTaq FS™, PE Biosystems).

Секвенаторы

Современные секвенаторы можно разделить на 2 типа в зависимости от технологии, лежащей в основе принципа работы приборов:

1. «капиллярные» (или «классические», «сэнгеровские») секвенаторы, в которых расшифровка нуклеотидной последовательности ДНК идёт после проведения реакции секвенирования;

2. «полногеномные» секвенаторы или секвенаторы второго поколения, NGS (Next Generation Sequencing) в которых расшифровка генома идёт непосредственно в ходе реакции секвенирования.

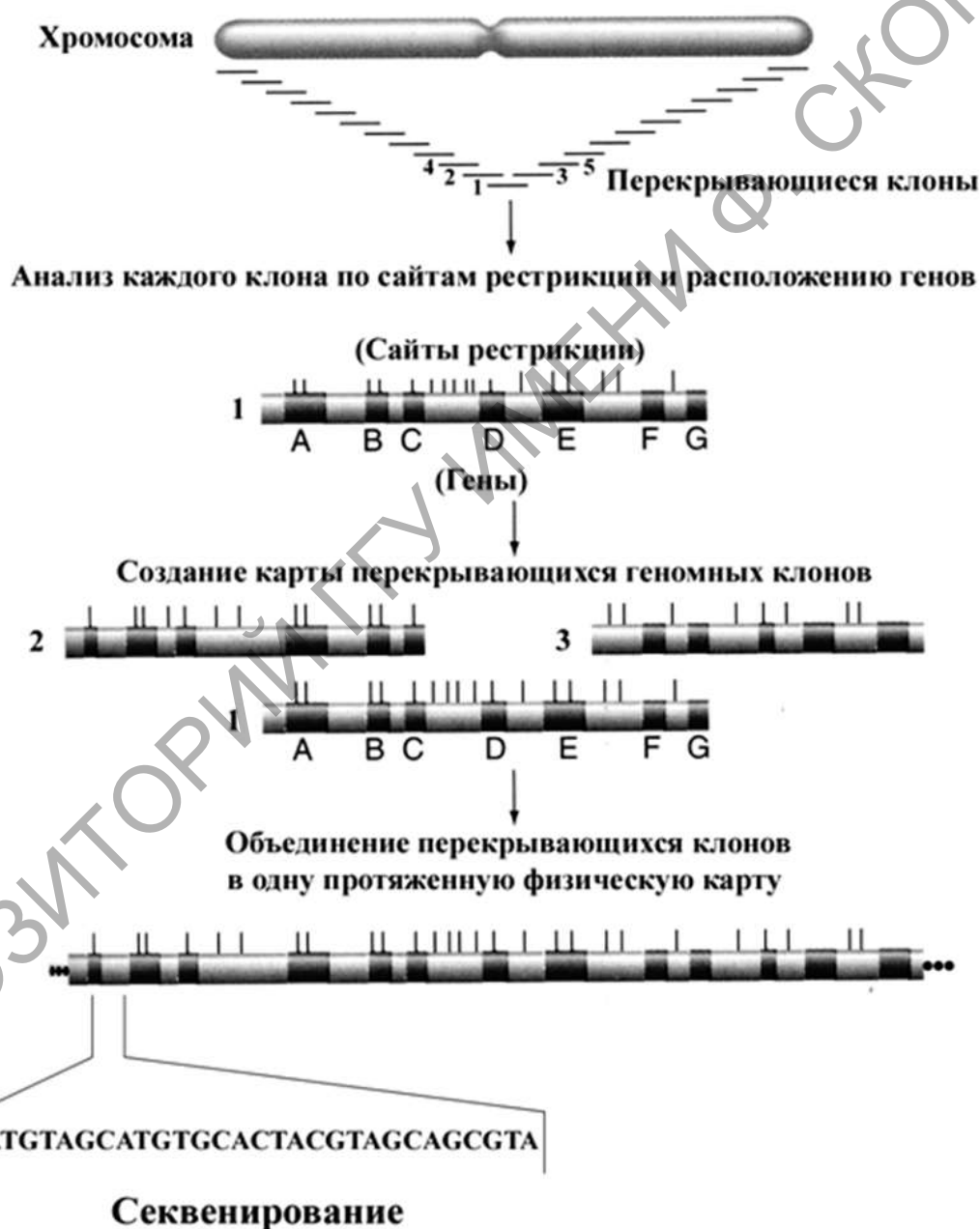


Рисунок 8.5 – Этапы анализа перекрывающихся клонов, создание физической карты молекулярных маркеров по длине хромосомы и секвенирование клонов для составления последовательности ДНК всей хромосомы

3. Анализ больших последовательностей ДНК

Для секвенирования больших фрагментов ДНК (более 1 тыс. н.п.), требуется предварительная разработка стратегии секвенирования. Она сводится к **выбору метода секвенирования, способа фрагментации ДНК и способа восстановления полной последовательности нуклеотидов** в анализируемом фрагменте.

Существуют 2 стратегии секвенирования – **направленный** (рисунок 8.5) и **случайный (shot-gun) анализ** (рисунок 8.6). В обоих подходах большую нуклеотидную последовательность расщепляют на более мелкие фрагменты и их секвенируют. В первом случае очередность фрагментов должна быть известна, а во втором – нет.

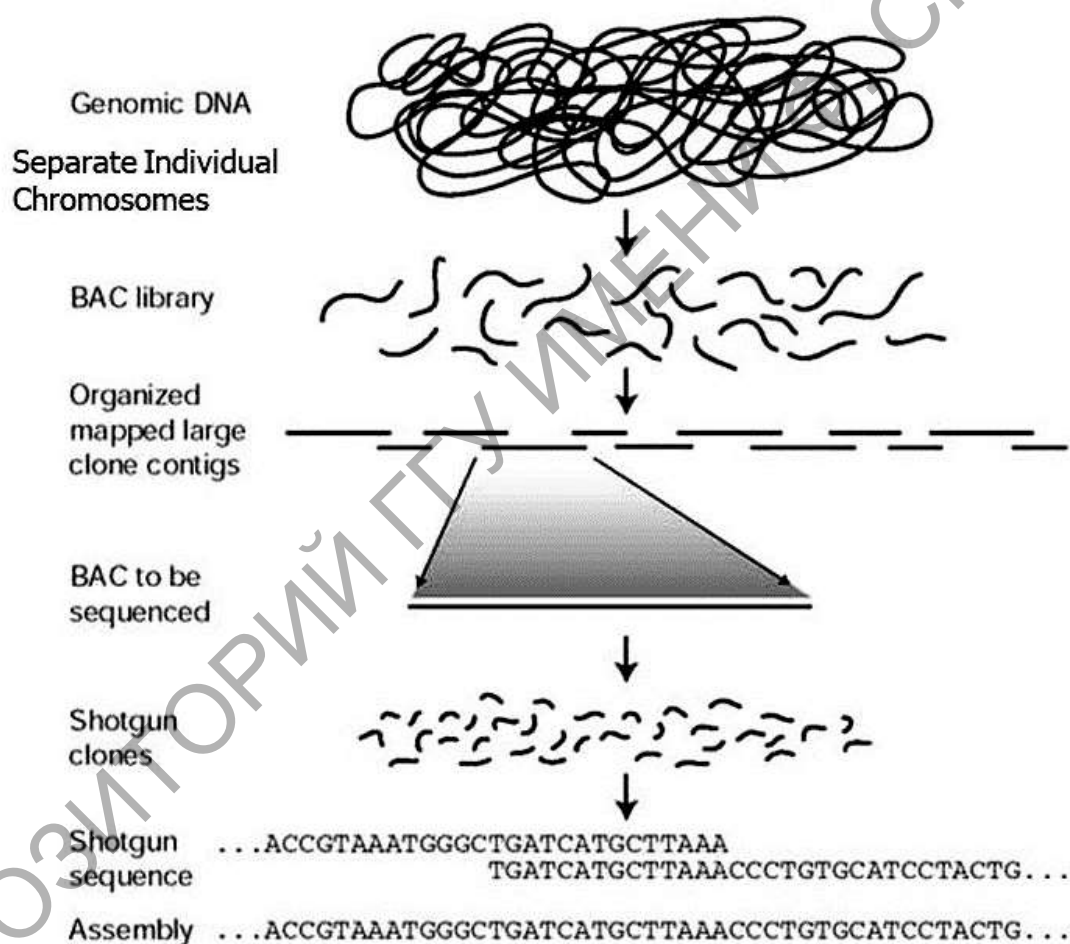


Рисунок 8.6 – Схема анализа секвенированных фрагментов ДНК методом дробовика

В случае направленного анализа вначале составляют физическую (рестрикционную) карту анализируемой области, т.е. определяют взаимное расположение сайтов узнавания различных рестриктаз и примерное расстояние между ними. Затем на основании полученных

данных подбирают комбинацию рестриктаз для образования таких фрагментов, которые имели определенный размер и перекрывали всю исследуемую область. Эти фрагменты секвенируют, после чего восстанавливают полную нуклеотидную последовательность области, пользуясь рестрикционной картой.

Первая стратегия определения нуклеотидных последовательностей в генах, составляющих геном получила название **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 8.6.

При использовании второго метода, названного **методом дробовика или «шот-ган» (shotgun)** клоны из геномных библиотек отбираются случайным образом.

В отобранных клонах 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, удастся 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.

Литература:

1. Сингер, М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг. – М.: Мир, 1998. – 391 с.
2. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.

3. Hartwell, L.H. Genetics: From Genes to Genomes / L.H. Hartwell [et al.]. – New York: McGraw-Hill, 2011. – 817 p.

4. Sanger, F. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase / F. Sanger, A.R. Coulson // J. Mol. Biol., 1975. – Vol. 94. – P. 441–448.

5. Maxam, A.M. A new method for sequencing DNA / A.M. Maxam, W. Gilbert // Proc. Natl. Acad. Sci. – USA, 1977. – Vol. 74. – P. 560-564.

6. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis / L.M. Smith, [et al.] // Nature, 1986. – Vol. 321. – P. 674–679.

7. Passarge, E. Color Atlas of Genetics / E. Passarge. – Thieme: Stuttgart - New York, 2001. – 457p.

ЛЕКЦИЯ 9. ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В МЕДИЦИНЕ

1. ДНК-диагностика вирусных заболеваний
2. ДНК-диагностика бактериальных заболеваний
3. ДНК-диагностика инвазий

1. ДНК-диагностика вирусных заболеваний

Особо актуальным примером успешного применения технологии молекулярно-генетической идентификации в медицине является заболевание COVID-19, вызываемого коронавирусом SARS-CoV-2. Точная диагностика данного коронавирусного заболевания традиционными методами требует существенных временных и материальных затрат. При-чем диагностика заболевания происходит, когда пациент явно болен и инфекция уже существенно проникла в дыхательную систему организма.

В то же время, вследствие большой способности коронавируса SARS-CoV-2 передаваться от человека к человеку при отсутствии явных симптомов, необходимо было разработать метод обнаружения коронавируса, для того чтобы быстро и точно диагностировать его у людей не проявляющих внешних признаков болезни.

Фармацевтические компании и научные лаборатории министерств здравоохранения развитых стран в кратчайшие сроки разработали высокотехнологичные молекулярно-генетические методы ПЦР-диагностики коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале человека. Однако во многих доступных в продаже наборах для ПЦР-диагностики SARS-CoV-2 нет открытой информации о точной последовательности ДНК-праймеров, которые в них содержатся, что делает невозможным проверить и подтвердить чувствительность и надежность каждого комплекта.

Характеристика генома коронавируса SARS-CoV-2. Коронавирусы MERS-CoV, SARS-CoV и его модификации (штаммы), в том числе SARS-CoV-2, относятся к роду *Betacoronavirus* из семейства *Coronaviridae*. Все представители этого семейства являются одноцепочечными РНК-содержащими, причем в их геномах РНК всегда в форме РНК (+), т.е. 5' – 3' и следовательно, эти вирусы относятся по Балтимору к IV группе.

Вирионная геномная РНК SARS-CoV-2 представляет собой одноцепочечную молекулу 5'-РНК-3' (РНК+), размером около 30 кб (30 000 нуклеотидов), которая на 5'-конце имеет метилированный гу-

анин (кэп), а на 3'-конце полиА-хвост, подобно эукариотическим мРНК. Это «дезинформирует», инфицируемые вирусом эукариотические клетки человека и они начинают синтезировать на своих рибосомах, но по матрице коронавирусной РНК+ чужеродные для себя белки SARS-CoV-2.

На рисунке 1 представлено схематическое изображение структуры коронавируса SARS-CoV-2, показывающее основные вирусные белки, их названия и локализацию. На поверхности коронавируса хорошо видны так называемые спайковые белки S (шипы), формирующие как бы корону SARS-CoV-2 (рис. 1). Именно с помощью этих S шипов коронавирус прикрепляется к мембранам эпителиальных клеток человека и проникает в их цитоплазму. Хорошо видно, что спайковые S-белки прикреплены к вирусной мембране, в состав которой входят мембранные белки M и конвертные белки E.

Геномная РНК+ SARS-CoV-2 расположена внутри коронавируса, в виде одноцепочечной молекулы 5' – 3' и скреплена с нуклеокапсидным белком N. В самом центре вирусной частицы показано наличие важного коронавирусного фермента РНК-зависимой РНК полимеразы (RdRP) (рис.1).

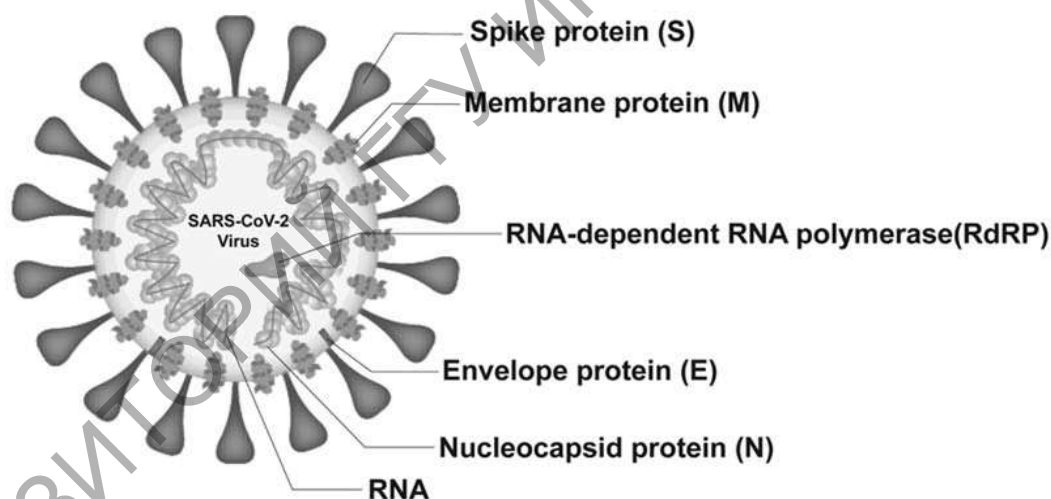


Рисунок 1 – Схематическое изображение структуры коронавируса SARS-CoV-2, показывающее основные вирусные белки, их названия и локализацию [1].

Генетическая карта генома SARS-CoV-2 с обозначением основных вирусных генов, их размеров и порядка расположения представлена на рисунке 2. Гены, кодирующие основные структурные белки коронавируса, расположены в правой части генома SARS-CoV-2.

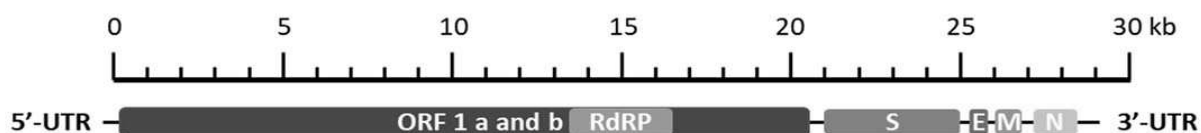


Рисунок 2 – Генетическая карта SARS-CoV-2 с обозначением основных вирусных генов, их размеров и порядка расположения [1].

Необходимо подчеркнуть, что геном коронавируса SARS-CoV-2 является относительно небольшим, нуклеотидная последовательность всех его генов давно установлена и в целом составляет 29 903 нуклеотида. Огромную роль в исследовании коронавирусов SARS-CoV, MERS и SARS-CoV-2 внесли молекулярные генетики под руководством профессора Ральфа Барика (Ralf Baric) из университета Северной Каролины и его ученицы (аспирантки) Ши Женли (Shi Zhengli), которая вернулась в Китай и возглавила молекулярно-генетическую лабораторию в институте вирусологии в Ухане [2] – [5]. Именно в китайском Ухане в конце 2019 года появились первые пациенты заболевшие COVID-19, вызываемые новым коронавирусом, получившим название 2019-nCoV, а позднее SARS-CoV-2 [6]. В международной базе данных GISAID [7] уже к осени 2020 года были представлены более 40 тысяч секвенированных геномов SARS-CoV-2 у людей с заболеванием. База сиквенсов SARS-CoV-2 постоянно пополняется, и это позволяет анализировать и отслеживать возникновение и скорость распространение возникающих *de novo* мутаций.

В работе китайских генетиков посвященных анализу мутаций у вируса SARS-CoV, вызвавшего заболевания атипичной пневмонии в Китае в 2003 году было показано, что скорость мутаций составила в среднем $\approx 1,5 \cdot 10^{-3}$ на нуклеотид в год [8]. По данным полученным итальянскими исследователями, касающимися мутабельности коронавируса SARS-CoV-2, на первую половину 2020 года она составила $\approx 6,5 \cdot 10^{-3}$ на нуклеотид в год, что несколько выше, чем у SARS-CoV [9].

ПЦР-диагностика генетического материала SARS-CoV-2. Тест на наличие вируса в биологическом материале пациента проводится на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), разработанной еще в 90-е годы XX столетия молекулярным генетиком Кэрри Мюллисом [10]. Суть метода состоит в том, что, на основе пары сконструированных коротких фрагментов ДНК (ДНК-праймеров), комплементарных конкретному участку определенного гена, можно ам-

плифицировать (размножить) данный участок гена и затем диагностировать его видовую принадлежность.

Поскольку генетическим материалом SARS-CoV-2 является РНК+, то после ее выделения из вируса нужно преобразовать РНК+ в комплементарную ей двухцепочечную молекулу ДНК (кДНК), необходимую для ПЦР-анализа. Эта процедура проводится с помощью двух специальных ферментов *обратная транскриптаза* и *ДНК полимеразы I*. Именно на фрагменты полученной двухцепочечной молекулы кДНК SARS-CoV-2 *конструируется пара праймеров* для ПЦР-амплификации конкретных участков ДНК целевых генов, с последующей видовой идентификацией этих участков на принадлежность к коронавирусу SARS-CoV-2.

При конструировании праймеров важно учитывать их длину, комплементарность выбранному участку ДНК, температуру плавления, соотношение G/C пар. Одним из важных параметров для успешной амплификации является правильно подобранная *концентрация праймеров*, поскольку в ходе ПЦР-реакции часто происходит димеризация и гетеромиризация праймеров, а также их конкуренция за ДНК-полимеразы и дезоксинуклеотидтрифосфаты (dNTPs). Неоптимизированные комплекты праймеров могут произвольно давать ложноположительные результаты, что было показано в исследовании нескольких молекулярно-генетических лабораторий [1], [11]. Имеется сообщение о некорректных результатах в более 70% случаев, как произошло в Чехии, при использовании, закупленных зарубежных тестов [12]. Следовательно, компетентная проверка на валидность и тестирование коммерческих ПЦР-наборов, в особенности ДНК-праймеров является крайне актуальной. В этой связи, закупка зарубежных ПЦР тест-систем для идентификации коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале пациентов *должна осуществляться только при наличии информации о структуре используемых в наборе праймеров*.

Конструирование ДНК праймеров для ПЦР идентификации гена S белка SARS-CoV-2. Геном коронавируса SARS-CoV-2 содержит 10 генов и насчитывает 29 903 нуклеотида. Величина S гена кодирующего спайковый белок по результатам сиквенса в базе NCBI [13], составляет 3821 нуклеотид и на карте генома SARS-CoV-2 он локализован в промежутке от 21563 нуклеотида до 25384 нуклеотида [13].

На рисунке 3 представлена нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК гена S белка SARS-CoV-2 величиной 600 нуклеотидов от 23881 до 24480 нуклеотида [13], с указанием места прикрепле-

ния сконструированной пары праймеров (выделено жирным шрифтом). Сконструированная оптимальная пара праймеров, позволяет амплифицировать фрагмент ДНК гена S белка с фланкирующими участками величиной 291 нуклеотидная пара.

Структуры прямого и обратного праймеров приведены ниже:

Прямой: 5'- GAGATGCTGGCTTCATCAAA- 3'

Обратный: 5'- GGTGGCAATCAATTTTGG - 3'

```

23881 acaagacaaa aacacccaag aagtttttgc acaagtcaaa caaatattaca aaacaccacc
23941 aattaaagat tttggtggtt ttaatttttc acaaataatta ccagatccat caaaaccaag
24001 caagaggtca tttattgaag atctactttt caacaaagtg acacttgcag atgctggctt
24061 catcaaacaa tatggtgatt gccttggtga tattgctgct agagacctca tttgtgcaca
24121 aaagtttaac ggccttactg ttttgccacc tttgtgcaca gatgaaatga ttgctcaata
24181 cacttctgca ctgttagcgg gtacaatcac ttctggttgg accttgggtg cagggtgctgc
24241 attacaaata ccatttgcta tgcaaatggc ttataggttt aatggtattg gagttacaca
24301 gaatgttctc tatgagaacc aaaaattgat tgccaacca tttaatagtg ctattggcaa
24361 aattcaagac tcactttctt ccacagcaag tgcacttggg aaacttcaag atgtggtcaa
24421 ccaaaatgca caagctttaa acacgcttgt taaacaactt agctccaatt ttggtgcaat

```

Рисунок 3 – Нуклеотидная последовательность фрагмента гена S белка SARS-CoV-2 от 23881 до 24480 нуклеотида

Электрофоретическое фракционирование на предмет видовой идентификации полученного фрагмента ДНК проводилось в агарозном геле стандартными методами [14], [15]. На электрофореграмме (рисунок 4), демонстрирующей спектр фрагмента ДНК S гена, полученного после ПЦР-амплификации с праймерами приведенными выше хорошо видно, что в образцах 1, 3 величина электрофоретических фракций составляет около 300 нуклеотидных пар. Иными словами размер, полученных фрагментов ДНК практически совпадет с ожидаемой величиной в 291 нуклеотидную пару и однозначно указывает на их принадлежность именно к гену S белка SARS-CoV-2. Если в анализируемом биологическом материале человека отсутствует коронавирусная матрица кДНК, то сконструированные праймеры не присоединятся к матрице и соответственно никакой участок ДНК не будет амплифицирован и в этом случае на электрофореграмме фракции ДНК будут также отсутствовать, как в образцах 2, 4 и 6 (рисунок 4).

Конструирование ДНК праймеров для ПЦР идентификации гена N белка SARS-CoV-2. Величина другого гена SARS-CoV-2, который кодирует N белок по результатам сиквенса в базе NCBI [13], составляет 1259 нуклеотидов и на карте генома SARS-CoV-2 он расположен в районе от 28274 нуклеотида до 29533 нуклеотида [13].

На рисунке 5 представлена нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК SARS-CoV-2 величиной 600 нуклеотидов от 28981 до 29580 нуклеотида [13], с указанием места прикрепления сконструированной пары праймеров (выделено жирным шрифтом). Сконструиро-

ванная пара позволяет амплифицировать фрагмент гена N белка с фланкирующими участками величиной 399 нуклеотидных пар.

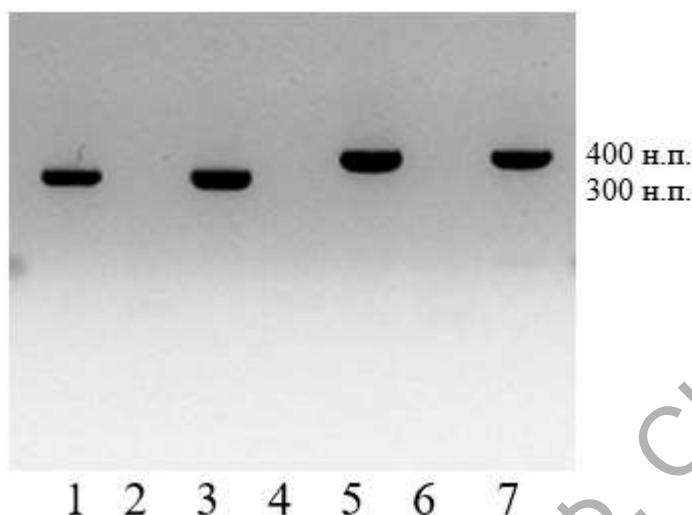


Рисунок 4 – Электрофореграмма демонстрирующая спектры фрагментов ДНК гена S белка и N белка SARS-CoV-2, полученных после ПЦР-амплификации с построенными праймерами: 1, 3 – фрагменты ДНК гена S белка величиной около 300 нуклеотидных пар, 5, 7 – фрагменты ДНК гена N белка величиной около 400 нуклеотидных пар.

Структуры прямого и обратного праймеров для ПЦР-амплификации фрагмента ДНК гена N белка SARS-CoV-2 имеют следующий состав:

Прямой: 5'- AAGGAAATTTTGCCACSTTTGCT- 3'

Обратный: 5'- GAGTCAGCACTGCTCATGGA - 3'

```

28981 taaaggccaa caacaacaag gccaaactgt cactaagaaa tctgctgctg aggccttctaa
29041 gaagcctcgg caaaaacgta ctgccactaa agcatacaat gtaacacaag ctttcggcag
29101 acgtggtcca gaacaaaccc aaggaaattt tggggaccag gaactaatca gacaaggaac
29161 tgattacaaa cattggccgc aaattgcaca atttgccccc agcgcttcag cgttcttcgg
29221 aatgtcgcgc attggcatgg aagtcaacac ttccgggaacg tggttgacct acacaggtgc
29281 catcaaatgg gatgacaaag atccaaattt caaagatcaa gtcattttgc tgaataagca
29341 tattgacgca tacaaaacat tcccaccaac agagcctaaa aaggacaaaa agaagaaggc
29401 tgatgaaact caagccttac cgagagaca gaagaaacag caaactgtga ctcttcttcc
29461 tgetgcagat ttggatgatt tctccaaaca attgcaacaa tccatgagca gtgctgactc
29521 aactcaggcc taaactcatg cagaccacac aaggcagatg ggctatataa acgttttcgc

```

Рисунок 5 – Нуклеотидная последовательность фрагмента гена N белка SARS-CoV-2 от 28981 до 29580 нуклеотида

На электрофореграмме в образцах 5 и 7 (рисунок 4), демонстрирующих спектр фрагмента ДНК гена N белка, полученного после ПЦР-амплификации с построенными праймерами хорошо видно, что величина фракций составляет около 400 нуклеотидных пар. Следовательно, и в этом случае размер, полученных фракций ДНК хорошо совпадает с ожидаемой величиной в 399 нуклеотидных пар и четко

указывает на его принадлежность именно к гену N белка коронавируса SARS-CoV-2.

Мультиплексное тестирование набора ДНК праймеров для ПЦР идентификации SARS-CoV-2. Рассмотренные выше примеры конструирования и тестирования праймеров для ПЦР-амплификации фрагментов генов S и N, с последующей видовой идентификацией, относятся к *традиционному (простому) ПЦР анализу* для выявления SARS-CoV-2. На практике более эффективным и точным является *мультиплексный метод*, при котором в одной ПЦР реакции используется сразу 3 или 4 пары праймеров для разных генов SARS-CoV-2.

Во многих работах кроме генов S и N часто используются фрагменты ДНК гена RdRP, который кодирует у коронавируса фермент *РНК-зависимую РНК полимеразу*. На генетической карте SARS-CoV-2 ген RdRP располагается в центре генома (рисунок 1), в районе от 13442 до 16236 нуклеотидов [13]. Сконструированная оптимальная пара праймеров (прямой: 5'- GCTCGCAAACATACAACCTG- 3' и обратный: 5'- CATTAACATTGGCCGTGACA - 3') позволяет амплифицировать фрагмент ДНК гена RdRP с фланкирующими участками величиной 202 нуклеотидные пары.

Использование мультиплексного ПЦР-анализа с набором трех пар праймеров для фрагментов S, N и RdRP генов позволяет тестировать более 25% состава генома коронавируса SARS-CoV-2 в одной реакции. В этом случае на электрофореграмме спектр одного образца выявляется сразу тремя фракциями величиной 202, 291 и 399 нуклеотидных пар, что повышает эффективность и точность идентификации коронавирусной ДНК в биологическом материале пациента. Совокупность проведенных выше исследований убедительно демонстрирует *хорошую работу и надежность сконструированных праймеров* для выявления фрагментов S, N и RdRP генов коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале.

ПЦР-анализ в реальном времени (PCR real time). Многие современные лаборатории оснащены более дорогими *амплификаторами нового поколения* и могут проводить *ПЦР-анализ в реальном времени (PCR real time)*. ПЦР в реальном времени позволяет не только визуализировать непосредственно ход реакции амплификации, но и дает возможность автоматизировать и ускорить весь процесс. В то же время при этом методе невозможно визуализировать образование ложных димеров ДНК-праймеров.

Традиционные методы ПЦР-анализа удобны, менее дорогостоящи, и дают возможность непосредственно фиксировать образование

димеров ДНК-праймеров, однако их невозможно автоматизировать из-за стадии проведения электрофореза.

Таким образом, в ходе нашего исследования был охарактеризован молекулярно-генетический механизм ПЦР-диагностики коронавируса SARS-CoV-2 и приведены примеры надежных ДНК-праймеров для идентификации целевых генов SARS-CoV-2, включая гены кодирующие вирусный спайковый S белок и нуклеокапсидный N белок. Рассмотрен механизм мультиплексного ПЦР-тестирования при использовании трех пар праймеров для S, N и RdRP генов SARS-CoV-2.

2. ДНК-диагностика бактериальных заболеваний

За последние 15-20 лет использование молекулярно-генетических тестов в клинических микробиологических лабораториях резко возросло. Кроме того, появляется все больше научных работ, основанных на молекулярной характеристике микроорганизмов, разработке и оценке молекулярно-генетических лабораторных тестов, для их обнаружения и идентификации как в клинических образцах, так и в изолированных культурах. Еще одно важное применение молекулярно-генетических технологий заключается в сравнении морфологически и биохимически сходных микроорганизмов для определения из общего или другого независимого источника, выделен тот или иной изолят, что стало с успехом применяться в молекулярной эпидемиологии.

Необходимо отметить, что в молекулярно-генетических лабораториях используют в основном те микроорганизмы, работа с которыми трудоемка, при использовании классических методов, и/или отнимает много времени для их выделения, это такие возбудители как палочка Коха – *Mycobacterium tuberculosis* (возбудитель туберкулеза) и другие виды рода *Mycobacterium*, которые опасны для работы в клинической лаборатории, а также *Histoplasma* (грибковый возбудитель гистоплазмоза или болезни Дарлинга), *Coccidioides* (грибковый возбудитель кокцидиоидомикоза), вирус гепатита С (ВГС) и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), для которых отсутствуют надежные лабораторные тесты.

Кроме того, были разработаны молекулярные тесты для организмов, которые поступают в клинические лаборатории в больших объемах, таких как *Streptococcus pyogenes* (возбудитель тонзиллофарингита, скарлатины и др.) и *Neisseria gonorrhoeae* (возбудитель гонореи) и *Chlamydia trachomatis* (возбудитель хламидиоза). Кроме того, гены, которые придают устойчивость к противомикробным агентам, явля-

ются мишенями молекулярных методологий, такие как *mecA*, который способствует устойчивости *Staphylococcus aureus* (золотистого стафилококка) к оксациллину; *vanA*, *vanB* и *vanC*, которые придают *Enterococcus* устойчивость к ванкомицину; *katG* и *inhA*, которые опосредуют устойчивость *M. tuberculosis* к изониазиду.

Помимо этого, с помощью методов секвенирования были осуществлен поиск и идентификация новых организмов, таких как *Tropheryma whippelii* (возбудитель болезни Уиппла), а также дальнейшая характеристика и уточнение генотипов уже известных представителей рода *Mycobacterium*, ВГС и ВИЧ. Информация о последовательности нуклеотидов также используется для реклассификации бактериальных организмов на основе гомологии последовательностей 16S рРНК в эпидемиологических целях и для прогнозирования терапевтической эффективности.

Как и в случае любого клинического теста, сбор и транспортировка образцов для тестирования на наличие инфекционного заболевания могут отрицательно повлиять на результаты анализа, если не будут соблюдены надлежащие процедуры.

Микробиологические образцы для молекулярно-генетического анализа могут потребовать специальной обработки для сохранения жизнеспособности целевого организма. Для этого были разработаны специальные системы сбора анаэробов, вирусов и других привередливых организмов. Хотя жизнеспособность образцов для молекулярного тестирования не так важна, качество нуклеиновых кислот может быть нарушено при неправильном обращении с образцом. ДНК и особенно РНК могут быть повреждены в лизированных или нежизнеспособных клетках. Из-за чувствительности молекулярного тестирования также важно избегать загрязнения, которое может привести к ложноположительным результатам.

Методы сбора, предназначенные для предотвращения загрязнения окружающей среды прилегающими тканями, применяются для молекулярного тестирования, особенно методами амплификации. Отбор проб должен включать материал, полученный в результате первоначальной инфекции. Время и место сбора должны быть оптимальными для вероятного присутствия инфекционного агента. Например, сальмонеллезный тиф первоначально присутствует в периферической крови, но не в моче или кале, по крайней мере, до 2 недель после заражения. Для классических методов, которые включают культивирование агента, необходимо получить достаточное количество микроорганизмов (10^3 образца/мл) для выращивания агаровой или жидкой

культуры. Однако при молекулярном тестировании для успешного обнаружения достаточным является минимальное количество **всего 50 организмов**. Количество целевых организмов, а также клинические последствия должны приниматься во внимание при интерпретации значимости положительных результатов, поскольку молекулярное обнаружение может выявить инфекционные агенты на уровнях ниже клинической значимости.

Оборудование и реагенты, используемые для сбора образцов, также важны для молекулярного тестирования. Взятие крови должно быть направлено на соответствующий антикоагулянт, если он будет использоваться. Хотя тампоны с деревянным стержнем могут использоваться для образцов, взятых из горла, тампоны из лавсана или альгината кальция с пластиковыми стержнями являются рекомендуемыми для сбора бактерий, вирусов и микоплазм со слизистых оболочек. Пластмассы менее прилипают к микроорганизмам и не будут мешать ПЦР-реагентам, как это происходит при выделении из тампонов с деревянным стержнем.

Молекулярные методы чрезвычайно чувствительны и специфичны, но эти качества ограничены выбором целевых последовательностей для гибридизации праймеров или зондов. В настоящее время известна первичная нуклеотидная последовательность многих клинически важных микроорганизмов. Последовательности доступны в GenBank или в опубликованной литературе. Специфичность молекулярных методов, нацеленных на эти последовательности, зависит от праймеров или зондов, которые должны соединяться с выбранной точкой в геноме микроорганизма.

Выбор целевой последовательности имеет решающее значение для специфичности молекулярного теста. Многие микроорганизмы имеют одинаковые последовательности в эволюционно значимых генах и поэтому эти последовательности не используются для обнаружения конкретных штаммов, так как они могут вступать в перекрестную реакцию с целым рядом организмов. В этой связи выбираются последовательности, уникальные для целевого организма. Некоторые возбудители, такие как ВИЧ, имеют переменные последовательности внутри одного и того же штамма. Такие различия могут быть информативными, например, при определении лекарственной устойчивости или для эпидемиологической информации; однако не все типы будут обнаружены с помощью одной последовательности. Переменные последовательности могут быть включены в области зонда или праймера, чтобы различать типы. Эти специфичные для типа зон-

ды/праймеры могут быть использованы в подтверждающем тесте после первоначального теста с использованием зондов или праймеров, направленных на последовательность, общую для всех типов.

В дополнение к их штаммовой или видовой специфичности, целевые последовательности должны соответствовать техническим требованиям к условиям гибридизации. Праймеры должны иметь одинаковые температуры отжига и давать ампликоны соответствующего размера. Зонды должны гибридизоваться в соответствии с специальными условиями анализа. Различия в последовательности можно определить с помощью специфичных для последовательности зондов или праймеров.

Многие тесты, используемые в настоящее время в молекулярной микробиологии, поставляются в виде систем, разработанных на коммерческой основе, включают зонды и/или праймеры. Применение этих тестов должно быть одобрено и разрешено государственными санитарными службами (например, в США это – Управление контроля пищевых продуктов и медикаментов США, Food and Drug Administration, FDA – ampweb.org).

Рассмотрим подходы молекулярной диагностики на примере диагностики патогенных микроорганизмов дыхательных путей. Бактерии, вызывающие заболевания дыхательных путей, являются существенной причиной заболеваемости и смертности во всем мире. Многие из этих организмов являются эндемичными даже в странах с более высоким социально-экономическим уровнем и повсеместно распространены в окружающей среде. Бактерии в дыхательных путях легко передаются при контакте с инфицированными респираторными выделениями, а также лабораторное обнаружение и идентификация немoleкулярными методами часто не обладают чувствительностью и/или требуют много времени. Из-за важности этих организмов в возникновении заболеваний у человека и отсутствия чувствительных, быстрых традиционных лабораторных тестов разработка молекулярных анализов, которые могут обнаруживать и идентифицировать бактериальные патогены непосредственно в образцах дыхательных путей (таблица 1), является приоритетной задачей.

Mycobacterium tuberculosis

M. tuberculosis является одной из основных причин возникновения туберкулеза (инфекции дыхательных путей), а также глобальной проблемой, приводящей к высокому уровню заболеваемости и смертности. Диагностика туберкулеза может быть сложной и занимать длительные периоды, в течение которых пациент не получает адекватно-

го лечения и может распространить заболевание на других людей. Геном *M. tuberculosis* был секвенирован и имеет 4 411 529 bp с примерно 4000 генами, кодирующими белки, и 50 генами, кодирующими РНК. Более 250 генов кодируют ферменты, участвующие в метаболизме жирных кислот, по сравнению всего с 50 генами той же функции, которые обнаружены в *Escherichia coli*. Геном различных изолятов *M. tuberculosis* не сильно различается, и большая часть вариаций обусловлена перемещением вставочных элементов, а не точечными мутациями.

Таблица 1 – Типичные патогены дыхательных путей, определяемые молекулярно-генетическими методами

Организм	Источник образца	Целевой ген	Традиционный диагностический метод
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Бронхоальвеолярный лаваж	16S rRNA 16S rRNA Видоспецифичный ген P1 адгезина	Культуральный Серологический
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Дыхательные пути Горло Атеросклеротические поражения	Клонированный Pst I фрагмент 16S rRNA MOMP	Культуральный
<i>Legionella</i>	Глубокие дыхательные выделения Сыворотка Лейкоцитная плёнка Моча	5S rRNA <i>mip</i> ген 16S rRNA	Культуральный Выявление антигенов
<i>Bordetella pertussis</i>	Носоглотка	IS 481 Ген аденилатциклазы Ген порина Область промотора коклюшного токсина	Культуральный DFA
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Кровь CSF Сыворотка Мокрота	Ген ДНК полимеразы plyA (пневмолизин) lytA (аутолизин) pbp2a (пенициллин-связывающий белок) pbp2b pspA (поверхностный белок пневмококка)	Культуральный
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Мокрота Бронхоальвеолярный лаваж Бронхоальвеолярный смыв Содержимое желудка	16S rRNA	Культуральный

Идентификация микобактерий произвела революцию с разработ-

кой анализ ДНК-зондов компанией GenProbe, Inc. и их внедрением в лаборатории клинической микобактериологии в 1990 г. Тесты данной компании (**тест AccuProbe**) позволяют обнаруживать микобактериальные специфические последовательности 16S рРНК, когда рРНК образует гибридный комплекс с ДНК-зондом-реагентом. Использование этого теста позволило снизить время на обнаружение и идентификацию *M. tuberculosis*, на 3 недели.

Хотя ДНК-зонды значительно упростили и сократили время, затрачиваемое на идентификацию видов микобактерий по сравнению с традиционным биохимическим тестированием, их чувствительность была недостаточно велика, чтобы их можно было использовать для обнаружения микобактерий непосредственно в клиническом образце. Появление ПЦР-методов привело к разработке лабораторных тестов, в которых *M. tuberculosis* может быть обнаружен непосредственно в клиническом образце с надежной чувствительностью и специфичностью: прямой тест на амплифицированный *M. tuberculosis* (MTD; GenProbe, Inc., Сан-Диего, Калифорния) и ПЦР-тест AMPLICOR *M. tuberculosis* (AMPLICOR MTB; Системы диагностики Роше, Бранчбург, Нью-Джерси).

Тест MTD GenProbe одобрен FDA для прямого выявления *M. tuberculosis* в мазках-положительных и отрицательных образцах дыхательных путей. В тесте MTD используется обратная транскрипцией 16S рРНК с последующей ПЦР, присутствующей в концентрированном клиническом образце. Амплифицированную рРНК обнаруживают с помощью того же ДНК-зонда, что и в описанных выше анализах ДНК-зонда, и измеряют хемилюминесценцию гибридов рРНК-ДНК. Чувствительность MTD по сравнению с мазком и культурой мазков-положительных респираторных образцов составляла 100% и 83% для образцов, у которых был отрицательный мазок. Амплификация и детекция может быть выполнена за 3,5 ч. в одной пробирке и обладают 100% специфичностью для комплекса *M. tuberculosis*. Тест MTD подвержен ложноотрицательным результатам, когда ингибиторы присутствуют в клиническом образце, а также когда в образце присутствует только несколько организмов. Включение внутреннего контроля и обеспечение усиления контроля в действительном тесте помогают снизить вероятность ложноотрицательных проб.

Тест AMPLICOR MTB представляет собой ПЦР-анализ на основе набора для выявления комплекса *M. tuberculosis* непосредственно в клиническом образце.

Клетки лизируются в образце, высвобождая микобактериальную

ДНК, ДНК денатурируется, праймеры, комплементарные 584-бр области 16S рРНК, которая является общей для всех микобактерий, гибридизуются с целевыми последовательностями, и ДНК-полимераза создает копию целевой ДНК. dUTP и урацил-N-гликозилаза добавляются для предотвращения остаточного загрязнения. Обнаружение продукта-это выполнено с использованием ДНК-зонда, специфичного для комплекса *M. tuberculosis*, и конъюгата пероксидазы авидина-хрена с тетраметилбензидиновой субстратной системой. Тест AMPLICOR MTB занимает 6,5-8 ч. и имеет чувствительность 55,3% в образцах с отрицательным мазком и 94,7% в образцах с положительным мазком.

Разница в чувствительности отражает важность нагрузки на организм в образце для получения положительного результата даже при высокочувствительном анализе, таком как ПЦР.

При прямом сравнении анализов MTD и AMPLICOR MTB оба анализа соответствовали культуральному и клиническому диагнозу в 96,8% образцов. Тест MTD имел лучшую чувствительность 95,9 по сравнению с анализом AMPLICOR MTB (85,4), что было статистически значимым ($p=0,045$). Специфичность обоих анализов была сопоставима для MTD 98,9% и 99,6% для AMPLICOR MTB.

Bordetella pertussis

B. pertussis – это патоген верхних дыхательных путей, который является возбудителем коклюша. Эта бактерия является эндемичной во всем мире и передается при прямом контакте с инфицированными дыхательными выделениями. Дети в возрасте 1-5 лет являются основными мишенями *B. pertussis*. В 1947 году вакцинация против *B. pertussis* была проведена в США, и случаи коклюша в целевой возрастной группе значительно сократились. Инфекции у младенцев в возрасте до 1 года увеличились, однако, после начала программы вакцинации, поскольку у младенцы не получили полную серию из трех инъекций.

В последнее время были выявлены вспышки коклюша у подростков и взрослых, иммунитет которых из-за вакцины ослабел. Число инфекций в этих возрастных группах возросло настолько, что была разработана **бустерная вакцина** (т.е. дополнительное введение вакцины спустя какое-то время после получения первой дозы препарата. Также этот термин используется в контексте ревакцинации. В таком случае бустером называют очередную дозу вакцины для дополнительного контакта организма с иммунизирующим антигеном), которая в настоящее время настоятельно рекомендуется для подростков в

возрасте 10-18 лет. Таким образом, несмотря на наличие вакцины, *B. pertussis* остается значительным патогеном, который, по оценкам, является причиной 50 млн. случаев коклюша и 350 тыс. смертей во всем мире.

Таким образом, можно отметить что при использовании тестовых систем необходимо уделять внимание на специфичность, чувствительность и временные затраты на анализ.

3. ДНК-диагностика инвазий.

Рассмотрим ДНК-диагностику инвазий на примере анализа трематодозов (меторхоз, описторхоз).

Меторхоз также, как и описторхоз (возбудители: *Opisthorchis felineus* и *Opisthorchis viverrini*) является опасным паразитарным заболеванием человека и плотоядных животных, вызванное следующими представителями из класса Trematoda семейства Opisthorchiidae – *Metorchis bilis* (Braun, 1890, син. *M. albidus* Braun, 1893), *Metorchis xanthomus* (Creplin, 1846, син. *Metorchis intermedius* Heinemann, 1937) и *Metorchis orientalis* (Tanabe, 1921).

Возбудители данных трематодозов широко распространены по всему миру. Первым промежуточным хозяином являются – моллюски сем. Bithyniidae. Во втором промежуточном хозяине – карповых рыбах сем. Cyprinidae (язь, плотва, красноперка, укля, гольян, лещ, чехонь, густера) личинки паразитируют в мускулатуре, жабрах и других тканях, а половозрелые паразиты – в жёлчном пузыре и жёлчных ходах печени хищных плотоядных млекопитающих, в том числе и человека.

Диагностировать данные трематодозные заболевания позвоночных классическими паразитологическими методами анализа достаточно сложно. Использование серологического метода анализа на антитела гельминтов имеет ряд недостатков – в их числе длительность проведения анализа, и зачастую схожесть реакций у близких видов. Выращивание личинок до половозрелых марит в лабораторных животных довольно трудоемко и также требует времени. В связи со всем вышеизложенным разработка эффективных методов видовой диагностики на основе современных молекулярно-генетических технологий анализа фрагментов ДНК приобретает особую актуальность.

Кроме того, необходимо отметить, что меторхи часто паразитируют в одном и том же хозяине совместно с описторхидами. Одновременное поражение одного и того же хозяина паразитами разных видов принято называть микст-инвазиями. Считается, что у более

60 % больных подтверждённым диагнозом «хронического описторхоза» фактически имеет место микст-инвазия, вызванная *O. felineus* и *M. bilis*, реже регистрируется моноинвазия *O. felineus* (30 % больных) и *M. bilis* (около 8 %).

На данный момент главным помощником ученых-паразитологов и врачей-лаборантов, диагностирующих заболевание по наличию яиц трематод остается обычный световой микроскоп. Использование маркерных генов *M. bilis* и *O. felineus* позволит применить современные методы специфической диагностики на основе ДНК-технологий не только меторхозов и описторхозов, но и микст-инвазий. Точная ДНК-диагностика позволит различать виды паразитов, усовершенствовать методы лечения и медико-эпидемиологический мониторинг природных очагов описторхоза.

Как уже отмечалось ранее, описторхоз является значимым природно-очаговым заболеванием не только на территории России, но и стран СНГ. Под диагнозом описторхоз могут скрываться несколько заболеваний – описторхоз, меторхоз и клонорхоз - биогельминтозы, которые вызываются различными представителями семейства Opisthorchiidae – *Opisthorchis felineus*/*O. viverrini*, *M. bilis* и *Clonorchis sinensis*, соответственно. Стандартным методом клинической диагностики описторхоза является копроовоскопия. Однако яйца у описторхид практически не различимы между собой, поэтому этот метод не позволяет корректно определить вид возбудителя. Разработанные относительно недавно серологические методы диагностики оказались также не способными достоверно различать эти виды описторхид из-за большого количества гомологичных белков. В связи с этим актуальным становится подход к диагностике описторхид с применением методов идентификации ДНК, позволяющий дифференцировать паразитов, вызываемые *O. felineus* и *M. bilis*. В качестве диагностического маркера используется фрагмент генного кластера рибосомальных РНК, включающий ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2). Система диагностики разработана в виде мультиплексного ПЦР-анализа.

В результате анализа выровненных последовательностей рибосомального кластера разных видов описторхид (DQ513407 (*O. felineus*), AF217097, AF095330 (*C. sinensis*) и AF408147, U15003 (*O. viverrini*)) были выявлены консервативные области в генах 5.8S и 28S рРНК. Для амплификации последовательности маркера, включающей в себя фрагмент 5.8S, полную последовательность ITS2 и фрагмент 28S рДНК, были разработаны универсальные (пригодные для выявления ДНК всех описторхид) праймеры. Это праймер ITS2exF

(5'-GAACATCGACATCTTGAACG-3'), соответствующий участку в гене 5.8S рРНК и ITS2exR (5'-GGAACGACCTGAACACCA-3') – в гене 28S рРНК [48]. Участок ДНК, содержащий две выровненные последовательности ДНК (GenBank MK517653.1 и DQ513407.1) с указанием места присоединения праймеров приведен на рисунке 5.

```

[ ITS2exF ]
O.felineus GAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCATGGGTTTGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCCGC
M.bilis .....Y.....

[ Off ]
O.felineus TTATAAACTATCACGACGCCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTCTTGCCAGCTGGCATGATTTCCCCACGCAT
M.bilis .....G.A.G.

O.felineus TTGTGTGGGGTGCCGGATCTATGGCTTTTCCCAATGTGCCGGACGCAACCATGTCTGGGCTGACTGCCT
M.bilis .....G.....
O.felineus GGATGAGGGGGTGCGGCGGAGTCGTGGCTCAATTGTTGTTGTTATTGTTGTGAATGTGCGCGCTCCGTT
M.bilis A.....C.---T.....

[ MbF ]
O.felineus GTTGGTCCTTTGTCTTTGGTTGAGGCTCCAGTGTGGCAATGCATTCGATGCAAATCTGTTTTGCACT--
M.bilis ....T.....A.....AG.....CC

O.felineus -----TCGGTGCTTAAC---TTTCCTGACCTCGGATCAGACGTGATT
M.bilis GTGCTTAACTTTCCTGACCTCGGATCGK.Y.....AAC.....
O.felineus ACCCGCTGAATTTAAGCATATCACTAAGCGGAGGAAAAAGAACTAACAAGGATTCCCTCAGTAACGGCGA
M.bilis .....Y.....R.....S.....

[ ITS2exR ]
O.felineus GTGAACAGGGAAAAGCCAGCACCGAAGCCTGTGGCCAATTGGTCACTAGGC-AATGTGGTGTTCAGGTC
M.bilis .....R.....Y..D.....C.....

O.felineus GTTCC 531
M.bilis ..... 562

```

Рисунок 5 – Выравнивание последовательностей ITS2 для *O.felineus* и *M.bilis* [40]

(Сверху название и расположение универсальных и видоспецифичных праймеров. Идентичные нуклеотиды в выравнивании заменены на точки, дефисы обозначают делеции.)

Анализ продуктов ПЦР, полученных с использованием препаратов ДНК из взрослых особей описторхид, подтвердил универсальность данных праймеров для выбранных видов. Полученный продукт имеет длину около 500 п.н. для всех видов.

Полученные для *M. bilis* и *O. felineus* ITS2-ампликоны были секвенированы. В результате выравнивания их последовательностей и анализа различий в их структуре были разработаны видоспецифические праймеры (MbF) 5'-TTTGGTTGAAGCTCCAGTAG-3' и (Off) 5'-ATGATTTCCCCACGCAT-3' для детекции фрагментов ДНК *M. bilis* и *O. felineus* в формате мультиплексной ПЦР с общим обратным праймером ITS2exR (рисунки 5, 6).

Query 1 CGGTGGATCACTCGGCTCGTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATGCG 60

Query 61 AACTGCATACTGCTTTGAACATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCATGGGTTTGCCT 120
 |||||
 Sbjct 1 F GTTTGCCT 8

Query 121 GTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTATCACGACGCCCAAAAAGTCGTGGC 180
 |||||
 Sbjct 9 GTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTATCACGACGCCCAAAAAGTCGTGGC 68

Query 181 TTGGGTCTTGCCAGCTGGCATGATTTCCCCACGCATTTGTGTGGGGTGCCGGATCTATGG 240
 |||||
 Sbjct 69 TTGGGTCTTGCCAGCTGGCATGATTTCCCCACGCATTTGTGTGGGGTGCCGGATCTATGG 128

Query 241 CTTTTCCCAATGTGCCGGACGCAACCATGTCTGGGCTGACTGCCTGGATGAGGGGGTGG 300
 |||||
 Sbjct 129 CTTTTCCCAATGTGCCGGACGCAACCATGTCTGGGCTGACTGCCTGGATGAGGGGGTGG 188

Query 301 CGGCGGAGTCGTGGCTCAATTGTTGTTGTTATTGTTGTGAATGTGCGCGCTCCGTTGTTG 360
 |||||
 Sbjct 189 CGGCGGAGTCGTGGCTCAATTGTTGTTGTTATTGTTGTGAATGTGCGCGCTCCGTTGTTG 248

Query 361 GTCCTTTGTCTTTGGTTGAGGCTCCAGTGTTGGCAATGCATTTCGATGCAAATCTGTTTTG 420
 |||||
 Sbjct 249 GTCCTTTGTCTTTGGTTGAGGCTCCAGTGTTGGCAATGCATTTCGATGCAAATCTGTTTTG 308

Query 421 CACTTCGGTGCTTAACCTTTCCTGACCTCGGATCAGACGTGATTACCCGCTGAATTT 476
 |||||
 Sbjct 309 CACTTCGGTGCTTAACCTTTCCTGACCTCGGATCAGACGTGATTACCCGCTGAATTTAAGC 368

Sbjct 369 ATATCACTAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCTCAGTAACGGCGAGTGAACA 428

Sbjct 429 GGGAAAAGCCCAGCACCGAAGCCTGTGGCCAATTGGTCACTAGGCAATGTGGTGTTCAGG 488
 |||||
 Sbjct 489 TCGTTCC 495 R

Рисунок 6 – Участок ДНК 5.8S –ITS2–28S с указанием места локализации праймеров

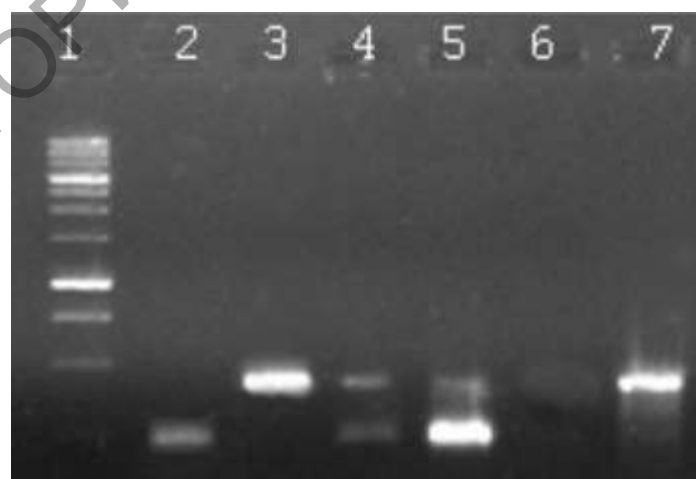


Рисунок 6 – Электрофореграмма продуктов мультиплексной ПЦР со смесью ДНК *M. bilis* и *O. felinus*. 1 – маркер 1 kb; 2 - ампликон *M. bilis*; 3 – ампликон *O. felinus*; 4,5 – ампликоны с микст-инвазией (*M. bilis* и *O. felinus*); 6 – К-; 7 – К+

Таким образом, разработанная система ДНК-диагностики, позволяющая по результатам единственной мультиплексной ПЦР (рисунок 6) не только четко детектировать меторхоз или описторхоз, но и дифференцировать паразитов, вызывающих данное заболевание.

При апробации данного метода показано, что в исследованной группе пациентов выявляется около 50 % микст-инвазий. Другие исследователи, использующие иммунологические методы диагностики, показывали значительно более высокую встречаемость микст-инвазий. Возможно, это связано с тем, что при меторхозе, в отличие от описторхоза, существует другая цикличность (с более длительными перерывами) в яйцепродукции паразита, или длительность инвазии существенно короче серологической реакции пациентов. Решение этих вопросов может быть существенно ускорено при использовании разработанной видоспецифической диагностики описторхозов – описторхоза и меторхоза. Кроме того, предложенный метод представляется пригодным для использования в практике с целью выявления микст-инвазий *O. felineus* и *M. bilis*.

Литература:

1. Гончаренко, Г.Г. Молекулярно-генетический механизм ПЦР-диагностики заболевания COVID-19, вызываемого коронавирусом SARS-CoV-2 / Г.Г. Гончаренко // Известия ГГУ им. Ф. Скорины. – Гомель, 2021. – № 6 (129). – С. 1-6.
2. Попов, В.В. Геномика с молекулярно-генетическими основами. / В.В. Попов. – Москва: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2009. – 304 с.
3. Примроуз, С. Геномика: роль в медицине / С. Примроуз, Р. Твеймен. – М.: БИНОМ, 2008. – 277 с.
4. Reese, R.J. Analysis of Genes and Genomes / R.J. Reese, 2004. – 469 p.
5. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.
6. Hartwell, L.H. Genetics: From Genes to Genomes / L.H. Hartwell [et al.]. – New York: McGraw-Hill, 2011. – 817 p.
7. Баранов, В.С. Геномика на пути к предиктивной медицине / В.С. Баранов // Acta naturae. – 2009. – № 3. – С. 77-88.
8. Goh, K. The human disease network / K. Goh [et al.] // Acta naturae. – 2007. – Vol. 104. – № 21. – P. 8685–8690.
9. Геномика – медицине / под ред. В.И. Иванова, Л.Л. Киселева. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. – 392 с.

10. Buckingham, L. Molecular diagnostics: fundamentals, methods, and clinical applications / L. Buckingham, M.L. Flaws. – Philadelphia: F.A. Davis Company, 2007. – 479 p.
11. Brisson-Noel A. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples / A. Brisson-Noel [et al.] // *Lancet*. – 1989. – Vol. 2. – P.1069-1071.
12. De Wit, D. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification / D. De Wit [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1990. – Vol. 28. – P. 2437-441.
13. Eisenach, K.D. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* / K.D. Eisenach [et al.] // *Journal of Infectious Disease*. – 1990. – Vol. 161. P. 977-981.
14. Bracca, A. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples / A. Bracca [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2003. – Vol. 41. – P.1753-1755.
15. Martagon-Villamil, J. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR / J. Martagon-Villamil [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2003. – Vol. 41. – P.1295-1298.
16. Bialek, R. Coccidioidomycosis and blastomycosis: Advances in molecular diagnostics / R. Bialek [et al.] // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2005. – Vol. 45. – P.355-360.
17. Johnson, S.M. Amplification of coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR / S.M. Johnson, K.A. Simmons, D. Pappagianis // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. – Vol. 42. – P. 1982-1985.
18. Fiebelkorn, K.R. RNA Virus Detection / K.R. Fiebelkorn, F.S. Nolte // *Molecular Microbiology. Diagnostic Principles and Practice*. – Washington, DC: ASM Press, 2004.
19. Hall, G.S. Molecular diagnostic methods for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* / G.S. Hall // *Reviews in Medical Microbiology*. – 2005. – Vol. 16. – P. 69-78.
20. Geha, D.J. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory / D.J. Geha [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1994. Vol.32. – P.1768-1772.
21. Satake, S. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR / S. Satake [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology* 1997. – Vol. 35. – P.2325-2330.
22. Hunt, J.M. Detection of a genetic locus encoding resistance to rifampin in mycobacterial cultures and in clinical specimens / J.M. Hunt [et al.]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 1994. – Vol. 18. –

P. 219-227.

23. Cockerill, III F.R. Rapid identification of a point mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* catase-peroxidase (katG) gene associated with isoniazid resistance / III F.R. Cockerill [et al.] // Journal of Infectious Disease. – 1995. – Vol. 171. – P. 240-245.

24. Relman, D.A. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease / D.A. Relman [et al.]. New England Journal of Medicine. – 1992. – Vol. 327. – P.293-301.

25. Winn, W.C. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology / W.C. Winn [et al.].– Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

26. Cole, S.T. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence / S.T. Cole [et al.]. – Nature. – 1998. – Vol. 393. – P. 537-544.

27. ДНК-диагностика микст-инвазий *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis* с помощью метода ПЦР / И.И. Брусенцов [и др.] // Медицинская паразитология. – 2010. - № 2. – С.10-13.

28. Практикум по диагностике инвазионных болезней животных /под ред. проф. М.Ш. Акбаева. – М.: КолосС, 2006. – 352 с.

ЛЕКЦИЯ 10. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ОНКОЛОГИИ

1. Определение канцерогенеза
2. Молекулярные основы канцерогенеза

1. Определение канцерогенеза

Канцерогенез (рак) – сложный многостадийный процесс, для реализации которого необходимо несколько последовательных генетических событий, включающих аномальную или неконтролируемую пролиферацию (размножение) клеток. Новые клетки, не выполняющие никакой полезной функции в организме, называют неопластическими. В случае большинства форм рака неопластические клетки слипаются воедино, образуя опухоли. Доброкачественные опухоли содержат клетки, сходные с нормальными клетками, и, поскольку заключены в капсулу из волокон внеклеточного вещества, они остаются локализованными на месте их первичного возникновения. Злокачественные опухоли, напротив, содержат аномальные клетки, способные отделяться и перемещаться в другие части тела, давая начало новым опухолям. Такой процесс распространения называется метастазированием, и его трудно контролировать. Поэтому диагностировать и начать лечить рак очень важно, как можно раньше.

Существует более 200 различных форм рака у человека, при этом поражены могут быть различные типы тканей и клеток (таблица 10.1).

Таблица 10.1 – Некоторые наиболее распространенные формы рака

Болезнь	Комментарий
Рак легких	Главная причина смертности от рака для обоих полов. Четко просматривающиеся связи с курением (активным и пассивным) и действием вредных веществ из окружающей среды, таких как асбест, соединения мышьяка
Рак груди	Вторая из основных причин смертности от рака у женщин (редко у мужчин). Риск увеличивается с возрастом. Семейная предрасположенность.
Рак простаты	Вторая из основных причин смертности от рака у мужчин. Риск увеличивается с возрастом.
Колоректальный рак	Третья из основных причин смертности от рака у обоих полов. Связь с диетами с высоким содержанием жиров и низким содержанием клетчатки. Семейная предрасположенность.
Рак кожи	Существует в виде базально-клеточной карциномы или злокачественной меланомы. Вторая из наиболее распространенных форм рака, возникающих в возрасте до тридцати лет. Возможные причины возникновения: воздействие на кожу химических реагентов, радиация, УФ-облучение.
Рак яичников	Возникает в основном у женщин старше 40 лет. Связан с высоким уровнем эстрогенов и недостаточным питанием.

Лейкемия	Острые или хронические формы. Вызывается неконтролируемым размножением (пролиферацией) лейкоцитов. Болеют люди со склонностью к геморрагии и персистирующим инфекциям.
Цервикальный рак	Возникает в основном у женщин после 30 лет. Повышенный риск связан с курением, ранним первым половым сношением, большим числом половых партнеров и некоторыми болезнями, передающимися половым путем (например, герпес).
Рак яичка	Самый распространенный рак у молодых мужчин.

Наилучшее лечение или наиболее эффективная комбинация различных вариантов лечения зависят от специфического типа болезни. Есть три основных класса раковых заболеваний: *карциномы*, *саркомы* и *гематологические формы рака*. *Карциномы* – опухоли, которые возникают из эпителиальных клеток, выстилающих внутренние органы или внешнюю поверхность тела, (т. е. кожи, внутренней поверхности желудка, протоков молочной железы и легких). *Саркомы* возникают из клеток структур опорно-двигательного аппарата тела (т. е. костей, мышц и хрящей). *Гематологические типы рака* возникают из клеток крови или их предшественников; они включают лейкемии, лимфомы и миеломы.

2. Молекулярные основы канцерогенеза

В отличие от инфекционных и наследственных болезней, рак не наследуется и не является инфекционным заболеванием. Рак – это генетическая болезнь, так как всегда подразумевает изменение ДНК, но он всегда приобретается соматическими клетками в процессе жизни индивидуума и не переходит следующему поколению. Наконец, рак возникает из-за мутаций в генах, контролирующих рост и размножение клеток. Одной мутации в одном гене недостаточно, чтобы вызвать рак, поскольку у человека в процессе эволюции была выработана сложная регуляторная система контроля клеточного деления. Она обеспечивает дублирование элементов и устранение неполадок и повышает тем самым надежность работы всей системы в случае, если какие-нибудь компоненты выйдут из строя.



Рисунок 10.1 – Накопление мутаций в ходе развития колоректального рака

Следовательно, рак – это многостадийная болезнь, когда по мере накопления мутаций неопластические клетки постепенно становятся все более аномальными и агрессивными (рисунок 10.1). Спорадический (случайный) рак возникает тогда, когда такие мутации накапливаются в соматических клетках *de novo*, но предрасположенность к раку может быть унаследована, если на момент оплодотворения одна или более мутаций уже присутствуют. Следовательно, несмотря на то что некоторые типы рака человека имеют сильную тенденцию поражать семьи, тем не менее сами опухоли не передаются от родителей к потомкам. Большинство форм рака вызывается сложным взаимодействием генетических факторов и факторов окружающей среды, которые либо непосредственно стимулируют пролиферацию клеток, либо увеличивают вероятность возникновения мутаций в соответствующих генах.

Генетические процессы, лежащие в основе рака, представлены на рисунок 10.2.



Рисунок 10.2 – Развитие рака, представленное в виде последовательности генетических процессов (а) и физических процессов (б)

Можно выделить два важных класса генов, непосредственно содействующих утрате контроля над ростом клеток:

- *Протоонкогены* кодируют белки, функция которых в организме заключается в стимуляции роста и пролиферации клеток. В нормальных условиях эти гены экспрессируются только в быстро делящихся клетках, причем необходимо, чтобы белки (продукты этих генов) были активированы внешними сигналами стимуляции роста. Если мутации вызывают суперэкспрессию таких генов или повышенную активность соответствующих белковых продуктов, то может происходить неконтролируемая пролиферация. Мутантные версии протоонкогенов, которые увеличивают риск заболевания раком,

называются просто *онкогенами*. Необходимо присутствие только одной копии, поскольку действия онкогенов доминантны.

- *Гены опухолевых супрессоров* кодируют белки, функция которых в организме – подавлять рост и пролиферацию клеток. Эти гены могут замедлять цикл деления клеток (в противоположность протоонкогенам ускоряющим этот процесс) или они могут обладать другими функциями такими как стимуляция клеточной дифференциации или программируемой смерти клеток. В случае нарушения одной из этих функций возникает избыток размножающихся клеток. Для возникновения большинства форм рака обе копии гена опухолевого супрессора должны быть инактивированы.

Продукты протоонкогенов в нормальной клетке выполняют целый ряд функций. Например, они могут быть факторами роста, рецепторами компонентами внутриклеточных сигнальных путей, факторами транскрипции или регуляторными белками, которые способствуют протеканию процессов клеточного цикла. Превращение протоонкогена в онкоген, вызывающий развитие рака, может происходить четырьмя различными путями (несколько примеров приведено в таблице 10.2).

Таблица 10.2 – Примеры четырех механизмов превращения протоонкогенов в онкогены

Механизм	Ген (продукт)	Пример
Амплификация всего гена, приводящая к суперэкспрессии нормального белка	ERBB2 (мембраносвязанный рецептор)	Рак груди
Точковая мутация вызывает повышенную активность или конститутивную активность белка	Семейство RAS (внутриклеточный сигнальный белок)	Многие формы рака
Хромосомная транслокация создает химерный ген. Слитый белок обладает повышенной активностью	ABL (внутриклеточный сигнальный белок)	Химерный ген BCR ABL, хроническая миелоидная лейкемия
Хромосомная транслокация перемещает ген из неактивного хроматина в активный, что приводит к повышенной экспрессии нормального белка	MYC (фактор транскрипции)	Лимфома Беркитта

Отметим, что все четыре механизма включают приобретение функции. В случае генов опухолевых супрессоров, которые способ-

ствуют предотвращению клеточной пролиферации, напротив, к раку ведет утрата функции. Это может быть вызвано делецией всего гена или точковой мутацией. Однако становится все более очевидным, что в случае многих форм рака гены опухолевых супрессоров выключаются эпигенетически в результате метилирования ДНК и перестройки структуры хроматина. Функции некоторых ключевых протоонкогенов и генов опухолевых супрессоров показаны на рисунке 10.3.

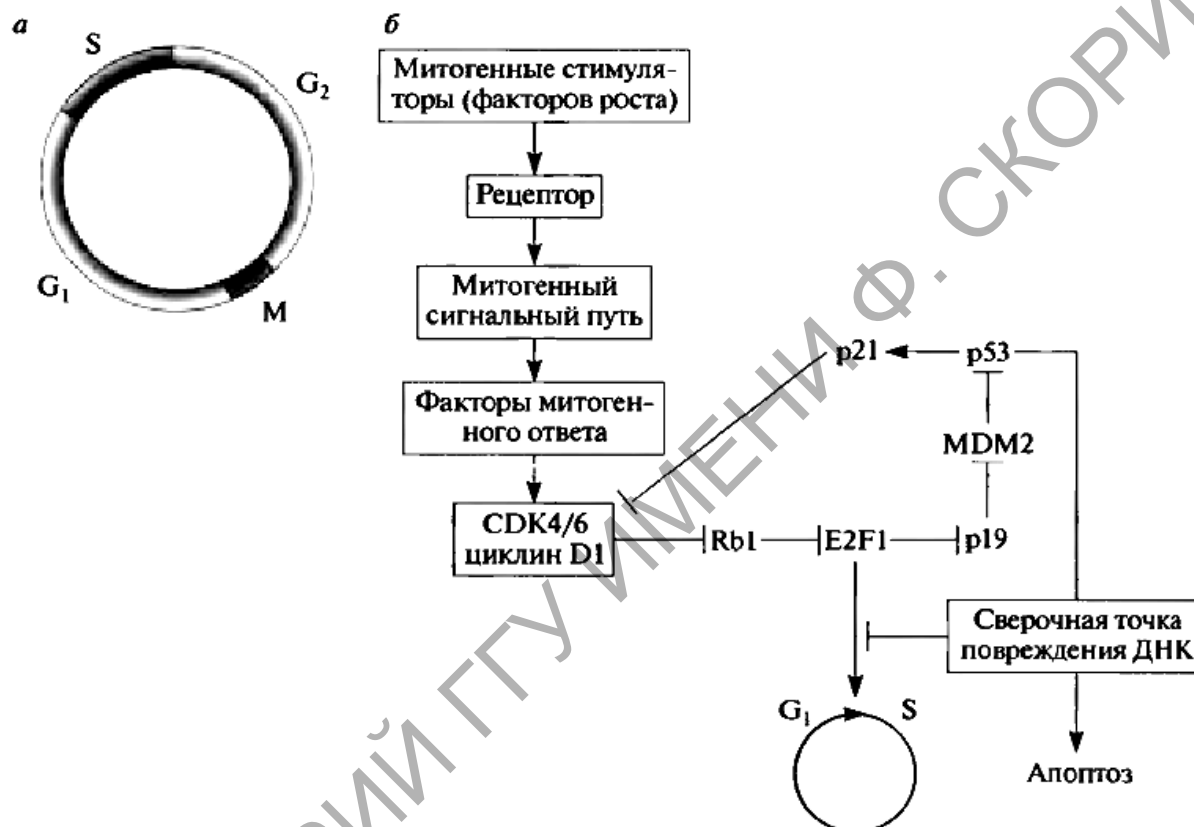


Рисунок 10.3 – Молекулярный контроль клеточной пролиферации

Клеточная пролиферация тесно связана с контролем клеточного цикла, который представляет собой серию событий, происходящих между двумя последовательными делениями клеток (рисунок 10.3 а) Наиболее важные события клеточного цикла – репликация ДНК (синтез, или S-фаза) и митоз (М-фаза) - разделены промежуточными фазами (G₁ и G₂), во время которых клетка растет и накапливает макромолекулы. Прохождение через клеточный цикл контролируется семейством белков, названных циклинами, которые работают согласованно с циклин-зависимыми киназами (CDK). Комплексы циклин – CDK активируют ключевые белки, необходимые на каждой стадии клеточного цикла, путем фосфорилирования, т.е. активируют компо-

ненты ДНК полимеразы в начале S-фазы, способствуя началу репликации ДНК.

Комплексы циклин - CDK активируются внешними факторами роста через сигнальные пути, и многие из компонентов этих путей являются протоонкогенами, так как их повышенная активность промоторирует клеточное деление (рисунок 10.3 б). Чтобы поддерживать стабильность генома, комплексы циклин – CDK должны также ингибироваться внутренними сигналами. Такие сигналы предотвращают начало митоза, если репликация еще не прошла полностью, и предотвращают начало репликации ДНК, если не завершилось клеточное деление. Важный компонент регуляторной системы – предотвращение клеточного деления, если в ДНК есть нерепарированное повреждение: клеточный цикл должен либо остановиться, пока не произойдет репарация, либо должен реализоваться процесс программируемой смерти клетки, называемый апоптозом, в случае, если репарация невозможна. Гены опухолевых супрессоров контролируют эти процессы, действуя в так называемых «сверочных точках», которые контролируют прогрессию клеточного цикла на определенных стадиях. В человеческих клетках наиболее важная сверочная точка имеет место при **G1/S-переходе** (начало репликации ДНК). В этой точке действует несколько продуктов генов опухолевых супрессоров, включая **белок ретинобластомы pRB** и продукт гена TP53, который называется просто **p53**. По-видимому, утрата функции p53 - наиболее важное изменение в случае большинства форм рака, так как этот белок играет ключевую роль в остановке клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК и в индукции апоптоза. По этой причине p53 возвели в ранг «хранителя генома».

Наиболее универсальным молекулярным изменением в различных новообразованиях человека является инактивация функции белка p53. Чаще чем в половине всех опухолей человека (50-60 % новообразований более чем 50 различных типов) обнаруживаются мутации гена p53. В отличие от других опухолевых супрессоров, для которых характерны мутации, прекращающие синтез белка (делеции, образование стоп-кодона, сдвиг кодирующей рамки, нарушения сплайсинга мРНК), подавляющее большинство (более 90 %) мутаций p53 представляют собой миссенс-мутации, приводящие к замене одной из аминокислот в белковой молекуле на другую. Еще одной особенностью мутаций p53 в опухолевых клетках является то, что они в отличие от мутаций других опухолевых супрессоров часто гетерозиготны, т. е. поражают один из двух аллелей гена.

Другие классы генов оказывают не прямое действие на развитие рака. Основная категория – гены предрасположенности к опухолевым заболеваниям, функция которых – поддерживать стабильность генома. Эти гены часто вовлечены в репликацию и репарацию ДНК, и мутации в них делают геном более подверженным дальнейшим мутациям. Последние увеличивают вероятность повреждений в протоонкогенах и генах опухолевых супрессоров. Например, мутации в генах MSH2 и MLH1, участвующих в репарации неспаренных оснований (коррекция неспаренных оснований после репликации ДНК), часто наблюдаются в случае наследственного неполипозного рака толстой кишки (HNPCC). Эти опухоли демонстрируют значительную микросателлитную нестабильность (тенденция к увеличению или уменьшению числа коротких tandemных повторов в процессе последовательных циклов репликации ДНК). Большинство других форм рака сопровождаются хромосомной нестабильностью, проявляющейся в ненормальных кариотипах с множественными хромосомными перестройками. Другие гены участвуют на более поздних стадиях рака. Такие гены могут, в частности, способствовать ангиогенезу (росту кровяных сосудов) или потере клеточной адгезии. В эту группу могут также входить гены устойчивости к лекарствам.

Заболеваемость большинством видов рака резко увеличивается с возрастом. Например, смертность от рака толстого кишечника среди двадцатилетних не превышает десяти человек на 1 млн населения за год, среди шестидесятилетних – около ста человек, а среди восьмидесятилетних эта цифра приближается к 400. Повышение вероятности ракового заболевания с возрастом тем, что в течение жизни человек многократно контактирует с мутагенами разной природы.

Известно, что стимулируют мутационный процесс длительность воздействия и сила мутагена. Так, частота возникновения рака легкого резко возрастает лишь после 10-20 лет курения, а мутагеном в этом случае является бензпирен-компонент угольной смолы и табачного дыма. Частота возникновения лейкоза в Хиросиме и Нагасаки оставалась низкой в первые 5 лет после атомной бомбардировки и достигла пика только через 8 лет после нее.

Роль сопутствующего фактора, ускоряющего развитие опухолевых заболеваний, играет раневой процесс. Хорошо известно, что вслед за образованием раны наступает период ее заживления, который всегда связан с делением клеток. Интенсивное деление клеток любой ткани сопровождается изменением регуляции клеточного цикла. Значительная часть находящихся вне митотического цикла клеток

должна вновь войти в фазу G_1 , чтобы пройти синтетический период, связанный с удвоением ДНК, подготовиться к митозу и поделиться. Такая функциональная перестройка связана с изменением активности генов, регулирующих клеточный цикл. В ходе перестройки клеточной активности в работу включаются новые гены, которые до этого момента длительное время не функционировали. Некоторые гены, участвующие в регуляции клеточного цикла соматических клеток, могут оказаться дефектными и этап их включения способен стать пусковым моментом в развитии опухолевого перерождения.

Как говорилось выше, вирусные инфекции не являются причиной развития раковых заболеваний у человека, однако некоторые из них стимулируют развитие опухоли. Так, вирус гепатита в сочетании с другими факторами риска, такими, как алкоголь, курение, употребление пищевых продуктов, зараженных грибами, может стимулировать развитие рака печени. Вирус иммунодефицита человека (HIV-1) в условиях иммунной недостаточности или заражения другими вирусами может стимулировать развитие саркомы Капоши, рака эпителиальных клеток кровеносных сосудов. Причины такой стимуляции до конца не выяснены. Предполагается, что сами вирусы могут мутировать и становиться онкогенными, или изменяется активность генов вируса, встроенного в геном клетки хозяина, из-за изменения привычного окружения генов.

Предполагается, что значительную роль в регуляции работы генов, являющихся причиной опухолевой трансформации клеток, играет окружающая среда. Известно, что почти в каждой стране есть местности, где очень низок уровень заболевания тем или иным видом рака. То есть образ жизни людей способен предотвращать развитие того или иного вида или формы рака. Например, у жителей окрестностей Бомбея (Индия) в 200 раз ниже, чем в других местах, уровень заболевания раком кожи. В Нигерии в 300 раз ниже уровень заболевания раком пищевода, в Англии - в 100 раз ниже уровень заболевания раком печени.

Таким образом, раневой процесс, вирусные инфекции и образ жизни оказываются важными факторами, влияющими на вероятность развития раковых опухолей.

В настоящее время считается, что опухоль развивается из одной единственной клетки, несколько мутантных генов которой нарушают регуляцию клеточного деления. Поскольку эта мутировавшая клетка несет наследственные изменения, все ее потомки будут иметь аналогичные мутации. К моменту обнаружения опухоли (когда она выявля-

ется на рентгенограмме) в ее составе насчитывается до 10^8 родственных клеток. Диаметр опухоли в это время составляет лишь 1 мм. К моменту пальпирования опухоль разрастается до 10 мм в диаметре, а количество клеток достигает 10^9 . Летальный исход приближается при достижении опухолью диаметра 10 см, количество клеток в ней при этом достигает 10^{12} .

Все опухолевые клетки несут наследственные изменения генов социального контроля. В них наблюдается частичная утрата черт клеточной дифференцировки. Кроме того, злокачественное перерождение опухолевых клеток сопровождается секрецией в окружающую среду протеолитических ферментов, что способствует образованию метастазов.

Развитие раковой опухоли связано с рядом общих процессов, закономерности которых сходны для всех видов и форм рака, хотя каждая конкретная форма этого заболевания имеет собственную специфику.

Литература

1. Шевченко, В.А. Генетика человека / В.А. Шевченко, Н.А. Топорнина, Н.С. Стволинская. – М.: Владос, 2004. – 240 с.
2. Примроуз, С. Геномика. Роль в медицине / С. Примроуз, Р. Тваймен. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2008. – 277 с.
3. Канцерогенез / под ред. Д. Г. Заридзе. – М.: Медицина, 2004. – 576 с.
4. Запорожан, В.Н. Медицинская генетика / В.Н. Запорожан [и др.], Ю.И. Бажора, А.В. Шевеленкова, М.М. Чеснокова. – Одесса: ОНМедУ, 2012. – 278 с.
5. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.

ЛЕКЦИЯ 11. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДАКТИЛОСКОПИЯ

1. Открытие генетической дактилоскопии
2. Минисателлитный анализ
3. Микросателлитный анализ

1. Открытие генетической дактилоскопии

История судебных наук, в частности, криминалистики и тесно с нею связанной судебной медицины, насчитывает более века. Примерно столько же времени прошло и с момента открытия в ядрах клеток вещества, названного нуклеином. Это открытие положило начало другому научному направлению - изучению ДНК. Вплоть до середины 80-х годов прошлого века эти области знания, а именно: научные исследования в сфере криминалистики и изучение того, каким образом хранится и реализуется записанная в молекуле ДНК наследственная информация, никак не пересекались. Их историческая взаимосвязь впервые обозначилась в 1985 г., когда в июльском номере журнала «Nature» появилась статья профессора Лестерского университета в Англии Алека Джеффриса (рисунок 11.1) «Индивидуально-специфичные "отпечатки пальцев" ДНК человека».

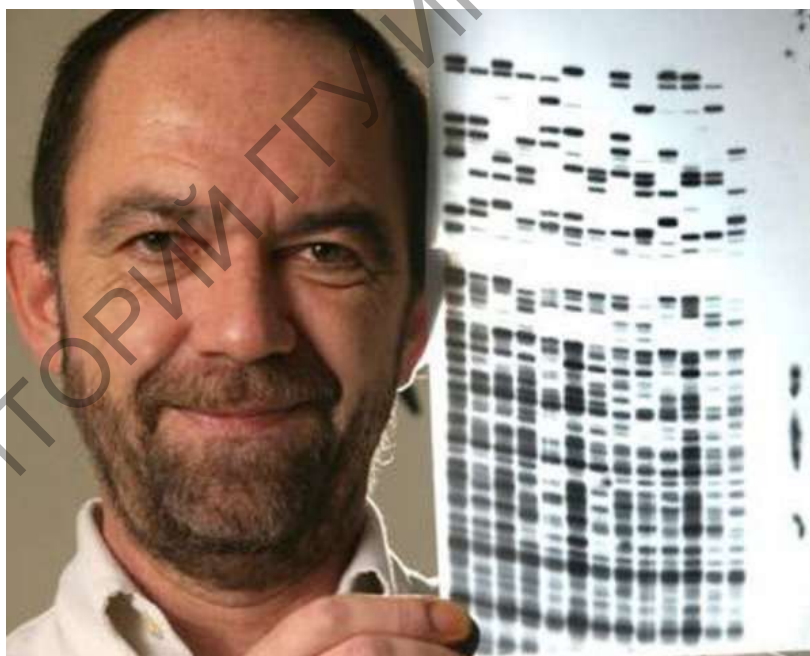


Рисунок 11.1 – Профессор Лестерского университета А. Джеффрис

В декабре того же года А. Джеффрис и П. Гилл из Алдермастонского экспертно-криминалистического центра МВД Великобритании опубликовали еще одну статью под названием «Судебно-экспертное использование "отпечатков пальцев" ДНК». В этих ключевых работах впервые была продемонстрирована возможность использования ана-

лиза хромосомной ДНК человека для судебно-экспертной идентификации личности. Так родилась **генетическая (геномная) "дактилоскопия"** - метод, который признан одним из самых выдающихся достижений XX столетия в области судебных наук.

Молекулярно-генетический идентификационный анализ, традиционно называемый геномной (генетической) "дактилоскопией", или генотипированием (в англоязычной литературе - DNA profiling, DNA fingerprinting или DNA typing), по своей сути направлен на выявление индивидуальных особенностей, так сказать, "особых примет" генетической конституции конкретного человека. Этот подход не имеет аналогов среди использовавшихся ранее методов судебно-экспертной идентификации личности, хотя само его название частично заимствовано из классической судебной науки.

Как известно, **дактилоскопия** - термин из криминалистики и обозначает метод идентификации личности, основанный на изучении и сравнительном анализе кожных узоров ладонных поверхностей ногтевых фаланг пальцев рук. В названии "генетическая дактилоскопия" термин дактилоскопия используется иносказательно. На самом деле речь идет о принципиально иной технологии установления личности, основанной не на изучении отпечатков пальцев, а на анализе клеточной ДНК - универсального носителя наследственной информации.

Каждый человек, как и любой живой организм, имеет свой характеристический фенотип (то есть набор внешних и внутренних признаков и свойств), отличающий его от других ему подобных организмов. Отличия обусловлены уникальностью любого индивидуального **генотипа** – всего набора генов данного организма. (Единственным исключением из этого правила можно считать монозиготных близнецов.) Генетический же материал, заключенный в разных клетках и тканях одного индивидуума, в норме одинаков. Итак, два основополагающих принципа – индивидуальная генетическая уникальность каждого организма и генетическая идентичность всех его клеток и тканей - составляют концептуальную основу молекулярно-генетической индивидуализации.

Ключевой смысл анализа - выявление индивидуальных генетических различий или генетического сходства биологических объектов и, как следствие, установление их отличия или тождества либо их генетического родства. На ранних этапах развития метода конечный этап всей сложной многостадийной процедуры сводился к анализу специфических графических изображений, условно говоря, "отпечатков пальцев" наследственного материала человека. При этом основой для

экспертного заключения чаще всего служило отображение индивидуальных характеристик ДНК в виде графического образа, а именно: специфического набора линий, отдаленно напоминающего картинку так называемого бар-кода (рисунок 11.2).



Рисунок 11.2 – "Геномный отпечаток" ДНК человека

В качестве гибридизационной пробы для анализа рестриктазного гидролизата суммарной геномной ДНК человека использовался радиоактивно меченный молекулярный зонд 33.15 Джеффриса

Отсюда, по аналогии с анализом дактилоскопического отпечатка, возникло название - генетическая, или точнее, геномная "дактилоскопия". Термин введен в 1985 г. Джеффрисом (в английском оригинале - DNA Fingerprinting, буквально - "снятие отпечатков пальцев ДНК"). В настоящее время его надо рассматривать как устаревший, поскольку в научной лексике он вытеснен более строгими определениями, например, типирование ДНК или генетическая идентификация.

Молекулярно-генетический идентификационный анализ позволяет исследовать особые участки ДНК, строго специфичные для каждого индивидуума, и получить таким образом уникальный генетический "паспорт" или "удостоверение личности" человека, которое нельзя ни скрыть, ни изменить, ни подделать. Индивидуализирующие признаки, определяемые на уровне ДНК, характеризуются почти абсолютной устойчивостью, то есть сохраняются в организме человека неизменными всю его жизнь и неизменными отображаются в его биологических следах. Поэтому идентификационная значимость генетических признаков чрезвычайно высока.

Типирование ДНК ныне стало наиболее доказательным методом анализа биологического материала при производстве судебно-медицинской идентификационной экспертизы. Эти технологии прочно вошли в арсенал экспертной деятельности судебно-медицинских служб большинства развитых стран мира: Австралии, Австрии, Великобритании, Германии, Италии, Испании, Канады, России, США, Франции, Швейцарии, Японии. Более чем 15-летний опыт внедрения молекулярно-генетических методов в практику работы правоохранительных органов убедительно свидетельствует о том, что эффективность расследования многих тяжких преступлений против личности может быть существенно повышена. Применительно к задачам судебно-медицинской экспертизы генетические методы особенно эф-

фективны в двух случаях: идентификации личности и установления биологического родства.

2. Минисателлитный анализ

Перед началом рассмотрения собственно минисателлитного и микросателлитного анализа, как основных методов в генетической дактилоскопии охарактеризуем понятие **тандемно-повторяющиеся последовательности**. Они представляют собой уникальный для эукариотических организмов класс ДНК. Уникальность свойств тандемных повторов – следствие их структурной организации: они состоят из многократно тандемно-повторяющихся («голова-к-хвосту») коротких последовательностей (**мотивов**). У высших эукариот тандемные повторы составляют до нескольких десятков процента от генома и являются основной частью конститутивного гетерохроматина, расположенного главным образом в центромерных, перичентромерных и субтеломерных участках хромосом.

Исторически обнаруженная фракция ДНК получила название «**сателлитной**» (**СатДНК**). После секвенирования геномов не было обнаружено ничего такого, что делало бы эту часть генома «сателлитной» (спутниковой): массивы СатДНК в собранном геноме являются продолжением эухроматиновых районов.

В зависимости от размера тандемные повторы подразделяются на четыре класса – **мегасателлиты**, **сателлитная ДНК**, **минисателлиты** и **микросателлиты**. *Мегасателлиты* имеют размер повтора более 1000 н.п. *Сателлитная ДНК* содержит повторяющийся мотив длиной от 100 до 1000 н.п. *Минисателлиты* – тандемно повторяющиеся фрагменты ДНК длиной мотива от 8 до 100 нуклеотидов. Большая часть сателлитов и минисателлитов локализована в гетерохроматиновых областях хромосом. *Микросателлиты* (или простые короткие тандемные повторы) – это повторяющиеся фрагменты ДНК с длиной мотива от 2 до 8 нуклеотидов.

Как было отмечено ранее для каждого человека характерен свой, присущий только ему вариант набора таких тандемно-повторяющихся последовательностей, отличающихся по длине, то есть по числу отдельных звеньев. Иными словами, ситуация оказалась сходной с отпечатками пальцев человека у каждого имеется собственная сателлитная ДНК. Поэтому и метод анализа фрагментов сателлитной ДНК получил название генетической дактилоскопии (фингерпринт ДНК).

Заслуга внедрения минисателлитных локусов для ДНК-идентификации неоспоримо принадлежит А. Джеффрису (А. Jeffreys).

Он работал с миоглобином тюленей, у которых, как и у других водных млекопитающих, такого белка в организме довольно много, а затем сравнивал тюлений «миоглобиновый» ген с человеческим. Джеффрис знал, что геном содержит длинные повторяющиеся последовательности нуклеотидов, у которых, нет никакой функции. Эти последовательности с определенным интервалом в несколько поколений дублировались в месте своей локализации в хромосоме. Среди разнообразных повторяющихся участков ДНК встречались «сверхизменчивые минисателлиты», где последовательность из примерно 20 нуклеотидов повторялась много раз. Из-за того, что те копируются случайным образом на протяжении жизни многих поколений, их число и точный вид отличается у представителей разных таксономических групп, а также у особей одного вида из разных популяций животных, в том числе и человека.

Так в 1984 году Джеффрис, занимаясь анализом ДНК, кодирующей миоглобин, обнаружил в геле большое количество минисателлитов. Это показалось ему странным. Оказалось, что образцы ДНК разных людей содержат весьма отличные друг от друга минисателлитные последовательности. Сразу после публикации своих результатов, с ним связались ученые из Министерства внутренних дел: в открытии они увидели надежный способ проверять, говорят ли правду иммигранты, заявляющие, что состоят в близком родстве с гражданином Великобритании, а также подозреваемые в преступлениях о своей невиновности.

В геноме каждого человека имеется так называемая минисателлитная ДНК. В основе её строения лежит строгая последовательность, состоящая из 13 нуклеотидов. Цепочка одной минисателлитной ДНК может насчитывать таких повторяющихся последовательностей от одной до нескольких тысяч. У людей имеется два и более десятков минисателлитных цепочек, расположенных на разных хромосомах. В совокупности они образуют набор минисателлитных ДНК, различающихся по длине.

Технология генной дактилоскопии включает ряд хорошо разработанных и уже рассмотренных нами методов. Сначала из каких-либо клеток выделяют ДНК и с помощью рестриктаз разрезают её на фрагменты разной длины. Среди фрагментов естественно будут те, которые содержат вариабельные минисателлиты.

Далее проводится стандартный Саузерн-блот анализ. Все полученные фрагменты подвергаются электрофорезу в геле и фракции, содержащие минисателлитную ДНК, выявляются с помощью специаль-

ного меченого зонда комплементарного к звену из 13 повторяющихся нуклеотидов. Так как зонд радиоактивен, то он засвечивает рентгеновскую плёнку только в определённых местах, давая картину из нескольких десятков чередующихся темных фракций, соответствующих отдельным минисателлитам. Схематическое изображение этапов использования переменного числа tandemных повторов при проведении фингерпринта ДНК (VNTR, Variable Number Tandem Repeats – варьирующие по числу tandemные повторы) представлена на рисунке 11.3.



Рисунок 11.3 – Схематическое изображение этапов использования VNTR

На рисунке 11.3 видно, что для двух людей картина на автордиограмме существенно отличается как по числу, так и по расположению и интенсивности фракций. Чем более родственны анализируемые организмы, тем число совпадающих полос после фингерпринта ДНК будет больше и наоборот. Полностью совпадающие спектры минисателлитной ДНК выявляются только у однойцевых близнецов. Следует добавить, что метод фингерпринта минисателлитной ДНК обладает высокой чувствительностью и анализ можно проводить на одной капле крови или нескольких волосяных луковиц.

3. Микросателлитный анализ

В последнее время, наиболее широко используемым методом для анализа генетической изменчивости видов стал ПЦР-анализ микросателлитов.

теллитных локусов или микросателлитов. **Микросателлиты** – это особый класс ДНК-маркеров, представляющих собой фрагменты ДНК с большим количеством – до ста и выше tandemно повторяющихся идентичных «мотивов». Мотивом является короткая последовательность из нескольких (от двух до шести) пар нуклеотидов обычно называемая «повтором». Данные локусы могут достигать более 100 копий в геноме. Появление мутаций в микросателлитах происходит спонтанно, и накопление различий между аллелями идет гораздо быстрее, чем в функциональных генах. Если мутационный процесс в микросателлитах приводит к появлению большого количества локусов, то данный маркер можно применять для молекулярной идентификации отдельных особей. Для анализа изменчивости на уровне популяций обычно используют микросателлитные локусы с небольшим количеством аллелей.

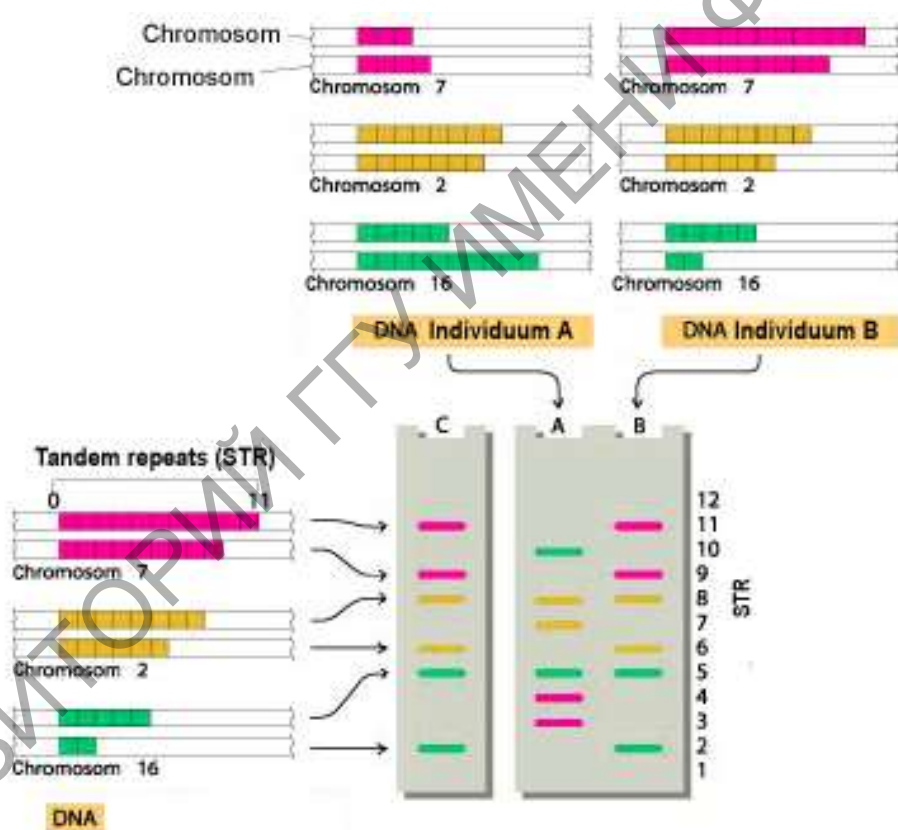


Рисунок 11.4 – Схема микросателлитного анализа

В зависимости от длины повтора микросателлиты классифицируют на локусы с ди-, три-, тетра-, пента-, и гексануклеотидными повторами. Таким образом, микросателлитом или микросателлитным локусом (STR-локусом, Short Tandem Repeats) называют – участок ДНК расположенный в конкретной хромосоме и содержащий короткие tandemные повторы.

Аллели микросателлитного локуса отличаются друг от друга числом повторов и как следствие длиной. Микросателлитные локусы высокополиморфны – т. е. для каждого из них имеется много аллелей. Так например, локус FCA149 локализованный в хромосоме В1 домашней кошки содержит динуклеотидные повторы ТГ. В популяциях *Felis catus* обнаружено 6 аллелей этого локуса (с числом повторов от 13 до 18).

```
5' - ggacttccat ttaataagac ccccaactccc tggaaagaaa ta tgtgtgtg tgtgtgtgtg  
tgtgtgtgtg tgtgtgtg tacg tattcatccc acacatgggtg agacacccag antnctctag-3'
```

Микросателлитные фрагменты выявляют методом ПЦР, обеспечивающим амплификацию - многократное увеличение копий данного фрагмента ДНК. Синтез этого фрагмента инициируется ДНК-затравками в виде пары праймеров, синтетических олигонуклеотидов, комплементарных нуклеотидным последовательностям на границах исследуемого фрагмента. Так как микросателлитные аллели короткие и вместе с праймерами обычно не превышают 200-300 п.н., то даже сильно поврежденный биологический материал может содержать полные копии исследуемого фрагмента ДНК, обеспечивая их успешную амплификацию. Именно по этой причине ПЦР микросателлитов, оказался особенно важным для судебно-медицинских исследований. Для исследуемого микросателлитного локуса конструируют такую пару праймеров, чтобы комплементарные им фланкирующие участки ДНК были высокоспецифичны, т.е. отсутствовали в других участках генома. Длина праймеров должна быть не менее 20-30 п.н., их 3'-концы не должны быть комплементарными друг другу

Микросателлитные локусы являются селективно-нейтральными, они не подвержены действию естественного отбора. Комбинация аллелей таких локусов является уникальной характеристикой каждой особи.

Для генной дактилоскопии обычно не используют один локус, а берут целую панель из 10-15 локусов. Например, для дактилоскопии пород домашних кошек часто используют 10-ти локусную микросателлитную панель с динуклеотидными повторами, количество аллелей в каждом из которых варьирует от 5 до 10. Это означает, что количество возможных многолокусных генотипов по этим 10 генам у кошек составляет более 10 миллиардов (10¹⁰). Иными словами, только у одной особи *F. catus* из 10 млрд. генотип при использовании этого набора локусов, может совпасть с какой либо другой особью. Таким образом, разработанная по 10 микросателлитным локусам иден-

тификационная панель позволяет проводить точную генетическую дактилоскопию любой особи *F. catus*.

Литература

1. Иванов, П.Л. Индивидуализация человека и идентификация личности: молекулярная биология в судебной экспертизе / П.Л. Иванов // Вестник Российской академии наук. – 2003. – Т. 73. – № 12. – С. 1085-1097.
2. Jeffreys, A.J. Individual-specific "fingerprints" of human DNA / A.J. Jeffreys, V. Wilson, S.L. Thein // Nature. – 1985. – Vol. 316. – P. 76.
3. Gill, P. Forensic application of DNA "Fingerprints" / P. Gill, A.J. Jeffreys, D.J. Werrett // Nature. – 1985. – Vol. 318. – P. 577.
4. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.
5. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии / под ред. К. Уилсона, Дж. Уолкера. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 848 с.
6. Гончаренко, Г.Г. Микросателлитные ДНК-маркеры в генетической дактилоскопии особей *Felis catus* и родственных видов сем. Кошачьи / Г.Г. Гончаренко, С.А. Зятыков // Известия ГГУ им. Ф. Скорины. – Гомель, 2016. – № 3 (96). – С. 1-5.

ЛЕКЦИЯ 12. АНАЛИЗ СОСТАВА ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

1. Анализ состава мясной продукции
2. Анализ состава рыбной продукции

1 Анализ состава мясной продукции

Мясо и продукты его переработки - колбасные изделия, мясокопчености, консервы, полуфабрикаты относятся к наиболее ценным продуктам питания, поэтому они попадают в разряд наиболее часто фальсифицируемых продуктов. Фальсификация подразумевает под собой действия, направленные на обман потребителя путём подделки объекта купли-продажи с корыстной целью. Экономический аспект фальсификации заключается в существенном материальном ущербе потребителю. Религиозный аспект связан с тем, что в различных религиях существуют ограничения или запреты некоторых продуктов питания. Медицинский аспект фальсификации связан с риском потребителя и нанесением вреда его жизни и здоровью. Один из важных элементов поддержания здоровья населения – обеспечение качества пищевых продуктов, контроль которого осуществляется различными методами ветеринарно-санитарной экспертизы. Один из аспектов проведения такой оценки – определение ассортиментной фальсификации продуктов, под которой подразумевается замена одного вида животного сырья другим, менее ценным.

Фальсификацию видовой принадлежности мясного сырья определять значительно труднее, чем любые другие виды фальсификации. Поэтому достаточно часто следственные органы при расследовании фальсификации, контрабанды, браконьерства мяса привлекают ветеринарных специалистов для установления его видовой принадлежности и соответствия сопроводительным документам. На сегодняшний день существует большой выбор методов для определения видовой принадлежности мяса и мясной продукции. Гистологические методы основаны на выявлении анатомических особенностей осевого и периферического скелета, определение по форме и цвету мышечной ткани, количеству и распределению жировой ткани. Однако такие методы не применимы к частично измельчённым или полностью переработанным мясным изделиям. Не редко применяются физико-химические методы, такие как определение температуры плавления, вспышки, коэффициента рефракции жира, фракционное разделение экстрактов мышечной ткани посредством газовой хроматографии. Достаточно эффективными являются энзимологические и иммунологические ме-

тоды. Недостаток перечисленных методов заключается в том, что большинство из них основаны на анализе белков или не разрушенных тканевых структур и их применение невозможно при оценке переработанных продуктов, подвергшихся механической или термической обработке, влекущей дегенеративные клеточные изменения. С их помощью невозможно выявить различия между близкородственными видами животных. Также они не пригодны для анализа продуктов с содержанием мяса менее 10-20% от общей массы.

Наиболее стабильная структура животного организма — это ДНК. Будучи устойчивой к воздействию температурных, химических и механических факторов, она не утрачивает своей информативной функции под влиянием агрессивных воздействий. В связи с этим наиболее перспективными в плане определения видовой принадлежности мяса и мясопродуктов являются методы ДНК-диагностики. Наиболее чувствительным и специфичным для идентификации видовой принадлежности ДНК и определения сырьевого состава продукции сегодня считается метод ПЦР. Так как с помощью ПЦР можно определить не только видовую принадлежность мяса, но и выявить примеси мясного сырья разных видов животных и птицы. Благодаря высокой чувствительности и специфичности, хорошей воспроизводимости результатов, скорости и низкой трудоемкости процедур ПЦР становится одним из наиболее достоверных методов идентификации мяса и готовых мясных продуктов.

Ярким примером применения ДНК-идентификации является межгосударственный стандарт (ГОСТ 31719–2012), разработанный при участии Государственного научного учреждения Всероссийского научно-исследовательского института мясной промышленности имени В.М. Горбатова Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИМП им В.М. Горбатова Россельхозакадемии) и допущенный к применению при контроле кормов, сырья и продуктов питания для выявления фальсификаций сырья, пищевой продукции и детекции несанкционированных примесей в кормах. Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, продовольственное сырье растительного, животного происхождения, корма и устанавливает экспресс-метод качественного определения видовой принадлежности содержащихся в них мясных и растительных ингредиентов, кроме того он действует не только на территории Российской Федерации, но и Беларуси, Казахстана, Киргизии, Молдовы и Таджикистана.

Стандарт предназначен для ускоренной идентификации видоспецифичной ДНК: крупного рогатого скота (*Bos taurus*). свиньи (*Sus*

scrofa), курицы (*Gallus gallus*), сои (*Glycine max*), картофеля (*Solanum tuberosum*), кукурузы (*Zea mays*) (таблица 12.1) и др. в составе кормов, сырья, полуфабрикатов, готовых продуктов питания методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данный метод оптимален для определения видовой принадлежности растительных и животных компонентов в составе кормов, сырья, пищевых продуктов, в том числе подвергавшихся термической обработке.

Таблица 12.1 – Последовательность праймеров для идентификации видовоспецифичной ДНК

Вид	Праймеры
<i>B. taurus</i>	5'- tgaggacaaatatcattctgagg - 3' 5'- gagcaagaattagatagagaag - 3'
<i>S. scrofa</i>	5'- gacctcccagctccatcaaacatctcatcatgatgaaa - 3' 5'- gtcgatagtagatttgtgatgaccgta - 3'
<i>G. gallus</i>	5'- tcacatcggacgaggccta - 3' 5'- ggaacggggtgagtatgagagagtt - 3'
<i>G. max</i>	5'- gtgctactgaccagcaaggcaaagtcagca - 3' 5'- gaggggtttgggggtgccgttttcgtcaac - 3'
<i>S. tuberosum</i>	5'- gatggtgctgttgctactgttgatgatec - 3' 5'- accatccatcgtgcagtaccatttagc - 3'
<i>Z. mays</i>	5'- ttctcgtcgtgcttgcttgctcag - 3' 5'- aagatacagatgaagaagaatgaggcg - 3'

Рассмотрим, как присоединяются предложенные праймеры на целевые последовательности.

Присутствие говядины в мясной продукции основано на выявлении фрагмента гена цитохрома b (cytochrome b) размером 505 н.п. мтДНК *B. taurus* (рисунок 12.1).

14881 taatagccac agcatattata ggatacgtcc taccatgagg acaaatatca ttctgaggag
14941 caacagtcac caccaacctc ttatcagcaa tcccatatc cggcacaat ttagtcgaat
15001 gaattctgagg cggattctca gtagacaaag caacccttac cggattcttc gctttccatt
15061 ttatccttcc atttatcatc atagcaattg ccatagtcca cctactattc ctccacgaaa
15121 caggctccaa caaccaca ggaatttcct cagacgtaga caaaatccca ttccaccctc
15181 actataccat taaggacatc ttaggggccc tcttactaat tctagctcta atactactag
15241 tactattcgc acccgacctc ctccggagacc cagataacta caccacagcc aatccactca
15301 acacaccccc tcacatcaaa cccgagtgat acttcttatt tgcatacgca atcttacgat
15361 caatcccca caaactagga ggagtactag ccctagcctt ctctatccta attcttgctc

Рисунок 12.1 – Диагностический фрагмент мтДНК *Bos taurus* с указанием места присоединения праймеров

Присутствие свинины в мясной продукции основано на выявлении фрагмента гена цитохрома b (cytochrome b) размером 398 н.п. мтДНК *S. scrofa* (рисунок 12.2).

```

14881 taatagccac agcatttata ggatacgtcc taccatgagg acaaatatca ttctgaggag
14941 caacagtcac caccacctc ttatcagcaa tcccatacat cggcacaaat ttagtcgaat
15001 gaatctgagg cggattctca gtagacaaag caacccttac cggattcttc gctttccatt
15061 ttatccttcc atttatcatc atagcaattg ccatagtcca cctactattc ctccacgaaa
15121 caggctccaa caacccaaca ggaatttcct cagacgtaga caaaatccca ttccaccctt
15181 actataccat taaggacatc ttaggggccc tcttactaat tctagctcta atactactag
15241 tactattcgc acccgacctc ctccggagacc cagataacta caccacagcc aatccactca
15301 acacaccccc tcacatcaaa cccgagtgat acttcttatt tgcatacgca atcttacgat
15361 caatccccaa caaactagga ggagtactag ccttagcctt ctctatccta attcttgctc

```

Рисунок 12.2 – Диагностический фрагмент мтДНК *S. scrofa* с указанием места присоединения праймеров

Присутствие курятины в мясной продукции основано на выявлении фрагмента гена цитохрома b (cytochrome b) размером 431 н.п. мтДНК *G. gallus* (рисунок 12.3).

```

15181 tgtatcttcc ttcacatcgg acgaggccta tactacggct cctacctcta caaggaaacc
15241 tgaaacacag gagtaatcct cctcctcaca ctcatagcca ccgcctttgt gggctatggt
15301 ctcccatggg gccaaatata attctgaggg gccaccgtta tcacaaacct attctcagca
15361 attccctaca ttggacacac cctagtagag tgagcctgag ggggattttc agtcgacaac
15421 ccaaccctta cccgattctt cgttttacac ttctcctcc cttttgcaat cgcagggtatt
15481 actatcatcc acctcacctt cctacacgaa tcagggtcaa acaacccctt aggcattctca
15541 tccgactctg acaaaattcc atttcacca tactactcct tcaaagacat tctgggctta
15601 actctcatat tcacccatt cctaacacta gccctattct cccccaacct cctaggagac

```

Рисунок 12.3 – Диагностический фрагмент мтДНК *G. gallus* с указанием места присоединения праймеров

Присутствие сои в мясной продукции основано на выявлении фрагмента гена лектина (lectin, Le1) размером 164 н.п. ДНК *G. max* (рисунок 12.3).

```

1021 ccttaacctt ggtactggtg ctactgacca gcaaggcaaa ctacagcgaa actgtttctt
1081 tcagctggaa caagttcgtg ccgaagcaac caaacatgat cctccaagga gacgctattg
1141 tgacctcttc gggaaagtta caactcaata aggttgacga aaacggcacc ccaaaacctt
1201 cgtctcttgg tcgcgccttc tactccaccc ccatccacat ttgggacaaa gaaaccggta

```

Forward primer	1	GTGCTACTGACCAGCAAGGCAAAGTCAGCA	30
Template	1038	C.....G	1067
Reverse primer	1	GAGGGTTTTGGGGTGCCGTTTTCGTCAAC	29
Template	1201		1173

Рисунок 12.3 – Диагностический фрагмент ДНК *G. max* с указанием места присоединения праймеров

Присутствие картофеля в мясной продукции основано на выявлении фрагмента гена псевдогена (pseudogene, SA10C) размером 332 н.п. ДНК *S. tuberosum* (рисунок 12.4).

```

4561 aatactagta atggagatca atatgacttc aatcttggtg atggtggtgt tgctactggt
4621 ggtgatccgg tactaatact acttttttcg attcaatttt tgatcgatca atgcatacat
4681 acatatatat atgtatgttt tttcgagata tatatatcta ttatgtgtga atgctatgca
4741 atgcaggcat tattatccgt cagcattgca acgaaacatg cagaagacca ggatccagca
4801 tttgcttcaa ttaggtcatt gaatttcaaa aaaaagttgt tgctctcatt aggcactggc
4861 actacttcag attttgataa aacatatata gcagtagagg catgccaaat ggggcctcca
4921 caatggatgg tacgtataca gccaatgact gatgcagcaa gtgcttacat gactgattat

Forward primer 1 GATGGTGCTGTTGCTACTGTTGATGATCC 29
Template 4600 .....G.....G..... 4628

Reverse primer 1 ACCATCCATCGTGCAGTACCCATTAGC 28
Template 4931 .....T...G..GC.....G.. 4904

```

Рисунок 12.4 – Диагностический фрагмент ДНК *S. tuberosum* с указанием места присоединения праймеров

Таким образом, мы видим что для установления видовой принадлежности животных, в основном, используются последовательности мтДНК.

2 Анализ состава рыбной продукции

Необходимо отметить, что молекулярно-генетический подход используются в установлении легальности происхождения продукции из осетровых (мясо, балык, пищевая икра и т.п.), а также при искусственном воспроизводстве естественных популяций этих рыб, так как разведение в аквакультуре невозможно без точной идентификации вида на всех стадиях развития особей (от икры до взрослого организма). Осетровые выделяются среди других рыб по исключительно широко распространенной скрещиваемости различных видов и большой морфометрической пластичности, что затрудняет, а во многих случаях исключает идентификацию по принятым в ихтиологии морфологическим критериям. В этой связи порой невозможно идентифицировать продукцию из осетровых без применения молекулярно-генетических методов. Методы ДНК-идентификации можно условно разделить на две группы - *анализ ядерных генетических маркеров* и *анализ митохондриальной ДНК* (мтДНК). Преимущество использования первых состоит в том, что они позволяют идентифицировать не только чистые виды, но и особи гибридного происхождения. К недостаткам метода относится повышенная чувствительность к целостно-

сти ядерной ДНК, что делает эти методы малопригодными для анализа промышленно обработанной икры. Использование мтДНК для анализа видового состава имеет ряд преимуществ, таких как значительно большая копияность мтДНК по сравнению с ядерной (особенно в икре) и, благодаря кольцевой структуре, большая устойчивость к деградации и лучшая сохранность.

Первоначально метод определения осетровых был применен в работах Бирштейна в 1996 г. и основывался на анализе видоспецифичных замен в последовательности участка гена *CytB*. Метод был запатентован в США и Европе в виде набора праймеров, позволяющих видоспецифическую амплификацию фрагмента гена *CytB*. Недостатками данного метода было большое количество ПЦР, которые необходимо было поставить и затем проанализировать для определения каждого образца. Также почти все праймеры отличались на однонуклеотидную замену, что делало возможным ложное срабатывание тест-системы и требовало обязательной постановки референсной реакции (положительного контроля) для каждого вида.

Дальнейшее развитие метод, основанный на полиморфизме гена *CytB*, получил в работах Людвиг в 2002 г. Идентификация видов, предложенная этими авторами, состояла в последовательном рестрикционном анализе ПЦР-фрагмента участка гена *CytB* семью различными рестриктазами и визуализацией полученных фрагментов рестрикции на агарозном или акриламидном геле (ПЦР-ПДРФ).

Оба предложенных метода на настоящее время не вошли в практику, и определение видовой принадлежности импортируемой икры, и другие вопросы, связанные с СИТЕС, в западных лабораториях осуществляются главным образом методом прямого секвенирования участков гена *CytB* и сопоставлением полученных данных с референсными последовательностями видов, депонированными в GenBank.

Кроме гена *CytB* в молекулярной диагностики применяют контрольный регион D-петли. Рассмотрим, как можно его использовать в ПЦР-идентификации каждого вида для восьми основных видов осетровых.

Последовательность	Длина продукта, пн	Видоспецифичность
TATACACCATTATCTCTATGT		Все виды
CAGATGCCAGTAACAGGCTGA	215	Русский и сибирский осётры
TATCTATTACCTGCGAGCAGGCTG	374	Белуга
TGTCTTTTCTGAAGGAGCTTTGC	329	Шип
GGGAATAACCGTTAATTTGG	190	Стерлядь
GCACAGACTATGTGTGGTATCCAGAA	420	Русский осётр
GGGGTTCTTGGCATGTTGTGAGCG	266	Севрюга

CCTCTTATGTACGCGGTGT	439	Калуга
TGTGGGGTCACGGACTTTACAG	254	Амурский осётр
TGTCTGTCTAGAACATATG	182	Сибирский осётр

Смесь ПЦР-продуктов полученных при гель-электрофорезе представлены на рисунке 12.5.

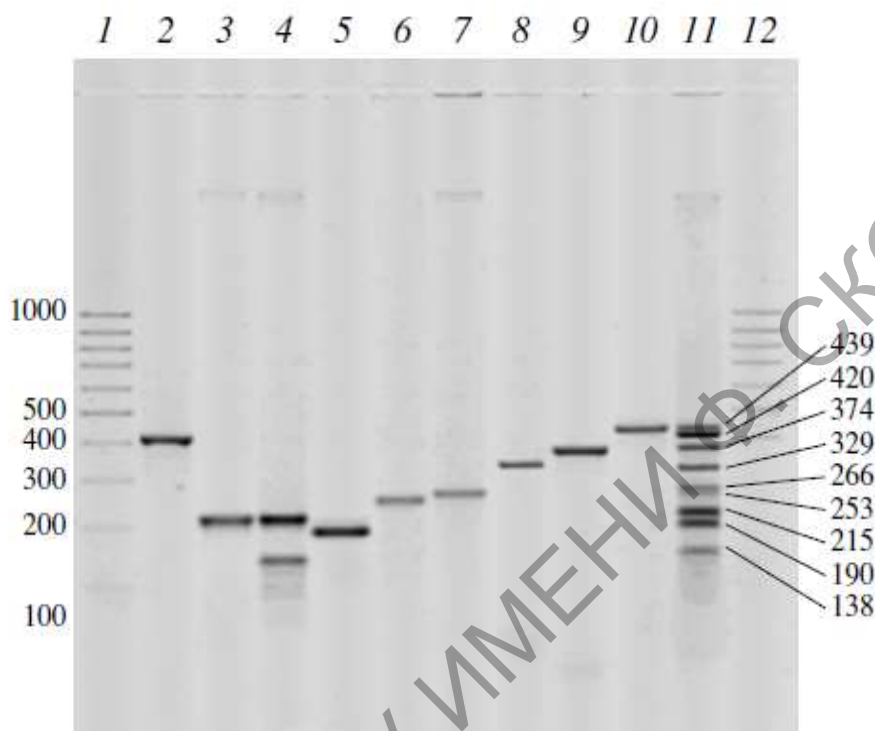


Рисунок 12.5 - Визуализация ПЦР-фрагментов для разных видов осетровых в агарозном геле. 1 – маркер 100-1000 пн; 2 – русский осётр; 3 – русский осётр с ‘baerii-like’ мтДНК; 4 – сибирский осётр; 5 – стерлядь; 6 – амурский осётр; 7 – севрюга; 8 – шип; 9 – белуга; 10 – калуга; 11 – маркер масс ПЦР-продуктов осетровых; 12 - маркер 100-1000 пн.

Контрольный регион раньше не рассматривался как перспективный для целей видовой идентификации, так как известна его гипервариабельность по сравнению с митохондриальными белок- и РНК-кодирующими генами. Выявление видоспецифичных последовательностей возможно только путём охвата всего природного полиморфизма и анализа последовательностей большого числа особей и из различных участков ареала. В противном случае существует вероятность, что праймеры, разработанные по последовательностям рыб из одной популяции, дадут ошибочный результат при анализе особи из другой популяции. С другой стороны, контрольный регион имеет несомненное преимущество для целей генотипирования, так как в этой некодирующей области часто встречаются вставки, делеции и замещения по несколько нуклеотидов подряд. Подобные участки являются идеальными для разработки видоспецифичных праймеров, так

как позволяют создавать тест-системы, менее чувствительные к условиям ПЦР и качеству оборудования.

Для генотипирования производителей осетровых часто используют набор из пяти микросателлитных локусов (*Afug41*, *Afug51*, *An20*, *AoxD161*, *AoxD165*). Исследованные локусы амплифицируются у всех тестируемых видов с одних и тех же пар праймеров и показывают высокий уровень изменчивости. Выявлены аллели, характерные для разных видов, что позволяет использовать их для видовой идентификации осетровых и продукции из них, а также показана возможность определения особей гибридного происхождения. Данные пять локусов были отобраны по результатам предварительного тестирования большого числа (более 20) локусов по принципу высокой воспроизводимости амплификации, наибольшего полиморфизма, соответствия равновесию Харди–Вайнберга и по отсутствию нуль-аллелей у большинства видов, обитающих в России. Анализ аллельного полиморфизма микросателлитных локусов был произведен на образцах, собранных в 2002–2012 гг. и хранящихся в Российской Национальной Коллекции Эталонных Генетических Материалов (РНКЭГМ) ВНИРО (Свидетельство об официальной регистрации базы данных № 2006620351). Пробы осетровых рыб отбирались прижизненным методом путем отрезания фрагмента спинного или грудного плавника. Каждому образцу присваивался идентификационный номер. Все взятые образцы были занесены в РНКЭГМ.

Локус	Праймеры 5' 3'
<i>An20</i>	F:AATAACAATCATACATGAGGCT
	R:TGGTCAGTTGTTTTTTTATTGAT
<i>Afug41</i>	F:TGACGCACAGTAGTATTATTTATG
	R:TGATGTTTGCTGAGGCTTTTC
<i>Afug51</i>	F:ATAATAATGAGCGTGCTTTCTGTT
	R:ATTCCGCTTGCGACTTATTTA
<i>AoxD165</i>	F:TTTGACAGCTCCTAAGTGATACC
	R:AAAGCCCTACAACAAATGTCAC
<i>AoxD161</i>	F:GTTTGAAATGATTGAGAAAATGC
	R:TGAGACAGACACTCTAGTTAAACAGC

Все исследованные локусы оказались полиморфными у всех изучаемых видов (количество аллелей на локус варьирует от 2 до 29 в зависимости от вида и локуса). Исключение составляет локус *Afug41* для калуги – амплификация по данному локусу не идет. Максимальное количество аллелей на особь у многохромосомных видов для всех локусов составляло четыре аллеля, у малохромосомных – два. Наибо-

более информативным является локус An20, имеющий видоспецифичные аллели для семи видов осетровых.

Стерлядь (RUT) определяется по аллелю 177 локуса An20 (аллель присутствует у более 80% особей и незначительно встречается у других видов – менее 7%).

Вид	STR-локус	Размер аллеля, пн
Сахалинский осетр (MED)	An20	181, 185, 189, 193, 197
	Afug51	296
	AoxD161	114
	AoxD165	230, 234, 238, 242, 254
Шип (NUD)	An20	153
	Afug51	272
	AoxD165	196
Стерлядь (RUT)	An20	177
	Afug51	252
Калуга (DAU)	AoxD165	206
	Afug41	Не амплифицируется
	An20	169
Белуга (HUS)	An20	145, 149
	AoxD161	98
	AoxD165	178
	Afug41	277, 269, 265, 262, 257,
Севрюга (STE)	An20	141
	Afug51	288
Амурский осетр (SCH)	An20	137
	Afug41	193, 189, 185

Для шипа (NUD) характерен аллель 153 в локусе An20, аллель 272 в локусе Afug51, а по локусу AoxD165 у 74% особей шипа встречается аллель 196.

Для белуги (HUS) по локусу An20 – определяющие аллели 149 и 145, причем аллель 149 характерен в меньшей степени и калуге (которой присуща более высокая плоидность), и здесь для точной идентификации необходимо использование нескольких локусов, имеющих специфичные для белуги аллели, например локус AoxD161. По этому локусу практически все особи (98%) несут аллель 98, который не характерен для других видов (у русского и персидского осетров – менее 1%). В российских аквакультурных хозяйствах под видом шипа часто встречается гибрид белуги на шипа, который легко определяется именно по этому аллелю и имеет митохондриальный гаплотип белуги. По локусу AoxD165 96% особей белуги несут аллель 178, этот аллель в подавляющем количестве несут и тетраплоидные, в отличие от белуги, русский и персидский осетры. В конце диапазона локуса

Afug41 располагаются аллели, характерные только для белуги, хотя частота встречаемости этих аллелей невелика (249–277).

Для амурского осетра (SCH) характерен аллель 137 локуса An20, причем этот аллель встречается у 100% особей. В начале размерного диапазона локуса Afug41 несколько аллелей встречаются преимущественно в амурском осетре (аллели 197, 193, 189, 185) и 99% особей будут нести хотя бы один из этих аллелей, которые могут служить генетическим маркером вида. Для русского (GUE), персидского (PER) и сибирского (BAE) осетров не найдены четкие аллельные маркеры. Можно заметить, что по локусу Afug51 вклад аллеля 232 для русского и персидского осетров более 30%, т.е. он встречается примерно у 75% особей этих видов, при этом аллель 224 встречается у более 65% персидского осетра, а у русского только у 15%. По локусу AoxD165 аллель 178 в подавляющем большинстве несут и русский и персидский осетр, а у сибирского осетра мажорным является аллель 180. Это нельзя назвать видоспецифичными аллелями, но некоторая детерминация этих видов явно прослеживается. Следует отметить, что в некоторых аквакультурных стадах сибирского осетра, полученных от единичных производителей, нами наблюдалась значительно более высокая встречаемость аллеля 178, что вероятно обусловлено эффектом основателя. Таким образом, использование аллелей 180 и 178 для идентификации русского, сибирского осетров и их гибрида представляется нецелесообразным.

Для севрюги (STE) аллель 141 локуса An20 встречается у 85% особей, а по локусу Afug51 аллель 288 четко указывает на этот вид. Проведение анализа по пяти микросателлитным локусам позволяет определить не только генетический профиль особи, но и установить вид, а также выявить особь гибридного происхождения. В последнем случае анализ мтДНК позволяет определить видовую принадлежность гибрида по материнской линии, а происхождение гибрида по отцовской линии определяется присутствием у гибрида аллелей, не характерных для материнского вида. По многочисленным опубликованным данным в природе встречаются гибридные особи практически всех симпатрически обитающих видов осетровых, в том числе и видов с разной ploidy.

Таким образом, межвидовую и внутривидовую изменчивость исследуют, анализируя контрольный регион митохондриальной ДНК с помощью набора видоспецифических праймеров. Индивидуальные генетические особенности выявляют с помощью микросателлитного анализа фрагментов ядерной ДНК.

Необходимо отметить, что применение микросателлитов (STR-анализ) более востребовано для популяционной и индивидуальной идентификации. Во многих работах последнего десятилетия для оценки генетического полиморфизма осетровых рыб из-за методических трудностей, связанных с полиплоидией и сложной организацией ядерного генома, ученые отдают предпочтение митохондриальной ДНК. Полученные данные дают возможность реконструировать генеалогию соответствующих митотипов, позволяют восстанавливать картину расселения, изоляции и гибридизации видов и популяций. Однако матрилинейный характер наследования маркеров мтДНК не позволяет проводить индивидуализирующий анализ особей, контролировать межвидовую гибридизацию в условиях аквакультуры, а также определять уровень плоидности.

Более медленная молекулярная эволюция осетровых видов, по сравнению с костистыми рыбами определяет проблему предела разрешающей способности метода секвенирования структурных генов, ограничивая генетическое дифференцирование и его количественное определение. Именно по этим причинам идет активная разработка для *Acipenseriformes* новых маркеров микросателлитной ДНК, демонстрирующих чрезвычайно высокий уровень полиморфизма. Использование системы STR-маркеров дает возможность решить вопросы индивидуальной идентификации и популяционной принадлежности особей, оценки эффективности искусственного воспроизводства через определение репродуктивного вклада производителей в генофонд жизнеспособного потомства. Перспективность STR-анализа побудила к поиску микросателлитных локусов с диплоидным типом наследования у полиплоидных по своей природе осетровых видов.

Таблица 12.2 – Сравнительная характеристика ДНК-маркеров с позиции их практического использования для идентификации осетровых рыб

Метод	Данные об идентификации (публикации)			Наличие контрольных образцов	Стоимость 1 анализа *	Продолжительность анализа
	видовой	популяционной	индивидуальной			
RFLP	+			Да (GenBank)	++	5 часов
RAPD	+			Да	+	1 день
AFLP	+			Да	++	1 день
SNP (mtDNA)	+			Да	+	1 день
Секвенирование	+	+		Да (EMBL, GenBank)	+++	1–2 дня
2-праймерная ПЦР (мтДНК)	+			Нет	+	3 часа
STR	+	+	+	Да (публикации)	++	5 часов

Примечание: * — предполагаемые затраты на исследование одного образца (+ — около 10 евр., ++ — 20 евр., +++ — более 20 евр.), включена только стоимость реактивов.

Таким образом, использование ДНК маркеров (таблица 12.2) в течение последнего десятилетия позволило определить внутривидовую дифференциацию многих видов отряда Acipenseriformes, что имеет большое значение для планированного вылова, искусственного размножения и в конечном итоге сохранения этих древних рыб.

Литература:

1. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.
2. Hartwell, L.H. Genetics: From Genes to Genomes / L.H. Hartwell [et al.]. – New York: McGraw-Hill, 2011. – 817 p.
3. Lin, C.S. Complete nucleotide sequence of pig (*Sus scrofa*) mitochondrial genome and dating evolutionary divergence within Artiodactyla / C.S. Lin [et al.] // Gene. – 1993. – Vol. 236 (1). – P. 107-114.
4. ГОСТ 31719-2012 Продукты пищевые и корма. Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный). – М.: Стандартинформ, 2013. – 37с.
5. Raymakers, C. CITES, the Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora: its role in the conservation of Acipenseriformes / C. Raymakers // J. Appl. Ichthyol. V. 22 (Suppl. 1). 2006. P. 53–65.
6. Ludwig, A. Identification of Acipenseriformes species in trade / A. Ludwig // J. Appl. Ichthyol. V. 24. Suppl. 1. 2008. P. 2–19.
7. Raymakers, C. Acipenseriformes: CITES implementation from Range States to consumer countries / C. Raymakers, C. Hoover // J. Appl. Ichthyol. 2002. V. 18(4–6). 2002. P. 629–638.
8. DeSalle R., Birstein V.J. PCR identification of black caviar // Nature. 1996. V. 381. P. 197-198.
9. Birstein V.J., Doukakis P., Sorkin B., DeSalle R. Population aggregation analysis of three caviar-producing species of sturgeons and implications for the species identification of black caviar // Conservation Biol. 1998. V. 12(4). P. 766-775.
10. Ludwig, A. Identification of Acipenseriformes species in trade / A. Ludwig // J. Appl. Ichthyol. V. 24. Suppl. 1. 2008. P. 2–19.
11. Ludwig A., Debus L., Jenneckens I. A molecular approach to control the international trade in black caviar // Internat. Rev. Hydrobiol. 2002. V. 87(5-6). P. 661-674.
12. Wuertz S., Belay M., Kirschbaum F. On the risk of criminal manipulation in caviar trade by intended contamination of caviar with PCR products // Aquaculture. 2007. V. 269(1-4). P. 130-134.

13. Тимошкина, Н.Н. Молекулярно-генетические маркеры в исследовании внутри- и межвидового полиморфизма осетровых рыб / Н.Н. Тимошкина, Д.И. Водолажский, А.В. Усатов. – Ростов-на-Дону: Южный научный центр РАН, 2010. – 24 с.

14. Мюге, Н.С., Барминцева, А.Е. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов / Н.С. Мюге, А.Е. Барминцева, С.М. Расторгуев, В.А. Барминцев, В.Н. Мюге // Генетика. 2008. Т. 44. № 7. С. 913–919.

15. Мюге, Н.С., Барминцева, А.Е. Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых (*Acipenseridae*) и выявления особей гибридного происхождения / Н.С. Мюге, А.Е. Барминцева // Генетика. 2013. Т. 49. № 9. С. 1093–1105.

ЛЕКЦИЯ 13. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ ГМО

1. Общая характеристика ГМО
2. Качественная идентификация ГМО
3. Количественная идентификация ГМО

1. Общая характеристика ГМО

Стремительному развитию генетической инженерии и широкому внедрению в практику ее достижений в последней четверти XX-столетия способствовала Зеленая революция (1940-е–1970-е гг.), которая привела к повышению продуктивности злаковых, бобовых растений, позволила расширить ареал их возделывания и эффективную утилизацию минеральных веществ. Перечисленные результаты были получены, с использованием традиционных методов гибридизации, поэтому их можно рассматривать как прообраз трансгенеза.

Первая генетически модифицированная (ГМ) конструкция появилась в 1972 году благодаря исследователю П. Бергу, который создал рекомбинантную ДНК, включавшую участки геномов онкогенного вируса SV40 и бактериофага λ , несущего галактозный оперон кишечной палочки *E. coli* за что был удостоен Нобелевской премии. В 1973 Г. Бойер и С.Н. Козн, показали, что генно-инженерные ДНК-конструкции могут быть клонированы в чужеродных клетках. Кроме того, они продемонстрировали, что гены жабы (*Xenopus laevis*), встроенные в геном бактерии (*E. coli*), были активны и способны экспрессироваться, со скоростью большей чем собственные гены и нарабатывать большее количество конечного продукта, чем если бы они это делали в клетках самой жабы. Используя данную технологию в 1978 г. биохимик Г. Бойер открыл компанию, которая создала впервые, трансгенный инсулин человека. Спустя 14 лет, в 1992 году, в Китае приступили к выращиванию табака, устойчивого к насекомым. Через 2 года, в 1994 г., фирма «Monsanto» (США), создала первый трансгенный помидор (FlavrSavr), который в дальнейшем был запущен в массовое производство. В настоящее время из ГМ-культур, в основном, выращивают сою (51%), кукурузу (31%), хлопчатник (13%) и рапс (5%). Наряду с этими культурами в сельском хозяйстве используются такие ГМ-растения, как помидоры, картофель, кабачок, люцерна и папайя.

Генетически модифицированный организм (ГМО) - это организм, в геном которого с помощью методов генной инженерии

стабильно встроены чужеродные, ранее никогда там не содержащиеся, гены, фрагменты генов или другие участки ДНК.

При этом очень важна устойчивость введенной ДНК. Это означает, что чужеродная ДНК должна неизменно присутствовать во всех клетках созданного организма, по крайней мере, в течение нескольких поколений. В противном случае организм не может называться ГМО.

Во-вторых, ГМО создаются при помощи методов генной инженерии. Чужеродную ДНК можно интегрировать в геномы путём межвидового скрещивания. Но в соответствии с законодательством, такие организмы (например, все полученные традиционными путями культурные растения и домашний скот) не являются генетически модифицированными. Следует отметить, что различие геномов ГМО и их предшественников очень незначительно (около 0,00002%). Несмотря на то, что геном организма в основном будет такой же, как у родительской линии, у нового организма могут появиться некоторые функциональные отличия. В связи с этим разработка методов молекулярно-генетической идентификации стала на первые роли.

Интересно отметить, что если при производстве пищевой продукции изготовитель не использовал генно-модифицированные организмы, то их содержание в ней, не превышающее **0,9 %**, считается случайной или технически неустранимой примесью. Такие товары не относятся к содержащим ГМО, и при их маркировке не требуется наносить соответствующие сведения.

Содержание генетически модифицированных организмов свыше **0,9 %** каждого из компонентов допускается в кормах с содержанием сои и кукурузы линий, указанных ниже, при условии обязательного декларирования производителем наличия их в сертификате качества или удостоверении качества и безопасности.

Линии сои и кукурузы, содержащиеся в кормах, в которых допускается содержание генетически модифицированных организмов свыше 0,9 %.

1. Соя:

- 1.1. 40–3–2 (ROUNDUP READY соя, устойчивая к глифосату);
- 1.2. A2704–12 (соя, устойчивая к глюфосинату аммония);
- 1.3. A5547–127 (соя, устойчивая к глюфосинату аммония);
- 1.4. MON 89788 (соя, устойчивая к глифосату);
- 1.5. BPS-CV127–9 (соя, устойчивая к гербицидам класса имидазолинов);

1.6. MON 87701 (соя, устойчивая к чешуекрылым насекомым-вредителям);

1.7. SYHT0H2 (соя, устойчивая к гербицидам, ингибирующим фермент гидроксифенилпируватдиоксигеназу (ГФПД), таким как мезотрион, и к гербициду глюфосинат аммония);

1.8. FG72 (соя, устойчивая к гербицидам, содержащим изоксафлютол (IFT), а также к гербицидам, содержащим глифосат);

1.9. MON87701хMON 89788.

2. Кукуруза:

2.1. MON810 (кукуруза, устойчивая к стеблевому мотыльку);

2.2. NK603 (кукуруза, устойчивая к глифосату);

2.3. GA21 (кукуруза, устойчивая к глифосату);

2.4. T25 (кукуруза, устойчивая к действию гербицида глюфосинат аммония);

2.5. Bt11 (кукуруза, устойчивая к глюфосинату аммония и стеблевому мотыльку);

2.6. MON88017 (кукуруза, устойчивая к диабротике и глифосату);

2.7. MIR604 (кукуруза, устойчивая к диабротике);

2.8. 3272 (кукуруза, синтезирующая термостабильный фермент альфа-амилазу);

2.9. MIR162 (устойчивая к чешуекрылым насекомым-вредителям);

2.10. MON89034 (кукуруза, устойчивая к чешуекрылым насекомым-вредителям);

2.11. 5307 (устойчивая к жестkokрылым насекомым-вредителям рода *Diabrotica*).

2 Качественная идентификация ГМО

Качественную идентификацию ГМО разберем на примере растительных объектов. Данный процесс включает следующие системы детекции: 1) детекция для подтверждения присутствия и качества (способности к амплификации) ДНК, выделенной из проб с применением растением-специфичных праймеров; 2) «метод скрининга», основанный на специфической детекции наиболее часто используемых регуляторных последовательностей, **35S промотора** и **nos терминатора**. Эти два способа детекции осуществляются с использованием ПЦР. Затем, ГМО-специфичные праймеры используются в процедуре «гнездового метода ПЦР» для селективного выявления и идентификации различных трансгенных линий.

Растение-специфичный метод ПЦР

Выявление гена лектина.

Для идентификации ДНК сои используют праймеры (GMO3, GMO4 - Meyer et al., 1996), на фрагмент гена лектина (Le1), специфичного для сои. Как указано выше, целью метода является подтверждение наличия и определение качества ДНК, выделенной из проб, содержащих сою, при этом качество ДНК определяется по ее способности амплифицироваться с помощью ПЦР. Праймеры GMO3 (5'-gscctctactccacccccatcc-3') и GMO4 (5'-gcccatctgcaagccttttgtg-3') используются в гнездовом методе ПЦР, втором ПЦР анализе на сою, описанном Meyer и Jassaud (1997) для ДНК, выделенной из переработанных пищевых продуктов. Ожидаемый продукт реакции – это ампликон, размером 118 н.п. (рисунок 13.1)

```
1201 cgtctcttgg tgcgcacctc tactccaccc ccatccacat ttgggacaaa gaaaccggta
1261 gcgttgccag cttcgccgct tccttcaact tcaccttcta tgcccctgac acaaaaaggc
1321 ttgcagatgg gcttgccttc tttctcgac caattgacac taagccacaa acacatgca
```

Рисунок 13.1 – Фрагмент гена лектина сои (подчеркнуто место гибридизации с праймерами GMO3 и GMO4)

Выявление гена зеина.

Для подтверждения наличия, и определения качества ДНК, выделенной из проб, содержащих кукурузу, используют праймеры ZEIN3 (5'-agtgcgaccatattccag-3'), ZEIN4 (5'-gacattgtggcatcatcattt-3') – (Studer et al., 1997), специфичные для гена зеина кукурузы (Ze1). Если выделенная целевая ДНК присутствует в пробе, если она не повреждена и способна к амплификации, можно ожидать амплификацию полосы, соответствующей фрагменту ДНК, длиной 277 н.п (рисунок 13.2).

```
61 tctttgtgga agcggcacta gtgcgaccca tattccagcg cacttgccac cagctatgcc
121 attgggtacc atgaaccgat gcatgcagta ctgcatgatg caacaagggc ttgccagctt
181 gatggcgtgt ccgtccctga tgctgcagca actggttgcc ttaccgcctc agacgagtcc
241 agtgacgatc ccaagatga tgaagcctaa catgatgtac ccattgatga tgccgagcat
301 gatgtcacca atgggcttgc cgagcatgat gtcgcaaatg atgatgccac aatgtctctg
```

Рисунок 13.2 – Фрагмент гена зеина кукурузы (подчеркнуто место гибридизации с праймерами ZEIN 3 и ZEIN 4)

Метод скрининга: выявление CaMV (Cauliflower mosaic virus) 35S промотора и pos терминатора

Выявление 35S промотора и pos терминатора с помощью ПЦР представляет собой так называемый «метод скрининга» для идентификации продуктов питания из генетически

модифицированных растений. Использование 35S промотора и *nos* терминатора в качестве последовательностей – мишеней позволяет выявлять большинство пищевых продуктов из генетически модифицированных источников, поскольку эти регуляторные элементы на настоящий момент присутствуют почти во всех генетически модифицированных растениях, разрешенных в ЕС (Hemmer, 1997). Характеристика линий кукурузы, разрешенных для выпуска на рынок ЕС, приводится в таблице 1 в качестве примера.

Таблица 1. Трансгенная кукуруза, разрешенная для выпуска на рынок в ЕС.

Наименование	Фирма	Новый признак	Промотор	Введенный ген (гены)	Терминатор
Трансформационное событие 176	Ciba-Geigy	Bt, bar	35S PEPC CDPK	bar cryIA(b)/int.9 PEPC cryIA(b)/int.9 PEPC	35S 35S 35S
Линия Bt-11	Novartis	Bt, pat	35S	cryIA(b)/int.1VS6	<i>nos</i>
Линия T25	AgrEvo	pat	E35S	pat	35S
Линия MON810	Monsanto	Bt	E35S	cryIA(b)/int.hsp70 cryIA(b)/int. Hsp70	- -

Выявление CaMV 35S промотора.

Данный промотор регулирует экспрессию генов многих трансгенных растений, например, таких как соя Roundup Ready® и линия кукурузы Bt-176. Для их специфической детекции используют праймеры p35S-cf3 (5'-ccacgtcttcaaagcaagtgg-3') и p35S-cr4 (5'-tcctctccaaatgaaatgaacttc-3') (Lipp et al., 2001). Ожидаемый продукт амплификации – это фрагмент длиной 123 н.п., как показано ниже на рисунке 13.3, где праймеры p35S-cf3 и p35S-cr4 позиционированы в соответствующих участках последовательности CaMV 35S промотора (GenBank: A18053.1).

```

1561 accccacccc acgaggagca tcgtggaaaa agaagacgtt ccaaccacgt cttcaaagca
1621 agtggattga tgtgacatct ccactgacgt aagggatgac gcacaatccc actatccttc
1681 gcaagaccct tcctctatat aaggaagttc atttcatttg gagaggacac gctgaaatca

```

Рисунок 13.3 – Фрагмент CaMV 35S промотора (подчеркнуто место гибридизации с праймерами p35S-cf3 и p35S-cr4)

Выявление *nos* терминатора.

Праймеры HA-nos118-f и HA-nos118-r (Lipp et al., 2001) используются для детекции *nos* терминатора *Agrobacterium tumefaciens*. *Nos* терминатор присутствует в сое Roundup Ready® и других линиях трансгенных растений (например, в линии кукурузы Bt-11). Амплификация *nos* терминатора приведет к продукции ДНК фрагмента дли-

ной в 118 н.п. На рисунке 13.4 праймеры HA-nos118-f (5'-gcatgacgttatttatgagatggg-3') и HA-nos118-r (5'-gacaccgcgcgcgataatttatcc-3') позиционированы внутри последовательности трансгенной части сои Roundup Ready®.

```
1981 tgattatcat ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca
2041 tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc gcaattatac atttaatacg
2101 cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaaact aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta
```

Рисунок 13.4 – Фрагмент pos терминатора (подчеркнуто место гибридизации с праймерами HA-nos118-f и HA-nos118-r)

```
1601 gatccagggtg tcgccttctt tacggatect ggcgcccattg gcctgcatgg
1651 ccttgcccgt attgatgacg tctcgcctt ccagaaggcc ggtgatgcgc
GM09 >
1701 gtttcaccgc tcgcgagacc gccgaacatg aaggaccggt gggagatcga
1751 cttgtcgccg ggaatgcgga cggttccgga aaggccagag gatttgccgg
1801 cggttgcggg ccggetgctt gcaccgtgaa gcattgcaggc tgtagccact
1851 gatgctgaaa tcttaaagga acaaaacttt tgcataaaaa ttgaatcttt
1901 tttcaaaacc aacatagaat ttgctgaatt tttcagtttt ttagatccaa
GM08 >
1951 aaacaagaaa acttgaagat ttaggaactt ggggttttatg gaaattgaa
2001 ttgggattaa gggtttgtat ccttgagcc atgttggttaa tttgtgccat
p35S-cr4 >
2051 tcttgaaaga tctgctagag tcagcttgte agcgtgtcct ctccaaatga
< GM07
2101 aatgaacttc cttatataga ggaagggtct tgcgaaggat agtgggattg
< GM05 < p35S-cf3
2151 tgctcatcc cttacgtcag tggagatata acatcaatcc acttgctttg
2201 aagaactgg tggaacgtct tctttttcca cgatgctctt cgtgggtggg
2251 ggtccatctt tgggaccact gtcggcagag gcattctcaa cgatggcctt
2301 tcttttatcg caatgatggc atttgtagga gccaccttcc ttttccacta
2351 tcttcacaat aaagtgcag atagctgggc aatggaatcc gaggagggtt
2401 ccgcatatta cctttgttg aaaagtctca catcg
```

Рисунок 13.5 – Последовательность трансгенной части сои Roundup Ready® фирмы Монсанто, в соответствии с Патентом WO 92/04449

ГМО-специфичный метод ПЦР

Амплификационные праймеры, которые используют для идентификации сои Roundup Ready®, кукурузы Bt-176 и кукурузы MON810, были выбраны, вследствие их способности специфически выявлять

генетические структуры, введенные в геномы сои Roundup Ready®, кукурузы Bt-176 и кукурузы MON810, соответственно.

Специфическое выявление кассеты генов CTP/EPSPS в растениях сои Roundup Ready® Пары праймеров GMO9/GMO5 и GMO8/GMO7 были сконструированы для специфического выявления трансгена сои Roundup Ready® с помощью гнездового метода ПЦР (Meyer and Jaccoud, 1997). Внешние праймеры GMO9 и GMO5 комплементарны ДНК последовательности, соответствующей CP4 EPSPS гену и CaMV 35S промотору. В результате амплификации ДНК с двумя этими праймерами появляется продукт амплификации длиной 447 н.п. Внутренние праймеры, GMO8 и GMO7 комплементарны гену epsps петунии и CaMV 35S промотору. В результате амплификации ДНК с двумя этими праймерами появляется фрагмент длиной в 169 н.п., как показано на рисунке 13.5.

3 Количественная идентификация ГМО

Основным недостатком традиционного метода ПЦР является нехватка точной количественной информации, связанная с эффективностью амплификации. Если эффективность реакции для каждого цикла амплификации остается постоянной, то концентрация ДНК после завершения ПЦР будет прямо пропорциональна исходному количеству целевой ДНК. К сожалению, эффективность амплификации различна для различных реакций, а также для последовательных циклов одной реакции. В особенности, в последних циклах ПЦР продукты амплификации формируются не экспоненциально и с неизвестной скоростью реакции.

Количественное определение ДНК, основанное на традиционном методе ПЦР, для достижения максимальной чувствительности полагается на измерения в конечной точке, когда амплификация достигает максимального выхода продукта (известной, как «фаза плато»). На этом этапе реакция протекает вне экспоненциальной фазы, преимущественно вследствие истощения реагентов и постепенной температурной инактивации используемой полимеразы. Вследствие этого, результирующая корреляция между концентрацией конечного продукта и первоначальным числом целевых молекул очень мала.

Для решения этой проблемы были разработаны новые методики, такие как **количественно-конкурентный метод ПЦР** (quantitative-competitive, QC-PCR) и **метод ПЦР в реальном времени**, направленные на решение проблемы установления соотношения между концен-

трацией целевой ДНК и количеством ПЦР-продукта, вырабатываемого в процессе амплификации.

Количественно-конкурентный метод ПЦР

Одним из первых количественных методов ПЦР был разработан количественно-конкурентный метод ПЦР (Giacca et al., 1994; Studer et al., 1998; Hardegger et al., 1999).

Данный метод основан на ко-амплификации матрицы целевой ДНК и определенного количества внутреннего ДНК-стандарта (конкурента), несущего те же сайты связывания праймеров. Так как исходное содержание конкурента известно, и принимая, что эффективность амплификации целевой ДНК и конкурентной ДНК одинакова, соотношение количества двух продуктов ПЦР, определяемое, например, методом электрофореза, представляет собой соотношение целевой ДНК и конкурента, присутствующих в пробе до амплификации.

Как правило, конкурент является линейной плазмидой, несущей ту же нуклеотидную последовательность, что и целевая ДНК, за исключением делеции либо вставки, необходимой для получения в результате ко-амплификации двух фрагментов ДНК, отличающихся по размеру в стандартном гель-электрофорезе.

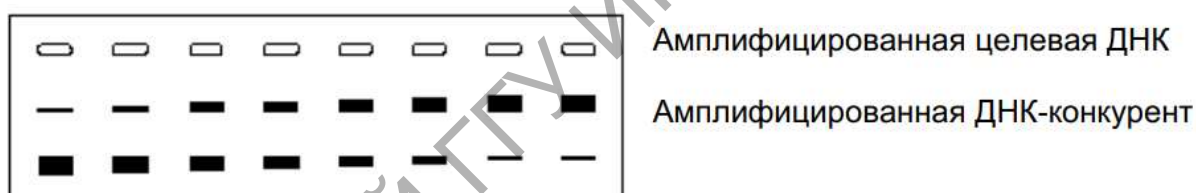


Рисунок 13.6 – Ко-амплификация фиксированного количества целевой ДНК с различными количествами ДНК-конкурента

Конкурентный метод ПЦР был успешно использован для количественного определения как ДНК, так и РНК, но его динамический охват ограничен соотношениями целевая НК- конкурент в пределах от 1:10 до 10:1. Фактически, наибольшая точность достигается при нахождении точки равновесия, при которой отношение целевой НК к конкуренту составляет 1:1 (рисунок 13.6). Для осуществления этого, должно быть протестировано несколько разведений, для того чтобы подобрать подходящее соотношение целевой последовательности и конкурента.

Другим недостатком этого подхода является необходимость конструирования и характеристики различных конкурентов к каждой целевой последовательности, которую предполагается количественно определить. Фактически, даже небольшие различия в эффективности

амплификации будут в значительной степени мешать точности количественного определения с помощью количественно-конкурентного метода ПЦР. Наконец, конкурентный метод ПЦР требует точного количественного определения продуктов амплификации целевой последовательности и конкурента по окончании реакции, что обычно связано с трудоемкими этапами обработки данных по завершении ПЦР.

Конкурентный метод ПЦР является полу-количественным методом, требующим использования стандарта (конкурента) для сравнения с образцом. Результаты могут только указывать на величину, меньшую, равную или превышающую известную концентрацию стандарта.

Система конкурентного ПЦР имеет, однако, то преимущество, что не требует приобретения специального оборудования лабораториями, так как может осуществляться на обычном лабораторном оборудовании для ПЦР и молекулярно-биологического анализа.

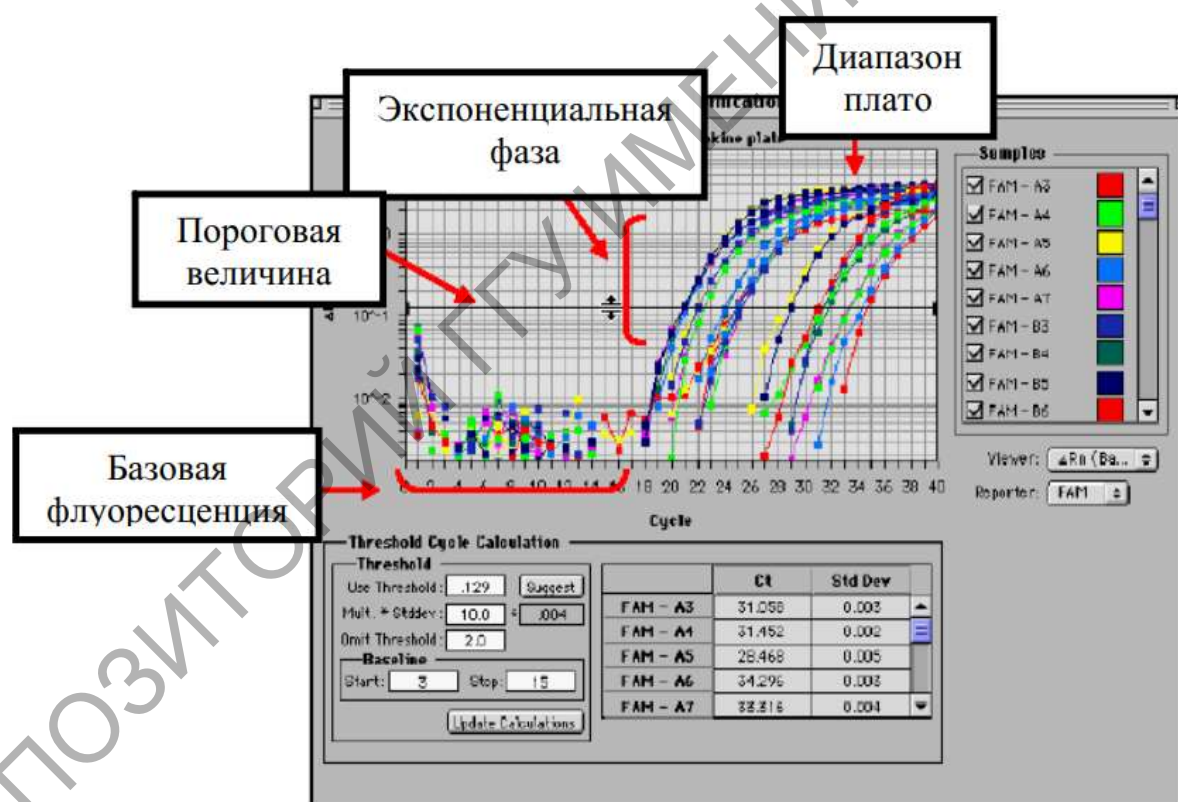


Рисунок 13.7 - Графическое изображение ПЦР в реальном времени. Выделены типичные фазы ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени

Более точная и широко используемая в настоящее время методология количественного ПЦР анализа представлена методом ПЦР в реальном времени. В противоположность определению в конечной точ-

ке, в системе ПЦР в реальном времени идет мониторинг реакции в то время, когда она в действительности происходит – в реальном времени. В этой разновидности системы ПЦР реакция совмещена с эмиссией флуоресцентного сигнала, пропорционального количеству продукта ПЦР, наработанного в последовательных циклах. Этот сигнал возрастает в прямой пропорции к количеству наработанного ПЦР продукта в каждом из последовательных циклов реакции. С помощью записи количества флуоресцентной эмиссии на каждом цикле, возможно вести мониторинг ПЦР реакции в течение экспоненциальной фазы. Первое значительное возрастание флуоресценции коррелирует с исходным количеством целевой матрицы (Ahmed, 2002).

Во время проведения ПЦР в реальном времени, данные флуоресценции (величины **Rn**) фиксируются для того, чтобы построить график зависимости величины сигнала от количества циклов (или от времени). Обычно график строят в полу-логарифмической шкале. В ПЦР в реальном времени возможно выявить три различные фазы: первая – это **«лаг»-стадия** с незначительными флуктуациями кривой, соответствующими фоновому сигналу; вторая – это **экспоненциальная фаза** с возрастающими параллельными кривыми, и третья стадия, в которой кривые имеют тенденцию выхода на **«плато»** (рисунок 13.7).

Преимущества метода ПЦР в реальном времени обусловлены тем обстоятельством, что количественное определение происходит не на конечной стадии ПЦР (плато), но на стадии, где экспоненциальный рост количества амплифицированной ДНК (**Rn** величина) достигает точки, значительно более высокой, чем для фонового сигнала.

Этот способ измерения существенно повышает точность количественного определения, так как существует прямая корреляция между начальным количеством матрицы, и стадией, на которой амплификация начинает становиться экспоненциальной. В методе ПЦР в реальном времени **пороговый цикл** (**Ct**) определяется экспериментально, как цикл, в котором флуоресцентный сигнал достигает среднего значения флуоресцентных сигналов, измеряемых между третьим и пятнадцатым циклом, плюс десять стандартных отклонений. Чем больше исходное количество геномной ДНК, тем скорее накапливающийся продукт выявляется в процессе ПЦР, и тем меньше величина **Ct**. На практике, выбор пороговой линии, определяющей величину **Ct**, часто зависит от оператора и представляет, таким образом, один из субъективных элементов в методе ПЦР в реальном времени.

Пороговая линия должна быть помещена выше уровня базовой активности и должна находиться в пределах фазы экспоненциального роста, которая кажется линейной в логарифмическом преобразовании (все кривые параллельны). В любом случае, пороговая линия должна быть расположена на уровне, где кривые для повторностей одного образца начинают максимально совпадать. Фактически, иногда случается, что в самом начале экспоненциальной фазы наблюдается небольшое расхождение для повторностей, которое уменьшается или полностью исчезает по мере проведения реакции.

Угол наклона логарифмической фазы отражает эффективность амплификации. Для того, чтобы угол наклона был индикатором реальной амплификации (а не колебания флуоресцентного сигнала), следует отмечать точку изгиба кривой. Она является начальной точкой логарифмической фазы и, более того, представляет наибольшую скорость изменений на кривой роста.

Количественное определения относительного содержания

Содержание ГМО в образце является относительной величиной – процентным содержанием количества генетически модифицированного материала по отношению к общему количеству материала. Для того, чтобы определить эту величину в системе ПЦР в реальном времени, необходимо определить содержание эндогенного контрольного гена для использования его в качестве «нормализатора», а также определить содержание ГМО-специфичной последовательности целевой ДНК.

Контрольный ген следует выбирать таким образом, чтобы он был видоспецифичным, присутствовал в виде единичной копии в гаплоидном геноме, был стабильно представлен как таковой в различных линиях данного вида, и мог амплифицироваться столь же эффективно, как и ген, определяющий внесенный признак ГМО (хотя это в большей степени зависит от правильного конструирования праймеров и зондов). Одна из проблем определения относительного содержания вытекает из официального определения процентного содержания ГМО, которое может быть определено как отношение веса чистого модифицированного ингредиента к общему весу данного ингредиента (например, отношение веса ГМ кукурузы к общему весу кукурузы, содержащейся в образце). С практической точки зрения, возможно допустить, что процентное содержание ГМО рассчитывается как число модифицированных геномов по отношению к общему числу геномов данного вида, содержащихся в образце. К сожалению, данное определение не учитывает, как устроены конкретные линии ГМО,

вследствие чего при интерпретации результатов необходимо тщательно рассматривать следующие параметры:

a. Пloidность трансформационного события. Возможно, что данное ГМ событие имеет ploидность, отличную от растения дикого типа (например, является тетраploидом вместо диплоида);

b. Зиготность трансформационного события. ГМ признак может быть гомозиготным или гетерозиготным;

c. Число вставок одной искусственной конструкции на гаплоидный геном. Одна и та же конструкция может быть вставлена как единственная копия на гаплоидный геном или в большем числе копий.

Иначе говоря, генетическая плотность (или отношение трансген/контрольный ген), соответствующая, например, 1% пороговому значению, может варьировать от одного трансформационного события к другому.

Пункт *c.* можно обойти путем конструирования системы праймер-зонд на границе вставки искусственной конструкции в геном. Так как пограничные последовательности являются уникальными, это даст системе двойное преимущество, заключающееся в том, что она является линия-специфичной, а также исключает множественность инсерций одной и той же конструкции из количественного определения. Пункты *a.* и *b.* обходят эмпирически с помощью использования контрольного материала, являющегося гомогенным по отношению к образцу (например, кукурузная мука в качестве контрольного материала для количественного анализа кукурузной муки).

Альтернативой являются стандарты для количественного анализа, отличающиеся от сертифицированных эталонных материалов (например, клонированные последовательности ДНК, или смеси геномных ДНК), которые могут быть калиброваны по отношению к сертифицированным эталонным материалам с целью корректировки молекулярных расхождений при количественном анализе. В каждом случае этот аспект количественного анализа должен приниматься во внимание при отработке метода, так как реальное количество копий определяемых последовательностей оказывает влияние как на **предел качественного выявления** (Limit of detection – LOD), так и на **предел количественного анализа** (Limit of quantification – LOQ).

Литература:

1. Jackson, D.A. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules con-

taining lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli* / D.A. Jackson [et al.] // Proc Nat Acad Sci USA. – Vol. 69. P. – 2904-2909.

2. Cohen, S.N. Recircularization and autonomous replication of a sheared R-factor DNA segment in *Escherichia coli* transformants / S.N. Cohen, A.C. Chang // Proc Natl Acad Sci USA. – 1973. – Vol., 70(5). – P.1293–1297.

3. Jaenisch, R. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA / R. Jaenisch, B. Mintz // Proc Natl Acad Sci USA. – 1974. – Vol. 71(4). – P.1250-1254.

4. Meyer, R. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products / R. Meyer [et al.] // Z. Lebensm Unters Forsch. – 1996. – Vol, 203. – P. 339-344.

5. Studer, E. Nachweis des gentechnisch veränderten «Maximizer»-Mais mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) / E. Studer [et al.] // Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmittel und Hygiene. – 1997. – Vol. 88. – P. 515–524.

6. Training Course on «The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms» (User Manual) / M. Querci, M. Jermini, G. Van den Eede, G. (Eds.). – European Commission Joint Research Centre, 2000. – 239 p.

7. The analysis of food samples for the presence of Genetically Modified Organisms – User Manual / M. Querci [et al.]. – Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2020. – 200p.

8. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.

Практические занятия по «Молекулярной диагностике»

Занятие 1. Строение биологических макромолекул.

Занятия 2-3. Анализ методов амплификации и детекции нуклеиновых кислот.

Занятие 4-5. Работа с последовательностями биополимеров: анализ получаемых данных.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

ЗАНЯТИЯ 1

Строение биологических макромолекул

ЦЕЛЬ: Ознакомиться с особенностями строения основных биологических макромолекул, закрепить полученные знания путем решения тестовых заданий.

1. Теоретическая часть

Большую роль в выяснении молекулярных основ наследственности сыграли эксперименты Ф. Гриффитса, который в 1928 г. обнаружил явление **трансформации**. Ученый вводил мышам **вирулентный** капсульный (S) и **невирулентный** бескапсульный (R) штаммы пневмококков, *Streptococcus pneumoniae*. При введении мышам вирулентного штамма S они заболевали пневмонией и погибали, а при введении невирулентного R – оставались живыми (рис. 1.1 a,b). Мыши также не погибали, если им вводили вирулентный штамм S, но убитый нагреванием (рис. 1.1c). В решающем эксперименте Гриффитс ввел смесь невирулентного штамма R со штаммом убитого нагреванием вирулентного S и получил неожиданный результат – мыши заболели пневмонией и погибли. Из погибших животных были выделены бактерии, которые обладали вирулентностью и были способны образовать капсулу (рис. 1.1d). Следовательно, живые бактерии невирулентного бескапсульного штамма R **трансформировались** – приобрели свойства убитых болезнетворных капсульных

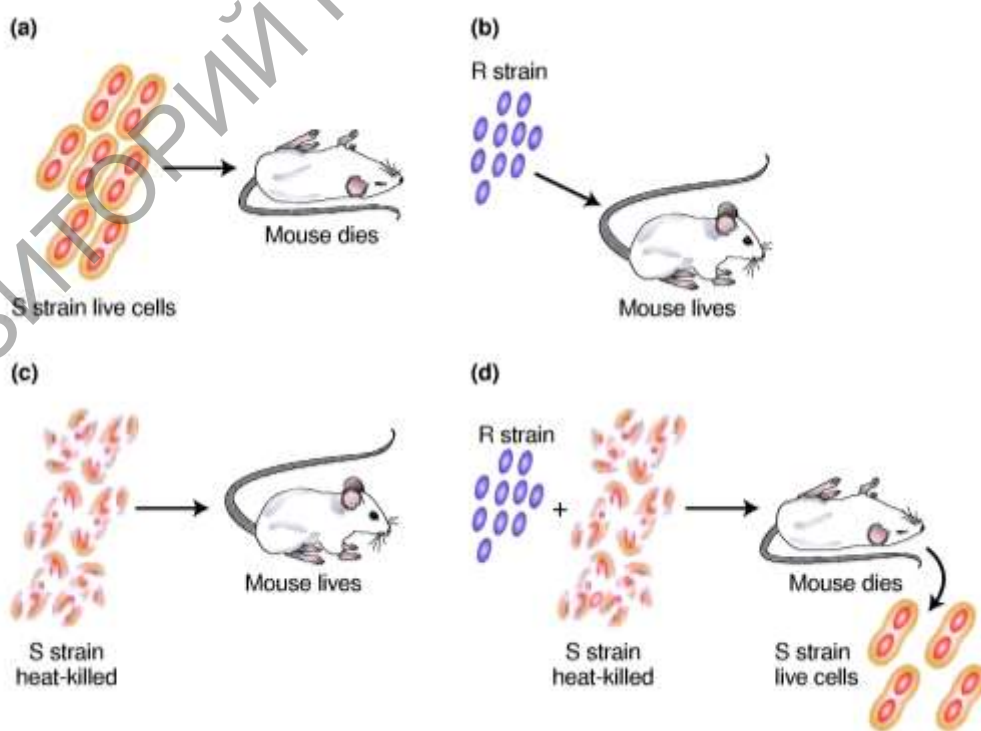


Рисунок 1.1 – Схема экспериментов Ф. Гриффитса на мышах по трансформации у пневмококков, *Streptococcus pneumoniae*

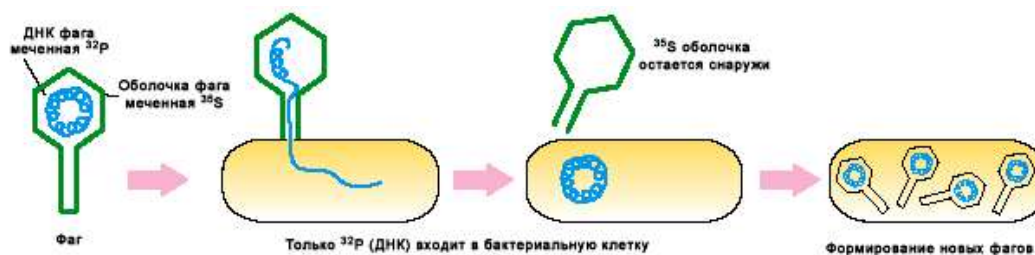


Рисунок 1.2 – Схема эксперимента Херши и Чейз, демонстрирующего, что генетическим материалом фага является ДНК

бактерий S. Однако химическая природа «**трансформирующего фактора**», обеспечивающего наследуемое превращение бактерии одного типа в другой в результате экспериментов Гриффитса, осталась неустановленной.

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

Еще одним серьезным доказательством генетической роли ДНК были эксперименты А. Херши и М. Чейз, проведенные в 1952 г. с бактериофагом T2 – вирусом бактерий, состоящим лишь из белкового чехла и упакованной в него молекулы ДНК. Белок фага T2 поместили радиоактивной серой (^{35}S), которая включается только в белок, а ДНК фага радиоактивным фосфором (^{32}P), который включается только в ДНК. После заражения бактерий мечеными фагами было установлено, что в клетку бактерии проникает только молекула ДНК, а белковая оболочка фага остается снаружи (рис. 1.2). Тем не менее, в клетках зараженных

бактерий образовалось множество зрелых частиц бактериофага T2. Это однозначно говорило о том, что **наследственная информация** о всех признаках и свойствах фага заключена в ДНК.

Эксперименты Эвери с соавторами, а также Херши и Чейз позволили сделать заключение, что именно **молекула ДНК**, по крайней мере у бактерий и фагов является носителем наследственной информации. В последующем

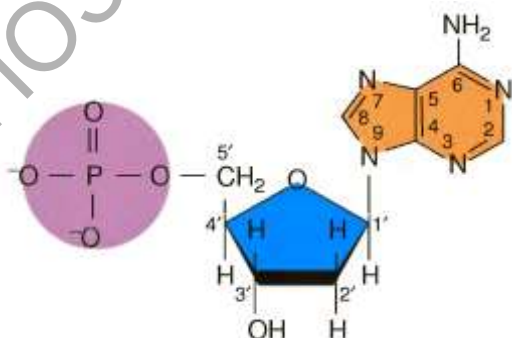


Рисунок 1.3 - Нуклеотид аденин состоящий из дезоксирибозы, остатка фосфорной кислоты и азотистого основания аденина

было установлено, что у некоторых прокариот наследственная информация зашифрована в молекулах РНК.

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

К 30-м годам XX века П. Левен с сотрудниками установил, что азотистое основание, углевод и фосфорная кислота соединены в блоки – **нуклеотиды** (рисунок 1.3), расположенные вдоль линейной молекулы нуклеиновой кислоты. Нуклеотидов оказалось четыре: **аденин, гуанин, цитозин и тимин**. Поскольку углеводный компонент оказался **дезоксирибозой**, кислота получила название **дезоксирибонуклеиновой – ДНК**. Вместе с ядерной была выделена цитоплазматическая нуклеиновая кислота, которая в качестве углевода содержала **рибозу** и поэтому получила название **рибонуклеиновой – РНК**.

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

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

В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик основываясь на данных Чаргаффа и Франклин построили пространственную модель молекулы ДНК и истолковали ее роль как носителя генетической информации. Согласно их модели **молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных комплементарных цепочек, закрученных в двойную спираль** (рисунок 1.4).

Азотистые основания нуклеотидов обеих цепей ДНК заключены внутри между витками спирали и соединены водородными связями. В соответствии с правилами Чаргаффа аденин одной цепи связан только с тимином другой цепи, а гуанин – только с цитозином. Пара **аденин-тимин** соединена двумя водородными связями, а пара **гуанин-цитозин** – тремя (рисунок 1.5). Такой

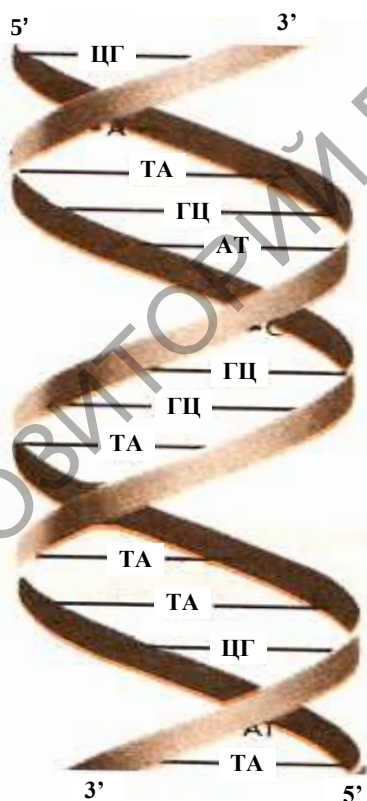


Рисунок 1.4 - Модель двухцепочечной структуры ДНК по Уотсону и Крику

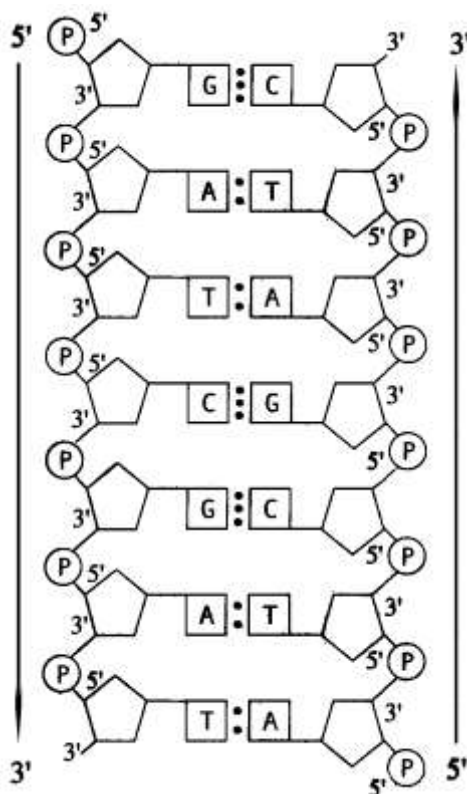


Рисунок 1.5 - Схема отрезка молекулы ДНК

порядок соответствия азотистых оснований (А=Т и Г=Ц) называется **комплементарностью**, и, следовательно, цепи в ДНК комплементарны друг другу.

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

Следует отметить, что обе цепи в молекуле ДНК имеют противоположную направленность. Межнуклеотидная связь в одной цепи имеет направление 5'-3', а в другой 3'-5' (рисунок 1.5).

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

2. Ключевые слова и понятия

Трансформация ДНК	Пурины
РНК	Пиримидины
Белок	Ф. Гриффитс
Аденин	Дж. Уотсон и Ф. Крик
Тимин	Ф. Мишер
Цитозин	Э. Чаргафф
Гуанин	О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Карти
Комплементарность	А. Херши и М. Чейз

3. Практическая часть

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

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

Тест

1. Явление трансформации открыл:
 - а) Г. Мендель в 1900 г.
 - б) Ф. Гриффитс в 1928 г.
2. Вирулентный штамм - это штамм, от которого организм:
 - а) погибает.
 - б) остается жив.
3. *Streptococcus pneumoniae* это:
 - а) штамм вызывающий заболевание пневманией.
 - б) безвредный вирус, не вызывающий заболевание.
4. Трансформирующим фактором является:
 - а) мышь.
 - б) ДНК.
5. Дезоксирибонуклеиновая кислота:
 - а) носитель наследственной информации.
 - б) инактивирующий фермент.
6. «Нуклеин»:
 - а) клейкое вещество.
 - б) нуклеиновая кислота.
7. Молекула ДНК:
 - а) высокомолекулярный полимер, состоящий из четырех дезоксирибонуклеотидов.
 - б) низкомолекулярный мономер, состоящий из двух цепочек дезоксирибонуклеотидов.
8. Азотистые основания:
 - а) компоненты нуклеиновой кислоты.
 - б) компоненты фосфорной кислоты.
9. Аденин, гуанин:
 - а) пуриновые основания.
 - б) пиримидиновые основания.
10. Цитозин, тимин:
 - а) пуриновые основания.
 - б) пиримидиновые основания.
11. Нуклеотид:
 - а) соединение азотистого основания, углевода и фосфорная кислота.
 - б) ядро.
12. Дезоксирибоза:
 - а) азотистое основание ДНК.
 - б) углеводный компонент ДНК.
13. Рибоза:

- а) азотистое основание ДНК.
- б) углеводный компонент ДНК.

14. Рибонуклеиновая кислота (РНК):

- а) цитоплазматическая нуклеиновая кислота, которая в качестве углевода содержит рибозу.
- б) двух цепочечная молекула, которая в качестве углевода содержит дезоксирибозу.

15. Правила Чаргаффа:

- а) $(A+G=T+C)$ $(A=T)$ $(G=C)$.
- б) $(A+T=G+C)$ $(A=C)$ $(G=T)$.

16. Двойная спираль:

- а) две полинуклеотидные комплементарные цепочки ДНК.
- б) две полинуклеотидные комплементарные цепочки РНК.

17. Принцип комплементарности:

- а) А-Т и Г-Ц.
- б) А-Г и Т-Ц.

18. Репликация:

- а) процесс точного самовоспроизведения молекул нуклеиновых кислот.
- б) разрезающие ДНК по определенным нуклеотидным последовательностям.

19. Полуконсервативный принцип:

- а) материнская молекула ДНК состоит из двух «старых» цепей.
- б) дочерняя молекула ДНК состоит из одной «старой» и одной «новой» цепей.

20. Точка инициации (ori):

- а) место начала репликации молекул ДНК.
- б) место окончания репликации молекул ДНК.

21. Репликационная вилка:

- а) столовый прибор.
- б) одноцепочечные участки ДНК, которые становятся матрицами для репликации.

22. Геликаза:

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

23. Белки SSBP:

- а) не позволяют одноцепочечным участками ДНК вновь соединиться в двойную спираль.
- б) соединяют одноцепочечные участки ДНК в двойную спираль.

24. Топоизомераза (ДНК-гираза):

- а) снимает возникающую суперскрученность и напряжение в нерас-

крученной части ДНК репликационной вилки (ДНК-гираза у прокариот).

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

25. ДНК-полимераза:

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

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

26. Праймаза:

а) РНК-полимераза.

б) ДНК-полимер.

27. РНК-праймер:

а) длинный (~1000 нуклеотидов) фрагмент РНК.

б) короткий (~10 нуклеотидов) фрагмент РНК.

28. Лидирующая цепь:

а) начинается на материнской цепи, идущей от точки инициации в направлении 3'-5' и идет непрерывно в виде сплошной линии.

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

29. Фрагменты Оказаки:

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

б) фрагменты в виде сплошной линии.

30. Запаздывающая цепь:

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

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

31. Лигаза:

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

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

32. Урацил:

а) азотистое основание РНК.

б) азотистое основание ДНК.

33. Информационная РНК (и-РНК):

а) активный участник репликации.

б) активный участник трансляции.

34. Транскрипция:

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

б) денатурация белка.

35. РНК-полимеразы:

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

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

36. Матричная цепь 3'-5':

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

б) цепь РНК, служит для синтеза ДНК.

37. Промотор:

а) участок гена иницирующий трансляцию.

б) участок гена иницирующий транскрипцию.

38. «ТАТА-бокс»:

а) участок промотора перед геном.

б) геном боксёра.

39. Интрон:

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

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

40. Экзон:

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

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

41. Первичный транскрипт (про-мРНК):

а) РНК содержащая интроны и экзоны.

б) РНК содержащая только интроны.

42. Сплайсинг:

а) процесс удаления из про-мРНК экзонов.

б) процесс удаления из про-мРНК интронов.

43. КЭП (метилированный гуанин):

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

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

44. Поли-А хвост:

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

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

45. Зрелая и-РНК:

а) экзоны, КЭП и поли-А хвост.

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

46. Алкаптонурия:

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

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

47. Один ген - один белок:

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

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

48. Генетический код:

а) система записи наследственной информации в молекулах нуклеиновых кислот.

б) система записи генетических символов.

49. Триплет:

а) три рядом стоящих нуклеотида.

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

50. Кодон:

а) три рядом стоящих аминокислоты, кодирующих один нуклеотид.

б) три рядом стоящих нуклеотида, кодирующих одну аминокислоту.

51. Стоп-кодон:

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

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

52. Основные свойства генетического кода:

а) обобщенность, консервативность, моногенность, универсальность.

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

53. Трансляция:

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

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

54. Транспортная РНК (т-РНК) :

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

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

55. Акцепторный триплет ЦЦА:

а) к нему присоединяется специфическая аминокислота.

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

56. Антикодон:

а) к нему присоединяется специфическая аминокислота.

б) специфический триплет, с помощью которого тРНК «узнает» со-

ответствующий комплементарный кодон в иРНК.

57. Рибосома:

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

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

58. Рибосомная РНК (р-РНК):

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

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

59. Единица Сведберга (S) характеризует:

а) скорость седиментации при центрифугировании.

б) размер субъединиц рибосом.

60. Аминоацил-тРНК-синтетаза:

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

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

61. Аминоацил-тРНК (aa-тРНК):

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

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

62. Инициация:

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

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

63. Кодон инициации АУГ:

а) сигнал инициации трансляции.

б) сигнал инициации транскрипции.

64. Элонгация:

а) удлинение нуклеотидной цепи путем добавления новых нуклеотидов.

б) укорочение нуклеотидной цепи путем убавления нуклеотидов.

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

а) соединяет предшествующую аминокислоту с аминогруппой вновь пришедшей аминокислоты.

б) отсоединяет вновь пришедшую аминокислоту.

66. Аминоацильный центр:

а) малая субъединица рибосомы.

б) большая субъединица рибосомы

67. Пептидильный центр

а) малая субъединица рибосомы.

б) большая субъединица рибосомы.

68. Терминация:

а) блокирует дальнейшую элонгацию цепи.

б) активизирует дальнейшую элонгацию цепи.

69. Пептидная связь

а) -CO-NH-.

б) -COOH-.

70. Четыре структуры белка:

а) первичная, вторичная третичная и четвертичная.

б) А, Т, Г, Ц.

71. Четвертичная структура белка:

а) несколько полипептидных цепей с третичной структурой объединенных в единый комплекс.

б) Четыре полипептидные цепей с первичной структурой объединенных в единый комплекс.

Литература

1. Жимулев, И.Ф. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. - Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с.

2. Методы молекулярной генетики и геной инженерии / А.В. Мазин [и др]. - Новосибирск: Наука. – 1990. – 248 с.

4. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.

5. Modern genetic analysis. Griffiths et al. - Freeman and company. New York. 1999. - 675 p.

6. Snustad, P. Principles of genetics / P. Snustad, M. Simmons. – New York: John Wiley & Sons, 1999. – 876 p.

7. An introduction to genetic analysis. – Griffiths [et al.]. – New York: Freeman and company. – 2000. – 730 p.

8. Попов, В.В. Геномика с молекулярно-генетическими основами / В.В. Попов. – М.: Книжный дом «Либроком», 2009. – 304 с.

ЗАНЯТИЯ 2-3

Анализ методов амплификации и детекции нуклеиновых кислот.

ЦЕЛЬ: Изучить особенности методов амплификации и детекции нуклеиновых кислот. Закрепить полученные знания путем решения задач.

1. Теоретическая часть

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

Ситуация радикально изменилась благодаря появлению метода, который был разработан К. 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 (**Таг-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 (рисунок 2.1).

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

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 Tag-полимераза была выделена из термофильных бактерий *Thermus aquaticus*, и отличается устойчивостью к высокой температуре. При температуре 70°C гибриды праймер-ДНК не денатурируют, а Tag-полимераза способна работать с большой скоростью. За 20 циклов амплификации количество копий ДНК достигает величины 10^6 .

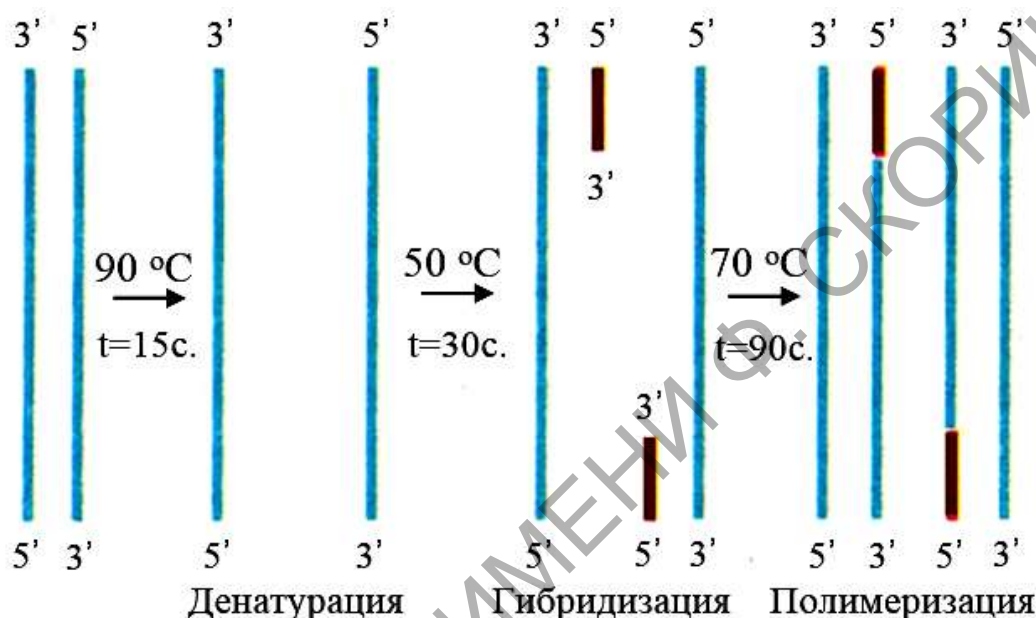


Рисунок 2.1 – Схема стадий одного цикла амплификации (размножения) фрагмента ДНК с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Создание специального прибора – **амплификатора**, позволило проводить все три стадии размножения ДНК автоматически, что превратило процесс **ПЦР-амплификации** конкретной последовательности ДНК в простую задачу. За разработку метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в 1993 г. К. Мюллис (K. Mullis) был удостоен звания лауреата Нобелевской премии.

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

Первый прямой метод определения последовательности ДНК был предложен Ф. Сэнгером в 1975 г. Он основан на элонгации ДНК при помощи фермента ДНК-полимеразы. Этим способом была быстро секвенирована короткая ДНК фага фх174, длиной 5,4 кб.

Столь же мощный метод секвенирования ДНК был разработан А. Максамом и У. Гилбертом в 1977 г. в Гарвардском университете. С его помощью менее чем за год удалось установить последовательность ДНК для вируса sv-40 (5,2 кб) и плазмиды pBR322 (4,3 кб).

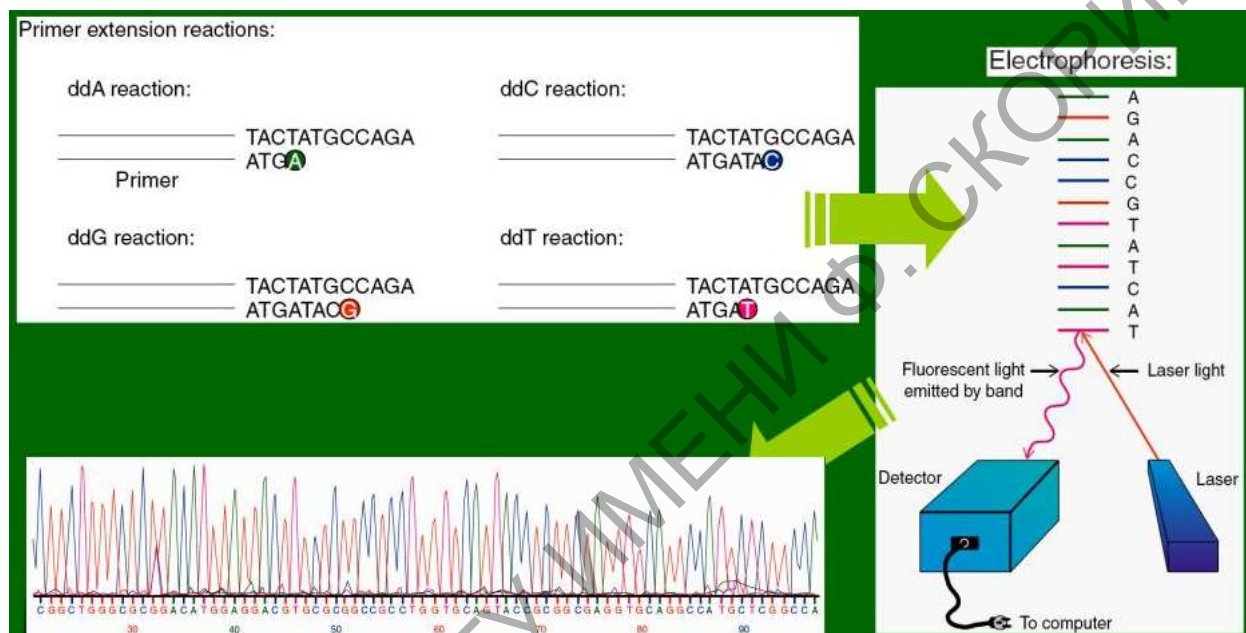


Рисунок 2.2 – Схема автоматизации процесса секвенирования

Автоматизация процесса секвенирования была проведена только в 1986 г. Л. Худом. Он предложил усовершенствовать метод Сэнгера и вместо радиоактивных меток при анализе последовательностей ДНК стал использовать флуорисцентные красители разного цвета для четырех дидезоксинуклеотидов – ddNTP (рисунок 2.2).

2. Ключевые слова и понятия

ИЦР <i>Thermus aquaticus</i> К. Мюллис Денатурация Гибридизация праймеров Полимеризация	Секвенирование ДНК Ф. Сэнгер А. Максам и У. Гилберт Л. Худ Праймер флуоресцентный краситель
---	---

3. Практическая часть

Задание 1. Разобрать ключевые слова и понятия, полученный результат записать в рабочую тетрадь.

Задание 2. Закрепить полученные знания путем решения задач.

3.1. В 17-й хромосоме человека находится ген (ACE), кодирующий важный белок, который называется **ангиотензин-превращающий фермент** (angiotensin converting enzyme, ACE). Молекулярные генетики проанализировали этот ген и установили полную его нуклеотидную последовательность. Ген ACE имеет величину более 23 тыс. нуклеотидных пар и состоит из 26 экзонов и 25 интронов (рисунок 2.3).

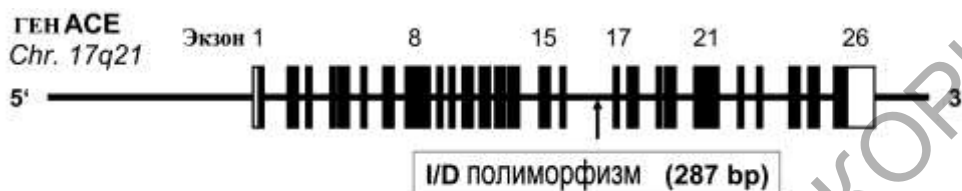


Рисунок 2.3 – Структура гена ангиотензин-конвертирующего фермента человека

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

Ученые, с помощью метода ПЦР-анализа научились амплифицировать фрагмент ДНК из 16-го интрона величиной около 0,5 кб, в котором локализована делеция. При электрофорезе в агарозном геле фрагменты ДНК в которых не произошло делеции (I) и с делецией (D) легко отделяются друг от друга. Ниже представлен электрофоретический спектр фрагментов ДНК этого участка у 6 человек (рисунок 2.4).

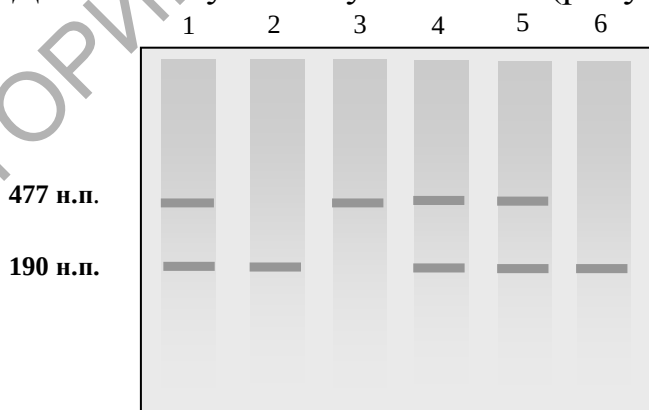
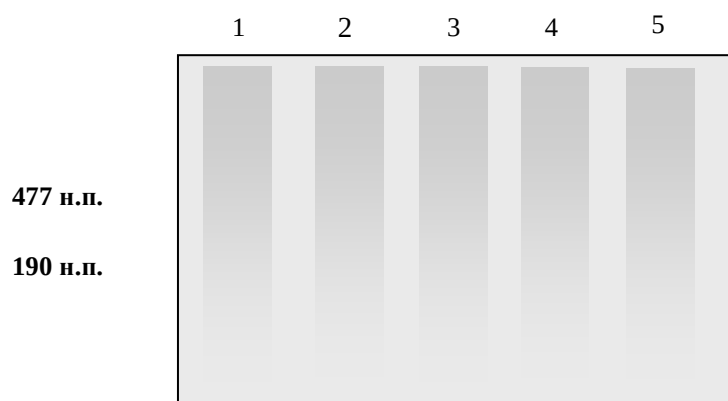


Рисунок 2.4 – Электрофореграмма спектра ДНК-фрагментов из 16-го интрона у 6 представителей европейской расы.

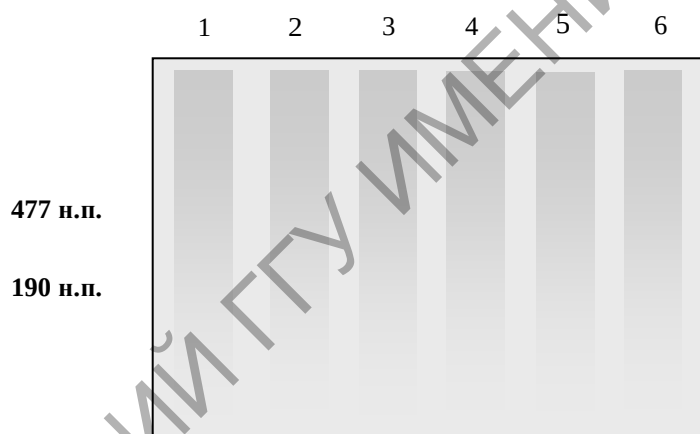
Определите генотипы этих людей по двум аллелям I и D гена ACE.

3.2. При анализе полиморфизма по аллелям I и D гена ACE у спортсменов-гребцов высокого класса были обнаружены следующие генотипы: 1-3 – I/D, 4 – I/I, 5 – I/D.



Изобразите схематически на электрофореграмме спектры фрагментов ДНК у этих спортсменов.

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



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

```

1321  5'tcaagcacgc ccctcacagg actgctgagg ccctgcaggt
1361  gtctgcagca tgtgcccagg ccggggactc tgtaagccac
1401  tgctggagac cactcccatc ctttctccca tttctctaga
1441  cctgctgcct atacagtcac ttttttttttt tttttgagac
1481  ggagtctcgc tctgtcgccc aggctggagt gcagtggcgg
1521  gatctcggct cactgcaacg tccgcctccc gggttcacgc
1561  cattctcctg cctcagcctc ccaagtagct gggaccacag
1601  cgccccgcac tacgcccggc taattttttg tatttttagt
1641  agagacgggg tttcaccggt ttagccggga tggtctcgat

```

```

1681   ctcctgacct cgtgatccgc ccgcctcggc ctcccaaagt
1721   gctgggatta caggcgtgat acagtcactt ttatgtgggtt
1761   tcgccaattt tattccagct ctgaaattct ctgagctccc
1801   cttacaagca gaggtgagct aagggtctgga gctcaagcca
1841   ttcaaccccc taccag3'

```

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

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

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

16 интрон

```

1381   5'ccgggggactc tgtaagccac tgctggagac cactcccatc
1421   ctttctccca tttctctaga cctgctgcct atacagtcac
1461   ttttttttttt tttttgagac ggagtctcgc tctgtcgccc
1501   aggctggagt gcagtggcgg gatctcggct cactgcaacg
1541   tccgcctccc gggttcacgc cattctcctg cctcagcctc
1581   ccaagtagct gggaccacag cgcccgccac tacgcccggc
1621   taatttttttg tatttttagt agagacgggg ttccaccgtt
1661   ttagccggga tggctctgat ctcctgacct cgtgatccgc
1701   ccgcctcggc ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgat
1741   acagtcactt ttatgtgggtt tcgccaattt tattccagct
1781   ctgaaattct ctgagctccc cttacaagca gaggtgagct
1821   aagggtctgga gctcaagcca ttcaaccccc taccag3'

```

17 экзон

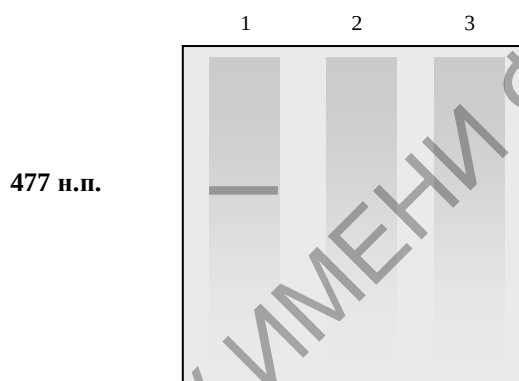
```

1   5'atc tgacgaatgt gatggccacg tcccggaaat atgaagacct
51   gttatgggca tgggagggct ggcgagacaa ggcggggaga
91   gccatcctcc agttttaccc gaaatacgtg3'

```

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

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



3.8. Ген **ACTN3** у человека локализуется в длинном плече хромосомы 11 и кодирует белок α – **актинин-3**, выполняющий важную структурную роль в Z-дисках. Этот белок упорядочивает массив актиновых миофибрилл, а также взаимодействует с рядом сигнальных белков и

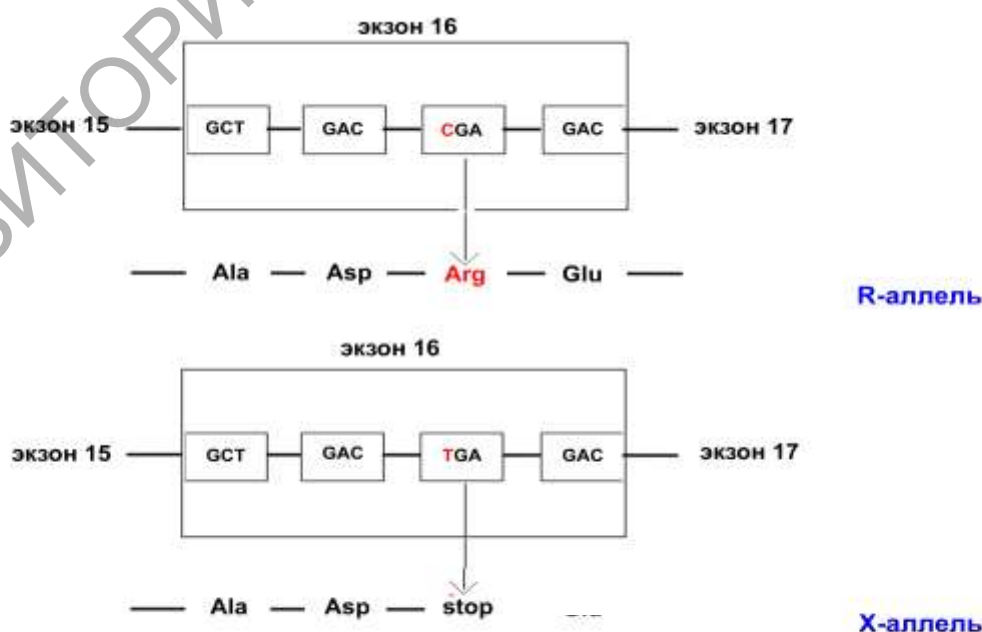


Рисунок 2.5 – Схема однонуклеотидной замены С/Т в 16-м экзоне ACTN3

ферментов. Дефицит α -актинина-3 в быстросокращающихся волокнах скелетных мышц снижает скоростно-силовые возможности человека.

В ходе молекулярно генетического анализа было установлено, что причиной недостатка белка α -актинина-3 является однонуклеотидная мутация в результате которой, в 16-м экзоне гена ACTN3 цитозин в 577-м триплете замещается на тимин. Точечная мутация приводит к тому, что триплет, кодирующий аминокислоту аргинин (CGA), превращается в стоп-кодон (TGA), и синтез полипептидной цепи α -актинина-3 прерывается (рисунок 2.5). Таким образом, в популяциях человека встречается два аллеля гена ACTN3 – нормальный 577R и мутантный 577X, которые определяют три генотипа – RR, RX и XX. У лиц гомозиготных по X-аллелю белок α -актинин-3 в мышцах отсутствует, и они не могут добиться высоких достижений в силовых видах спорта.

Ученые, с помощью ПЦР-анализа разработали метод амплификации ДНК из 16-го экзона, в котором находится точечная мутация. Оказалось, что в последовательности ДНК 16-го экзона мутантного аллеля 577X имеется сайт рестрикции для рестриктазы **Ddel (CTNAG)**, в то время как в нормальном -- 577R такого сайта нет. Поэтому после разрезания рестриктазой Ddel продукты 577R аллеля будут состоять из двух фрагментов величиной 205 и 86 н.п., а продукты мутантного аллеля 577X – из трех фрагментов величиной 108, 97 и 86 н.п. соответственно. При электрофорезе в 10% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием этидиум бромидом эти фрагменты можно отделить друг от друга. Ниже представлен электрофоретический спектр фрагментов ДНК этого участка у 6 человек европейской расы (рисунок 2.6).

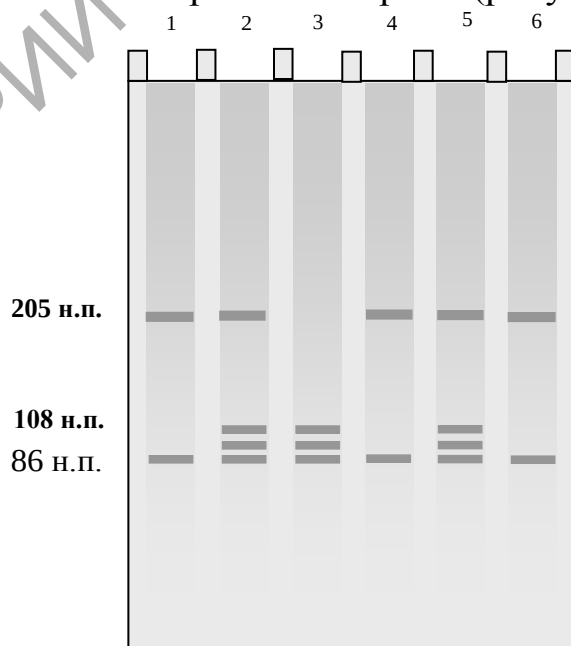
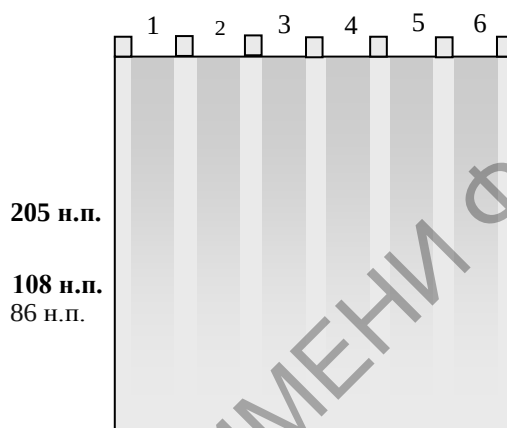


Рисунок 2.6 – Электрофореграмма спектра амплифицированных с последующей рестрикцией ДНК-фрагментов из 16-го экзона у представителей европейской расы.

Определите генотипы этих людей по двум аллелям 577R и 577X гена АСТN3.

3.9. Почему на электрофореграмме рисунок 5 спектра амплифицированных с последующей рестрикцией ДНК-фрагментов из 16-го экзона в образце 3 отсутствует фракция величиной 205 нуклеотидных пар?

3.10. При анализе полиморфизма по аллелям 577R и 577X гена АСТN3 у спортсменов-борцов уровня мастеров спорта были обнаружены следующие генотипы: 1-2 – RR, 3,5 – RX, 4,6 – RR. Изобразите схематически на электрофореграмме спектры фрагментов ДНК из экзона 16 у этих спортсменов.



3.11. Электрофоретический спектр амплифицированных с последующей рестрикцией ДНК-фрагментов из 16-го экзона гена АСТN3 у детей спортивной школы представлен ниже (рисунок 2.7). Определите генотипы детей по двум аллелям 577R и 577X. Кто из них скорее всего не сможет добиться высоких результатов в силовых видах спорта?

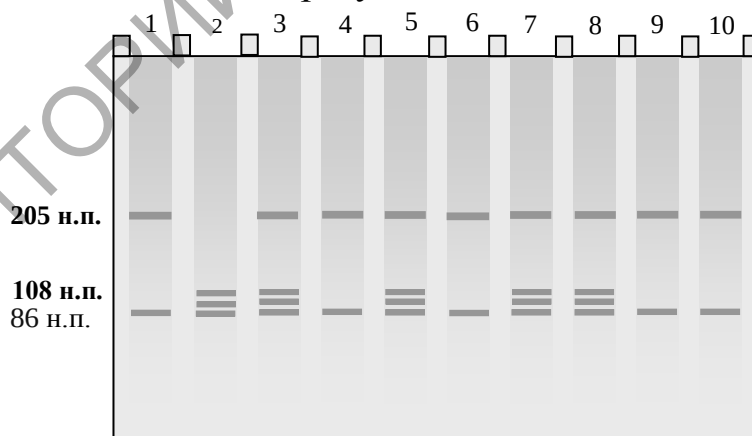


Рисунок 2.7 – Электрофореграмма спектра амплифицированных с последующей рестрикцией ДНК-фрагментов из 16-го экзона у детей спортивной школы.

3.24. Ниже приведена часть последовательности геномной ДНК гена АСТN3 от 18541 до 18961 нуклеотида, которая включает 15-й экзон и участки прилегающих интронов (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank ID: X62855.1, NG_013304.1). Нуклеотиды экзона 15 выделены черным.

18541	cttgtgtcag	gactgcccag	gactgggtggg	tggcctgggg
18581	cacactgctg	cccttttctgt	tgctgtgtgg	aagtggggga
18621	caccagctga	cacttcctgc	ctgtcgtccc	cag agcctgc
18661	tgacagcgca	cgatcagttc	aaggcaacac	tgcccagaggc
18701	tgaccgagag	cgaggtgcc	tcatgggcat	ccaggggtgag
18741	atccagaaga	tctgccagac	gtatgggctg	cggccctgct
18781	ccaccaatcc	ctacatcacc	ctcagcccg	aggacatcaa
18821	caccaagtgg	gatatggtca	gtgccacctg	cagccttcct
18861	cccaccccct	cctgcatact	gtgaccaccc	tgaaatctcg
18901	ggtggcccaa	gatatggaga	ataaagtcca	tcttcagatg
18941	tgggggtctgc	cacagactcc		

На сколько частей распадется эта ДНК, если разрезать ее рестриктазой Ddel?

3.25. Найдите и отметьте сайты для узнавания рестриктазой Ddel в последовательности ДНК гена ACTN3 приведенной ниже. Это последовательность ДНК нормального (577R) или мутантного (577X) аллеля?

18541	cttgtgtcag	gactgcccag	gactgggtggg	tggcctgggg
18581	cacactgctg	cccttttctgt	tgctgtgtgg	aagtggggga
18621	caccagctga	cacttcctgc	ctgtcgtccc	cag agcctgc
18661	tgacagcgca	cgatcagttc	aaggcaacac	tgcccagaggc
18701	tgactgagag	cgaggtgcc	tcatgggcat	ccaggggtgag
18741	atccagaaga	tctgccagac	gtatgggctg	cggccctgct
18781	ccaccaatcc	ctacatcacc	ctcagcccg	aggacatcaa
18821	caccaagtgg	gatatggtca	gtgccacctg	cagccttcct
18861	cccaccccct	cctgcatact	gtgaccaccc	tgaaatctcg
18901	ggtggcccaa	gatatggaga	ataaagtcca	tcttcagatg
18941	tgggggtctgc	cacagactcc		

3.26. Какой будет состав прямого праймера (F), размером в 22 нуклеотида, если мы хотим в последовательности ДНК из предыдущей задачи (3.25) амплифицировать вместе с экзоном и предшествующий фрагмент интрона величиной 57 нуклеотидов.

3.27. Прямой праймер (F) для амплификации экзона **15** и предшествующего фрагмента интрона из задачи (3.25) имеет следующую последовательность: 5'-CTGTTGCCTGTGGTAAGTGGG-3'.

Какой будет состав обратного праймера (R), содержащего 22 нуклеотида, если мы хотим амплифицировать участок ДНК из задачи (3.25), содержащий экзон, предшествующий фрагмент интрона величиной 57 нуклеотидов и 51 нуклеотид начальной части последующего интрона.

3.28. Используя последовательность, приведенную в задаче 3.25, определите какой величины будет амплифицированный фрагмент если для амплификации были выбраны праймеры следующего состава: прямой (F) – 5'-CTGTTGCCTGTGGTAAGTGGG-3', обратный (R) – 5'-TGGTCACAGTATGCAGG-AGGG-3'.

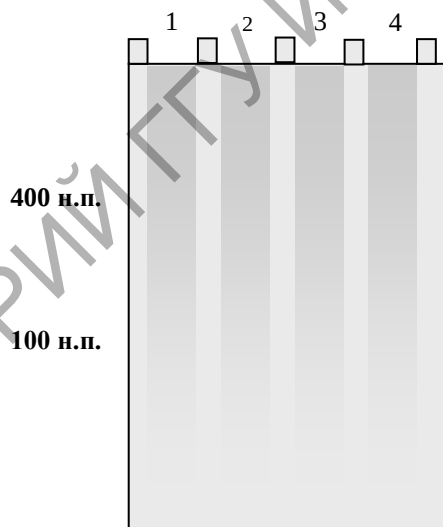
3.29. Ниже приведена последовательность амплифицированного фрагмента геномной ДНК гена ACTN3 с использованием прямого и обратного праймеров из задачи 3.28.

```

ctgt
tgctgtggt aagtggggga caccagctga cacttcctgc
ctgtcgtccc cagagcctgc tgacagcgca cgatcagttc
aaggcaacac tgcccgaggc tgactgagag cgaggtgcca
tcatgggcat ccagggtgag atccagaaga tctgccagac
gtatgggctg cggccctgct ccaccaatcc ctacatcacc
ctcagcccg aggacatcaa caccaagtgg gatatggtca
gtgccacctg cagccttctt cccacccctt cctgcatact
gtgacca

```

Какой величины фрагменты получатся при разрезании этой ДНК рестриктазой Ddel? И как будет выглядеть их спектр на электрофореграмме в 10%-ном полиакриламидном геле?



Патологии мышц у таких людей не наблюдается, так как α -актинин-2 компенсирует его отсутствие в быстросокращающихся мышечных волокнах. Наличие нормального 577R-аллеля свидетельствует о присутствии в скелетных мышцах белка α -актинина-3, что дает индивидуумам преимущество в проявлении скоростно-силовых физических качеств.

Литература

1. Жимулев, И.Ф. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. - Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с.

2. Методы молекулярной генетики и геной инженерии / А.В. Мазин [и др]. - Новосибирск: Наука. – 1990. – 248 с.
4. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.
5. Modern genetic analysis. Griffiths et al. - Freeman and company. New York. 1999. - 675 p.
6. Snustad, P. Principles of genetics / P. Snustad, M. Simmons. – New York: John Wiley & Sons, 1999. – 876 p.
7. An introduction to genetic analysis. – Griffiths [et al.]. – New York: Freeman and company. – 2000. – 730 p.
8. Попов, В.В. Геномика с молекулярно-генетическими основами / В.В. Попов. – М.: Книжный дом «Либроком», 2009. – 304 с.

ЗАНЯТИЯ 4-5

Работа с последовательностями биополимеров: анализ получаемых данных.

ЦЕЛЬ: Ознакомиться с выравниванием нуклеотидных и аминокислотных последовательностей и установлением филогении, закрепить полученные знания путем решения задач.

1. Теоретическая часть

Выравниванием (alignment) последовательностей азотистых оснований в нуклеиновых кислотах или аминокислот в полипептидных цепях белков называют определение взаимного соответствия остатков (нуклеиновых оснований или аминокислотных остатков, соответственно) в этих двух или нескольких последовательностях, при котором сохраняется исходный порядок остатков в последовательностях.

Выравнивание последовательностей – это основной инструмент молекулярной диагностики, геномики и биоинформатики (**биоинформатика** – это наука о хранении, извлечении, организации, анализе, интерпретации и использовании биологической информации), его проводят с целью установления структурных, функциональных и эволюционных отношений между последовательностями.

Биологические макромолекулы являются результатом молекулярной эволюции. Поэтому если две такие биомacroмолекулы имеют общего предка, значит и последовательности мономеров в таких макромолекулах содержат общую предковую последовательность, и как правило, обнаруживают подобие в сочетаниях мономеров, в структурах и в биологических функциях.

Например, если открыта новая последовательность с неизвестной функцией, но при этом в базах данных могут быть найдены подобные ей последовательности с ранее установленными структурами и функциями, то результаты выравнивания (сравнения) этой новой последовательности с уже исследованными последовательностями могут стать основанием для предсказания функции или структуры этой новой последовательности.

Одна из целей выравнивания последовательностей состоит в том, чтобы определить степень подобия двух последовательностей и, если она достаточно высока, сделать правдоподобное заключение об их гомологичности.

При передаче генетической информации от предыдущего поколения следующему она несколько изменяется во время процесса копирования. Изменения, которые происходят в процессе расхождения от об-

щего предка, могут быть трёх типов: замены, вставки и удаления (выпадения).

Эти изменения могут накапливаться от поколения к поколению. Через несколько тысяч поколений в последовательностях может наблюдаться значительное число расхождений. Сравнение двух предположительно гомологичных последовательностей показывает степень их расхождения, то есть силу эволюционных изменений.

Выравнивание последовательностей – это процедура сравнения двух (*парное выравнивание*) или нескольких (*множественное выравнивание*) последовательностей путём поиска рядов отдельных элементов или характерных комбинаций элементов последовательностей, которые расположены в выравниваемых последовательностях в одинаковом порядке.

При выравнивании двух последовательностей их помещают в две строки друг над другом, записывая их с помощью букв алфавита.

Идентичные или подобные "буквы" (элементы) этих строк (последовательностей) сдвигают в пределах строки (не меняя исходного порядка следования "знаков") таким образом, чтобы они выстраивались друг под другом в соответствующих столбцах.

Неидентичные, или различные знаки либо помещают в одни и те же столбцы как несовпадения, либо вставляют напротив них во второй последовательности пропуски.

Рассмотрим для примера две строки:

1) abcde

2) acdef

Разумное выравнивание выглядит так:

```
abcde-  
a-cdef
```

Для того чтобы найти оптимальное (или наилучшее) выравнивание необходимо определить критерий качества выравнивания. Так, для последовательностей нуклеотидов gctgaacg и ctataatc возможны следующие выравнивания:

- | | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| 1. Неинформативное выравнивание | -----gctgaacg
ctataatc----- |
| 2. Выравнивание без пропусков | gctgaacg
ctataatc |
| 3. Выравнивание с пропусками | gctga-a--cg
--ct-ataatc |
| 4. Ещё одно выравнивание | gctg-aa-cg
-ctataatc- |

Интуитивно кажется, что последнее выравнивание является лучшим, поскольку в нём получено максимальное число совпадений для нуклеотидов в двух последовательностях и использовано минимальное число вставок.

Чтобы решить, является ли оно лучшим из всех возможных, необходимо иметь способ систематической проверки всех возможных выравниваний, иметь количественный критерий ("вес" ("weight") или счёт ("score")), по которому возможно сравнивать качество различных выравниваний и определить выравнивание с оптимальным весом (счётом).

При этом от того, какая именно система оценки выбрана для такого сравнения, может зависеть результат сравнения, и даже незначительные изменения в схеме оценки могут изменить рейтинг выравниваний, из-за чего лучшим станет другое выравнивание.

Разделяют несколько типов выравнивания.

* *Глобальное выравнивание* – это выравнивание всей последовательности относительно другой последовательности.

```
я.люблю.тебя,.жизнь,.Что.само-.по.себе-.и.не.ново.  
|||||  
я.люблю.тебя,.жизнь,.я.люблю.тебя.снова.и.--снова.
```

Здесь символом "|" обозначены соответствия, "пробелы" обозначают несоответствия, "-" обозначает те вставки (инсерции, от *insertion*) и удаления (делеции, от *deletion*), которые необходимо сделать в обеих последовательностях, чтобы достичь максимального количества соответствий.

* *Локальное выравнивание* – это поиск части последовательности, которая совпадает с частью другой последовательности.

```
Ящик, не гони лошадей! Мне некуда больше спешить,  
|||||  
Мне некого больше любить, Ящик, не гони лошадей!
```

Для локального совпадения выступающие концы не рассматриваются как пропуски (делеции). В дополнение к несовпадениям, возможны также вставки и удаления внутри совпадающей части.

Поиск мотивов совпадения – это поиск совпадения короткой последовательности в одном или более отрезках длинной последовательности. В этом случае допускается несовпадение одного символа. Можно также потребовать полного совпадения, либо допустить большее число несовпадений или даже пропусков.

Для примера, найдём мотивы «Я люблю» совпадения для строк

Последующая дивергенция различных копий исходного гена тубулина сформировала гены-предки нынешних генов α - и β -тубулина. По мере того, как различные виды дивергировали от этих эукариотических клеток-предков, каждая из этих генных последовательностей также дивергировала, породив, тем самым, слегка отличающиеся формы α - и β -тубулинов, которые сейчас можно найти в каждом организме.

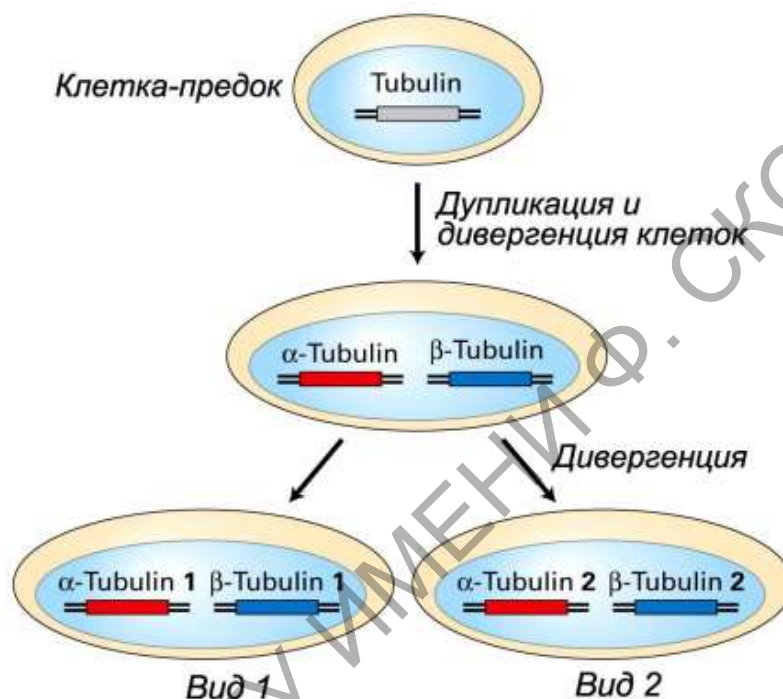


Рисунок 6.1 – Образование различных тубулиновых генов в ходе эволюции эукариот

Сравнительный анализ последовательностей нуклеотидов в ДНК и аминокислот в белках потребовал развития традиционного понятия гомологии. При анализе последовательностей принято различать ортологию и паралогию.

Гомологичные последовательности называют *ортологичными*, если к их разделению привел акт видообразования: если ген существует у некоторого вида, который дивергирует с образованием двух видов, то копии этого гена у дочерних видов называются *ортологами*.

Гомологичные последовательности называют *паралогичными*, если к их разделению привело удвоение (дупликация) гена: если в пределах одного организма в результате хромосомной мутации произошла дупликация гена, то его копии называют *паралогами*.

Ортологи обычно выполняют идентичные или сходные функции. Это не всегда справедливо в отношении паралогов. Ввиду отсутствия давления отбора на одну из копий гена, подвергнувшегося удвоению, эта копия получает возможность беспрепятственно мутировать далее, что может привести к возникновению новых функций.

В случае тубулина паралогичными являются генные последовательности α - и β -тубулинов, которые дивергировали в результате дупликации генов. А ортологичными в случае тубулина являются те генные последовательности, которые возникли в результате видообразования – гены α -тубулина у различных видов, или гены β -тубулина у различных видов. Оценивая степень подобия тубулинов, имеющихсся в настоящее время в различных организмах, можно определить их эволюционное родство (рисунок 6.2). На рисунке представлена *филогенетическая схема* (phylogenetic tree), точнее *кладограмма* (cladogram), представляющая взаимоотношения и родство между последовательностями тубулина.

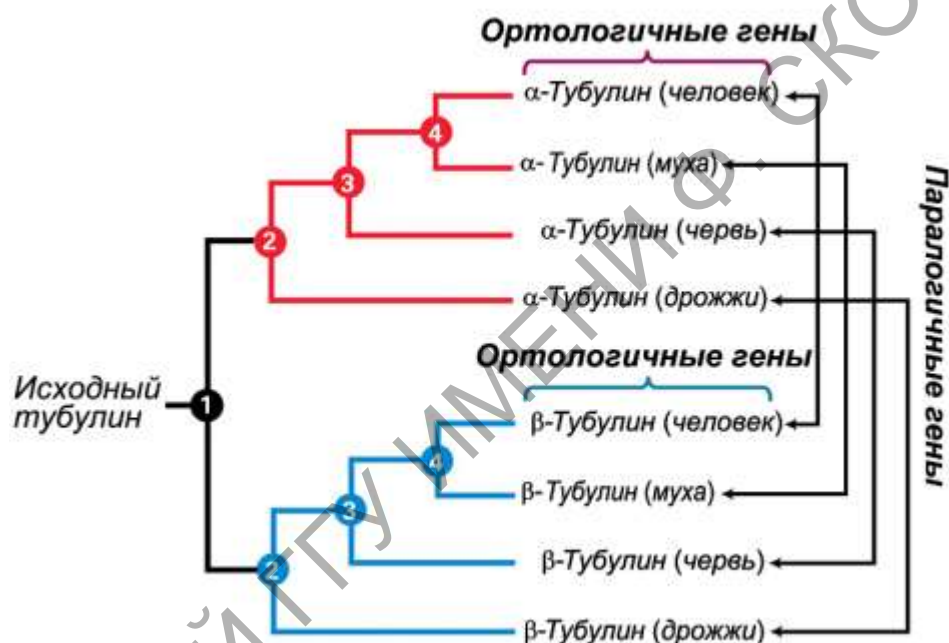


Рисунок 6.2 – Филогенетическая схема (кладограмма), показывающая родство между тубулиновыми генными последовательностями

Филогенетической схемой называется схема предполагаемых генеалогических (эволюционных) связей особей, популяций или таксонов различного уровня в разрезе исторического времени; точки "ветвлений" на схеме соответствуют гипотетическим моментам образования новых форм (дивергенции).

Кладограмма – это филогенетическое дерево, не содержащее информации о длинах ветвей.

Если же длины ветвей несут информацию о величине какого-либо параметра, то такое дерево называется *филограммой* (или *фенограммой*), например, филограмма, длины ветвей в которой представляют эволюционное время, называется *хронограммой*.

Из трёх типов генетического родства: гомологии, ортологии и паралолии – ортологические последовательности наиболее вероятно кодируют одни и те же функции у белков.

При расшифровке и анализе биологических последовательностей результаты необходимо сверять со всеми возможными источниками биологической информации.

Аналитический процесс осложнён тем фактом, что иногда подобие последовательностей ограничено только некоторой частью выравнивания, как, например, при изучении модульных белков. Модули можно представить, как подмножества белковых доменов; это самостоятельные единицы свёртки, примыкающие друг к другу и часто служащие структурными элементами для сборки белковой молекулы. Будучи составными элементами общей конфигурации, они могут быть использованы для передачи богатой палитры различных функций родительского белка – как путём многократных комбинаций какого-либо одного модуля, так и посредством комбинации различных модулей с образованием конфигурационных мозаик. Генетической причиной распространённости модулей в большей мере являются процессы перегруппировки генов, а не только процессы дублирования и слияния генов.

Обычно живые организмы классифицируют на группы по наблюдаемым подобиям и различиям. Если два организма очень близко связаны друг с другом, то, как правило, считают, что они имеют общего предка.

Филогения – это описание биологических отношений, обычно изображаемое в виде дерева. Отмеченные подобия и различия между организмами используют для восстановления филогении. Науку об эволюционных отношениях (связях) организмов называют *филогенетикой*.

Филогенетический анализ представляет собой не что иное, как способ оценки эволюционных отношений. Эволюционную историю, восстановленную в результате филогенетического анализа, обычно изображают в виде разветвлённых, древовидных диаграмм, которые представляют предполагаемую родословную наследственных отношений между молекулами, организмами или и тем, и другим.

Утверждение о филогении среди различных организмов предполагает их гомологию и зависит от классификации. Филогения устанавливает топологию отношений (схему родословной), выведенных либо на основании классификации по подобию одного или нескольких наборов признаков, либо на основании модели эволюционных процессов. Во многих случаях филогенетические отношения, основанные на различных признаках, вполне достоверны и даже подтверждают друг друга. На фоне традиционной таксономии в настоящее время наиболее достоверными являются молекулярные подходы к определению филогении.

По сравнению с традиционными деревьями, построенными по морфологическим признакам, молекулярные филогении намного информативнее, потому что они шире в охвате (например, цветковые растения с млекопитающими можно сравнивать по последовательностям белка, но

никак не по морфологическим признакам); кроме того, результаты анализа информации такого типа непротиворечивы и объективны.

Так, например, на основе анализа последовательностей 16S и 18S рибосомных РНК, Карл Вёзе (Carl Richard Woese) восстановил общую классификацию живых организмов (рисунок 6.3).

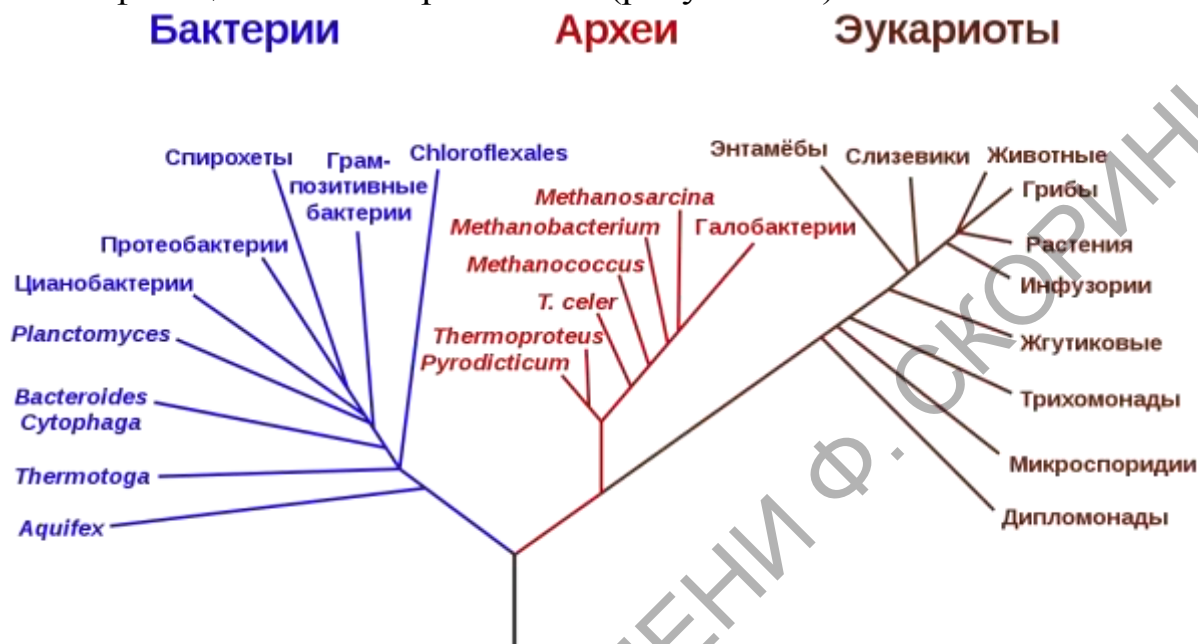


Рисунок 6.3 – Классификация живых организмов

Рибосомная РНК (рРНК) является чрезвычайно консервативной и притом универсальной молекулой, которая присутствует в клетках всех живых организмов (животных, растений, грибов, бактерий, паразитов и т. д.). Она имеет низкую устойчивость к мутациям и эволюционирует очень медленно. Развитая вторичная структура рРНК гарантирует, что спиральные области требуют взаимно компенсирующих замен оснований (вероятность которых ничтожно мала). Представленное на рисунке 20 дерево совместимо с выравниванием и групповым анализом этих молекул, а сделанные из его оценки выводы не противоречат таковым, полученным по результатам других исследований макромолекул.

Целями филогенетических исследований является выявление взаимосвязей между видами, популяциями, индивидами или генами. Под взаимосвязями подразумевается родство или генеалогия, то есть схема (модель) распределения потомков от общего предка. Дерево, показывающее всех потомков от одного предка, называется укоренённым.

Филогенетический анализ семейства родственных последовательностей нуклеиновых кислот или белков заключается в установлении возможных путей развития семейства в ходе эволюции.

2. Ключевые слова и понятия

Выравнивание последовательностей Глобальное выравнивание Локальное выравнивание Поиск мотивов совпадения Биоинформатика	Инсерция Делеция Попарное выравнивание Множественное выравнивание Консенсус
--	--

3. Практическая часть

Задание 1. Провести выравнивание нуклеотидных последовательностей с дальнейшим филогенетическим анализом

Вирус гриппа является сезонной инфекцией, распространенной во многих странах мира. При этом биологические особенности вируса таковы, что возможны не только инфекции, которые передаются от человека к человеку, но и зоонозные инфекции. Всемирная организация здравоохранения под зоонозным гриппом понимает «заболевание, вызываемое вирусами гриппа животных, которые передаются от животных людям и инфицируют их». Другими словами, люди могут быть инфицированы вирусами, которые обычно циркулируют среди животных. Причем нередко распространение инфекции принимает глобальный характер и может принимать характер масштабных пандемий. Пожалуй, самой смертоносной пандемией зоонозного гриппа была эпидемия «испанки», распространившаяся в Европе в первой половине 20 века и унесшая жизни миллионов человек. Как было установлено, данная пандемия была вызвана серотипом H1 N1 гриппа А.

В нашей стране широкий резонанс и обсуждение в средствах массовой информации получили случаи, так называемого, «свиного гриппа» в 2008 году. Первый случай этого гриппа задокументирован в Гродно, а фрагмент последовательности гена нейроминидазы данного вируса депонирован в международную базу Вируса гриппа (Influenza Virus Resource) 23 января 2008 года (код доступа ACJ61694). Данный вирус также относится к серотипу H1N1 как и возбудитель печально известной «испанки». Для предотвращения зоонозных и потенциально пандемических инфекций неоценимую помощь оказывает мониторинг и эволюционные исследования вирусов, которые позволяют спрогнозировать распространение инфекции и своевременно предложить эффективную вакцину. Современные методы молекулярной генетики на уровне нуклеотидных последовательностей позволяют установить сходства и различия исследованных образцов и реконструировать пути распространения и рециркуляции вирусов при сезонных инфекциях.

В данном задании предлагается сравнить нуклеотидные последовательности фрагмента гена нейроминидазы (NA) вируса гриппа А серо-

типа H1N1, которые были получены из разных городов Беларуси во время эпидемии гриппа в 2008 году.

Следует отметить, что не все изменения в нуклеотидной последовательности являются равновероятными и равноценными. Транзиции, как правило, происходят чаще трансверсий и при прочих равных условиях им должен придаваться меньший вес. А открытие делеции менее вероятно, чем продолжение делеции, и ему должен придаваться больший вес. Поэтому последовательности с одной делецией в 6 нуклеотидов будут более близкие, чем последовательности с двумя делециями в 3 нуклеотида.

Brest_InfluenzaA

ACTAGTGAAATCACATGTGTATGCAGGGATAACTGGGCATGGCTCG
AATCGACCGTGGGTGTTCACCAGAATCTGGAATATCAGATAG
GATACATAT

Homel_InfluenzaA

ACGGCACAGTGATGTGTGTGTGCAGAGACAATTGGGCATGGTTCTGA
ATCGACCTTGGGTGTCTTTTAATCAAAACCTGGATTATCAAATAGG
ATACATCT

Hrodna_InfluenzaA

CTGGCATAGTGATGTGTGTATGCAGGGACAACCTGGGCATGGTTCAA
ATCGACCTTGGGTGTCTTTTAATCAAAACTTGGATTATCAAATAGG
ATACATCT

Mahileu_InfluenzaA

CTAGTGAAATCACATGTGTATGCAGGGATAACTGGGCATGGCT
CGAATCGACCGTGGGTGTCTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGA
TAGGATACATAT

Minsk 1_Influenza A

ACTAGTGAAATCACATGTGTATGCAGGGATAACTGGGCATGGC
TCGAATCGACCGTGGGTGTTCACCAGAATCTGGAATATCAGATA
GGATACATAT

Minsk2_InfluenzaA

ACTGGCATAGTGATGTGTGTATGCAGGGATAACTGGGCATGGT
TCAAATCGACCTTGGGTGTCTTTTAATCAAAACTTGGATTATCAAA
TAGGATACATCT

Vitsebsk_InfluenzaA

ATATGTATCCTATCTGATATTCCAGATTCTGGTTGAACACCCA
CGGTTCGATTCGAGCCATGCCAGTTATCCCTGCATACACATGTGATT
TCACTAGT

Количественно оцените сходства данных последовательностей. На основании полученных данных определите пути распространения и рециркуляции данного вируса в нашей стране во время эпи-

демии 2008 года. Предложите подходы для идентификации серотипа H1N1 вируса гриппа А, циркулировавшего в Беларуси в 2008 году, и его региональных вариантов на основании метода ПЦР и иммуноферментного анализа. Проанализируйте преимущества и недостатки предложенных вами методов.

Задание 2. Провести идентификацию нуклеотидной последовательности и построить филогенетическое дерево с использованием системы BLAST

Требуется компьютер с доступом в Интернет, исходный файл с нуклеотидными последовательностями.

Шаг 1. Из файла, содержащего выборку последовательностей, выберите последовательность интересующего вас вида и скопируйте ее в виде текста в новый текстовый файл в формате .doc. Буквенная последовательность не должна содержать информации о названии вида, которому принадлежит последовательность. Обменяйтесь созданными файлами с коллегой по группе.

Получив от коллеги файл, содержащий нуклеотидную последовательность неизвестного вам происхождения, попытайтесь установить, какому виду она принадлежит. Для этого пройдите по ссылке

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> или наберите в любой поисковой системе слово GenBank. На странице NCBI внизу найдите ссылку на страницу системы BLAST.

Войдите в систему BLAST. Поскольку вы имеете дело с нуклеотидной последовательностью, выберите программу «nucleotide blast». В открывшемся окне введите вашу буквенную последовательность без каких-либо пробелов в специальное поле «Enter accession number(s)». Убедитесь, что в условиях поиска заданы параметры «Искать в нуклеотидной коллекции» и «искать высоко сходные последовательности» (Highly similar sequences (mega blast)).

Проведите поиск, нажав кнопку BLAST внизу страницы.

Определите принадлежность анализируемой последовательности.

Оцените уровень сходства анализируемой последовательности с другими последовательностями в базе данных.

Загрузите на свой компьютер описание полученных результатов («Taxonomy reports»).

Система BLAST, это пакет программ, разработанных Американским Национальным центром биотехнологической информации и предназначенных для идентификации последовательностей разных типов. В процессе поиска программа сравнивает заданную исследователем последовательность со всеми последовательностями, хранящимися в базе данных GenBank, и находит все идентичные последовательности и по-

следовательности, содержащие минимальное число отличающихся сайтов.

Программа представляет результаты как список видов, с указанием процента сходства между анализируемой последовательностью и последовательностью из списка. Последовательности в списке ранжируются в соответствии с уровнем подобия содержащихся в базе последовательностей и анализируемой. Кроме того, программа выводит в окне результатов подробный отчет о результатах сравнения со всеми максимально подобными последовательностями в виде попарных выравниваний с указанием как идентичных, так и различающихся сайтов. Подробное представление результатов анализа позволяет исследователю оценить качество работы, сделанной программой, и, при необходимости (например, при нахождении в базе данных нескольких последовательностей с одинаковым уровнем нуклеотидного сходства) самостоятельно сделать заключение о таксономической принадлежности образца или о номенклатурной принадлежности гена, соответствующего анализируемой последовательности.

Шаг 2. На странице с результатами поиска нажмите на вкладку «Distance tree of results». Программа построит филогенетическое дерево, на котором ваша последовательность будет выделена желтым цветом. Убедитесь, что автоматически выбранный программой метод построения филогенетического дерева вас устраивает. В противном случае проведите повторное построение дерева («Reset»). Выберите тот вариант представления дерева, который кажется вам наиболее удачным («rectangle», «slanted», «radial» или «force»).

Построение филогенетического дерева может быть использовано как дополнительный способ идентификации последовательности, но только в том случае, когда речь идет об определении таксономической принадлежности образца, для которого эта последовательность была получена. Идентифицировать гены таким образом нельзя, поскольку объем информации, который потребуется для анализа, превысит возможности любого из существующих компьютеров. Поскольку на эволюционных деревьях последовательности объединяются в кластеры по принципу генетического сходства, в один кластер попадут родственные последовательности, в идеальном случае – последовательности одного вида. В зависимости от того, с какими последовательностями кластеризуется анализируемая последовательность неизвестного вида, можно сделать достаточно точный вывод о ее происхождении.

Идентификация по филогенетическому родству может быть использована в том случае, когда важно не только установить видовую принадлежность, но и оценить генетическую близость образца к от-

дельным выборкам последовательностей организмов того же вида, например, к конкретной популяции, линии, гаплотипу и т.д.

Задание 2. Решить задачи.

Сравнить полученные результаты о филогении приматов подсемейства Гоминиды, используя нуклеотидные последовательности гена лептина человека, шимпанзе:

```
>ENA|U18915|U18915.1 Human obese (ob) mRNA, complete cds.  
ATGCATTGGGGAACCCCTGTGCGGATTCTTGTGGCTTTGGCCCTATCTTTTCTATGTCCAA  
GCTGTGCCCATCCAAAAAGTCCAAGATGACACCAAAACCCCTCATCAAGACAATTGTCACC  
AGGATCAATGACATTTACACACGCGAGTCAGTCTCCTCCAAACAGAAAGTCACCGGTTTG  
GACTTCATTCTCTGGGCTCCACCCCATCCTGACSTTATCCAAGATGGACCAGACACTGGCA  
GTCTACCAACAGATCCTCACCAGTATGCSTTCCAGAAACGTGATCCAAATATCCAACGAC  
CTGGAGAACCTCCGGGATCTTCTTCACGTGCTGGCCTTCTCTAAGAGCTGCCACTTGCCC  
TGGGCCAGTGGCCTGGAGACCTTGGACAGCCTGGGGGGTGTCTTGGAAAGCTTCAGGCTAC  
TCCACAGAGGTGGTGGCCCTGAGCAGGCTGCAGGGGTCTCTGCAGGACATGCTGTGGCAG  
CTGGACCTCAGCCCTGGGTGCTGA
```

```
>ENA|GABD01008762|GABD01008762.1 TSA: Pan troglodytes Chimpanzee_0095424  
mRNA sequence.  
CGCCAGCGGTTGCAAGGCCCAAGAAGCACATCCTGGGAAGGAAAATGCATTGGGGAACCC  
TGTGCGGATTCTTGTGGCTTTGGCCCTATCTTTTCTATGTCCAAGCTGTGCCCATCCAAA  
AAGTCCAAGATGACACCAAAACCCCTCATCAAGACAATTGTCACCAGGATCAATGACATTT  
CACACACGCGAGTCAGTCTCCTCCAAACAGAAAGGTCACCGGTTTGGACTTCATTCTGGGC  
TCCACCCSTATCCTGACSTTATCCAAGATGGACCAGACACTGGCAGTCTACCAACAGATCC  
TCACCAGTATGCSTTCCAGAAACATGATCCAAATATCCAACGACCTGGAGAACCTCCGGG  
ACSTTCTTCACGTGCTGGCCTTCTCTAAGAGCTGCCACTTGCCCTGGGCCAGTGGCCTGG  
AGACCTTGGACAGCCTGGGGGGTGTCTTGGAAAGCTTCAGGCTACTCCACAGAGGTGGTGG  
CCCTGAGCAGGCTGCAGGGGTCTCTGCAGGACATGCTGTGGCAGCTGGACCTCAGCCCTG  
GGTGTGAGGCCTTGAAGGTCACCTCTCTGCAAGGACTACGTTAAGGGAAGGAACTCTG  
GCTTCAGGTATCTCCAGGATTGAAGAGCATTGCATGGACACCCCTTATCCAGGACTCTG  
TCAATTTCCC
```

Литература

1. Основы биоинформатики: учеб. пособие / А. Н. Огурцов. – Х.: НТУ «ХПИ», 2013. – 400 с.
2. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. - Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. - 459 с.
3. Порозов, Ю.Б. Биоинформатика / Ю.Б. Порозов. – СПб:НИУ ИТМО, 2012. – 52 с.
4. Методы молекулярной генетики и геной инженерии/ Мазин А.В. и др. - Новосибирск: Наука. 1990. - 248 с.
5. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.
6. Идентификация видов и построение филогений / Н. В. Воронова, М. М. Воробьева. – Минск: БГУ, 2015. – 15 с.
7. Modern genetic analysis. Griffiths et al. - Freeman and company. New York. 1999. - 675 p.
8. An introduction to genetic analysis. Griffiths et al. - Freeman and company. New York. 2000. - 730 p.

9. Попов, В.В. Геномика с молекулярно- генетическими основами. – М.: Книжный дом «Либроком», 2009. – 304 с.

10. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/ru/influenza/spotlight/zoonotic-influenza>. – Дата доступа: 24.03.2021.

11. Taubenberger, J.K. 1918 Influenza: the mother of all pandemics / J.K.Taubenberger, D.M. Morens // Emerg Infect Dis. – 2006. – Vol. 12(1). – P. 15-22. doi: 10.3201 /eid 1201.050979

3 КОНТРОЛЬ ЗНАНИЙ

3.1 Перечень вопросов к зачету

1. Основные классы природных биополимеров.
2. Строение нуклеиновых кислот.
3. Строение белковых макромолекул.
4. Методы выделения и очистки биополимеров.
5. Ферменты, применяемые в молекулярной диагностике.
6. Иммунодиагностические методы.
7. Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот. ДНК-биочипы.
8. Полимеразная цепная реакция и её модификации.
9. Детекция продуктов амплификации в режиме реального времени (Real-time PCR).
10. Организация технологического процесса постановки ПЦР.
11. Устройство ПЦР-лаборатории.
12. Электрофоретический анализ макромолекул.
13. Метод блот-гибридизации по Саузерну.
14. Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот (NASBA, LAMP).
15. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP).
16. Случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD).
17. Методы секвенирования нуклеиновых кислот.
18. Метод секвенирования Максама-Гилберта.
19. Метод секвенирования Сэнгера.
20. Автоматическое секвенирование ДНК.
21. Анализ больших последовательностей ДНК.
22. Методы секвенирование ДНК первого, второго и третьего поколения.
23. Метагеномный анализ.
24. Физико-химические методы, используемые в молекулярной диагностике.
25. Особенности молекулярной диагностики в медицине.
26. Молекулярная диагностика в онкологии и фармакологии.
27. Особенности молекулярной диагностики в сельском хозяйстве.
28. Молекулярно-генетический анализ состава продуктов питания.
29. Молекулярно-генетическая детекция ГМО.
30. Особенности молекулярной диагностики в криминалистике.

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.

3.3 Тестовые задания по дисциплине «Молекулярная диагностика»

::001::Явление трансформации открыл

~Г. Мендель в 1900 г.

~Дж. Уотсон в 1953 г.

~Г. Мёллер в 1927 г.

~Э. Тейтум в 1941 г.

~Ф. Гриффитс в 1928 г.

::002::Вирулентный штамм - это штамм, от которого организм

~погибает

~приобретает новый признак

~выздоровливает

~становится устойчивым к патогенам

~остается жив

::003::*Streptococcus pneumonia* - это

~штамм вызывающий заболевание грипп

~штамм вызывающий заболевание туберкулез

~штамм вызывающий заболевание пневмонию

~штамм вызывающий заболевание оспу

~безвредный вирус, не вызывающий заболевание

::004::Трансформирующим фактором является

~РНК

~моносахарид

~белок

~ДНК

~бактерия

::005::Дезоксирибонуклеиновая кислота

~фактор транскрипции

~носитель наследственной информации

~компонент белка

~компонент цитоплазматической мембраны

~инактивирующий фермент

::006::«Нуклеин»

~полисахарид

~липид
~синоним слова «ядро»
~нуклеиновая кислота
~фосфолипид

::007:: В состав ДНК входит
~один дезоксирибонуклеотид
~два дезоксирибонуклеотида
~три дезоксирибонуклеотида
~четыре дезоксирибонуклеотида
~пять дезоксирибонуклеотидов

::008:: Мономерами молекул нуклеиновых кислот являются
~нуклеозиды
~нуклеотиды
~полинуклеотиды
~азотистые основания
~аминокислоты

::009:: Аденин, гуанин
~пуриновые основания
~остатки фосфорной кислоты
~мономеры белков
~компоненты полисахаридов
~пиримидиновые основания

::010:: Цитозин, тимин
~компоненты полисахаридов
~пуриновые основания
~пиримидиновые основания
~мономеры белков
~остатки фосфорной кислоты

::011:: Нуклеотид – это мономер
~белков
~нуклеиновых кислот
~жиров
~углеводов
~сахаров

::012::Дезоксирибоза – это

~азотистое основание ДНК

~мономер белка

~совокупность азотистого основания, углевода и фосфорной кислоты

~углеводный компонент ДНК

~мономер РНК

::013::Рибоза – это

~мономер белка

~азотистое основание ДНК

~мономер ДНК

~углеводный компонент РНК

~совокупность азотистого основания, углевода и фосфорной кислоты

::014::Рибонуклеиновая кислота (РНК)

~нуклеиновая кислота, которая в качестве углевода содержит рибозу

~полимер, состоящий из трех дезоксирибонуклеотидов

~мономер, состоящий из двух цепочек дезоксирибонуклеотидов

~молекула, которая в качестве углевода содержит глюкозу

~молекула, которая в качестве углевода содержит дезоксирибозу

::015:: К нуклеиновым кислотам относятся

~ДНК, РНК, АТФ

~глицин, валин, триптофан

~сахароза, глюкоза

~фибрин, миозин

~холестерин, фосфолипиды

::016:: Модель вторичной структуры молекулы ДНК предложили

~Шлейден и Шванн

~Мендель и Морган

~Уотсон и Крик

~Дарвин и Уоллес

~Чайковский и Моцарт

::017::Принцип комплементарности

~А-Г и У-Ц

- ~А-У или Т-Ц
- ~А-Т и Г-Ц
- ~А-Ц и Т-Г
- ~А-Г и Т-Ц

::018:: Репликация – это

- ~ синтез РНК на ДНК-матрице
- ~ удвоение цепи ДНК
- ~ синтез белка на матрице и-РНК
- ~ процесс возникновения мутаций
- ~ синтез АТФ

::019:: Этапы репликации

- ~инициация и элонгация
- ~элонгация и терминация
- ~инициация и терминация
- ~инициация, элонгация и терминация
- ~инициация, элонгация и гибридизация

::020::Точка инициации (ori)

- ~место прикрепления рестриктазы
- ~место разрезания ДНК рестриктазой
- ~место начала репликации молекул ДНК
- ~место сшивания ДНК лигазой
- ~место окончания репликации молекул ДНК

::021::Репликационная вилка

- ~столовый прибор
- ~визуальное изображение процесса транскрипции
- ~визуальное изображение процесса трансляции
- ~визуальное изображение процесса репарации
- ~Y-образный участок ДНК при репликации

::022::Геликаза

- ~не позволяет одноцепочечным участками ДНК вновь соединиться
- ~соединяет одноцепочечные участки ДНК в двойную спираль
- ~фермент, который разъединяет цепи ДНК
- ~снимает возникающую суперскрученность и напряжение в нераскрученной части ДНК репликационной вилки (ДНК-гираза у

прокариот)

~мутаген, под влиянием которого цепи ДНК разрываются

::023::Белки SSB

~не позволяют одноцепочечным участками ДНК вновь соединиться

~соединяют одноцепочечные участки ДНК в двойную спираль

~ферменты, под влиянием которых цепи ДНК разъединяются

~снимают возникающую суперскрученность в нераскрученной части ДНК

~мутагены, под влиянием которых цепи ДНК разрываются

::024::Топоизомераза (ДНК-гираза)

~не позволяет одноцепочечным участками ДНК вновь соединиться в двойную спираль

~соединяет одноцепочечные участки ДНК в двойную спираль

~фермент, который раскручивает цепи ДНК в точке инициации репликации

~снимает возникающую суперскрученность в нераскрученной части ДНК

~метирует ДНК

::025::ДНК-полимераза

~осуществляет процесс восстановления поврежденных участков ДНК

~осуществляет процесс вырезания интронов в молекуле ДНК

~осуществляет разрезание ДНК

~осуществляет процесс трансляции

~осуществляет синтез ДНК при репликации

::026::Праймаза

~фермент трансляции

~ДНК-лигаза

~фермент рестрикции

~РНК-полимераза

~фермент репарации

::027::РНК-праймер

~длинный фрагмент РНК величиной около 1000 нуклетидов

~одноцепочечный фрагмент РНК величиной около 10-20

нуклетидов

- ~зонд для идентификации наследственных заболеваний
- ~длинный фрагмент ДНК величиной около 1000 нуклетидов
- ~короткий фрагмент ДНК величиной около 10 нуклетидов

::028:: Синонимический вариант отстающей цепи

- ~запаздывающая
- ~ведущая
- ~двойная
- ~одинарная
- ~кольцевая

::029:: Фрагменты Оказаки

- ~места прикрепления ДНК-полимеразы
- ~места разрезания ДНК рестриктазой
- ~короткие фрагменты (200-2000) на запаздывающей цепи
- ~некодирующие участки ДНК
- ~участки ДНК в виде сплошной линии

::030:: Синонимический вариант ведущей цепи

- ~запаздывающая
- ~лидирующая
- ~двойная
- ~одинарная
- ~кольцевая

::031:: ДНК-лигаза

- ~фермент, соединяющий фрагменты ДНК в общую цепь
- ~фермент, соединяющий аминокислоты в последовательность после трансляции
- ~фермент, соединяющий нуклеотиды в последовательность иРНК во время транскрипции
- ~фермент, расплетающий молекулу ДНК
- ~белок, разъединяющий в общую полинуклеотидную цепочку ДНК после репликации

::032:: Урацил

- ~моносахарид
- ~полисахарид
- ~азотистое основание РНК

- ~остаток фосфорной кислоты
- ~азотистое основание ДНК

::033:: Процесс транскрипции осуществляется в

- ~ядре
- ~митохондриях
- ~цитоплазме
- ~лизосомах
- ~комплексе Гольджи

::034::Транскрипция

~процесс точного самовоспроизведения молекул нуклеиновых кислот

~считывание информации с ДНК в последовательность короткоживущих иРНК

- ~процесс восстановления поврежденных участков ДНК
- ~процесс вырезания интронов в молекуле ДНК
- ~разрезание ДНК по определенным нуклеотидным последовательностям

::035::РНК-полимеразы

~ферменты, под влиянием которых цепи ДНК разъединяются (раскручиваются) в точке инициации репликации

~белки, снимающие суперскрученность в нераскрученной части ДНК

~мутагены, под влиянием которых цепи ДНК разрываются

~ферменты, осуществляющие транскрипцию в направлении 5'-3'

~ферменты, осуществляющие трансляцию в направлении 3'-5'

::036::Матричная цепь ДНК 3'-5'

~цепь иРНК, служит для синтеза аминокислотной последовательности

~цепь ДНК, служит для синтеза и-РНК

~цепь, с которой не происходит считывания информации при транскрипции

~цепь, с которой происходит считывание информации при трансляции

~цепь РНК, которая служит для синтеза ДНК

::037::Промотор

~участок ДНК символизирующий окончание транскрипции
~участок иРНК инициирующий трансляцию
~место разрезания ДНК рестриктазой
~структура, доставляющая аминокислоты к месту биосинтеза белка

~участок гена инициирующий транскрипцию

::038::«ТАТА-бокс»

~участок промотора перед геном
~участок ДНК символизирующий окончание транскрипции
~участок иРНК инициирующий трансляцию
~структура, доставляющая аминокислоты к месту биосинтеза белка

~геном боксёра

::039::Интроны

~места прикрепления ДНК-полимеразы
~не содержащие информацию отрезки ДНК в структурной части гена у эукариот
~участки ДНК символизирующие окончание транскрипции
~белки, принимающие участие в сборке рибосом
~содержащие информацию отрезки ДНК в структурной части гена у эукариот

::040::Экзон

~белки, принимающие участие в сборке рибосом
~участки ДНК символизирующие окончание транскрипции
~места прикрепления ДНК-полимеразы
~не содержащие информацию отрезки ДНК в структурной части гена у эукариот
~содержащие информацию отрезки ДНК в структурной части гена у эукариот

::041::Первичный транскрипт (про-мРНК)

~РНК, содержащая промотор и ген
~РНК, содержащая промотор, ген и терминатор
~РНК, содержащая интроны и экзоны
~РНК, содержащая ген и терминатор
~РНК, содержащая только интроны

::042::Сплайсинг

- ~процесс удаления из про-мРНК экзонов
- ~процесс удаления из про-мРНК интронов
- ~процесс удаления из про-мРНК промотора
- ~процесс удаления из про-мРНК промотора и терминатора
- ~считывание информации с ДНК

::043::КЭП (метилованный гуанин)

- ~присоединяется перед выходом из ядра к начальной (5') части и-РНК
- ~присоединяется к теломерным участкам хромосомы
- ~присоединяется к центромерным участкам хромосомы
- ~символизирует окончание транскрипции
- ~отсоединяется перед входом в ядро с начальной (5') части и-РНК

::044::Поли-А хвост

- ~100-200 остатков аденина присоединяется к 5'-концу иРНК
- ~100-200 остатков аденина присоединяется к 3'-концу иРНК
- ~теломерный участок хромосомы
- ~место синтеза РНК-праймера при репликации
- ~примерно 20 остатков аденина присоединяется к 5'-концу иРНК

::045::Зрелая иРНК

- ~промотор, экзоны и терминатор
- ~промотор, экзоны, интроны и терминатор
- ~КЭП, экзоны и поли-А хвост
- ~КЭП, промотор, экзоны, интроны и терминатор
- ~интроны, экзоны, КЭП и поли-А хвост

::046::Один ген - один белок

- ~закономерность, предложенная Г. Менделем в экспериментах на горохе
- ~закономерность, предложенная Дж. Уотсоном и Ф. Криком при открытии структуры молекулы ДНК
- ~установленная закономерность, при которой один ген кодирует один белок
- ~закономерность, предложенная К. Мюллисом при открытии ПЦР
- ~закономерность, при которой, мутация приводит к потере метаболической активности нескольких ферментов (белков)

::047::Генетический код
~система записи наследственной информации в молекулах ДНК и РНК

~система шифрования информации при секвенировании ДНК
~процесс генетической детерминации электрофоретических спектров
~способ анализа родословных
~система записи математических символов

::048::Кодон (триплет)
~три случайно взятых аминокислоты в белке
~три случайно взятых нуклеотида в ДНК
~три рядом расположенных гена
~три рядом стоящих аминокислоты, кодирующих один нуклеотид
~три рядом стоящих нуклеотида, кодирующих одну аминокислоту

::049::Стоп-кодон
~теломерный участок хромосомы
~место разрезания ДНК рестриктазой
~тринуклеотид в информационной РНК, сигнализирующий об окончании синтеза белка
~место начала транскрипции
~нуклеотид в информационной РНК, сигнализирующий о начале синтеза полипептида

::050::Основные свойства генетического кода
~внутренность, консервативность, моногенность, неопределенность, избыточность
~решимость, непоколебимость, полигенность, высокая емкость, неоднозначность
~триплетность, экспрессивность, пенетрантность, вырожденность
~обобщенность, консервативность, моногенность, неадекватность, универсальность
~триплетность, неперекрываемость, координатность, универсальность, вырожденность

::051::Трансляция

~процесс биосинтеза белка по матрице иРНК, который протекает на рибосомах

~процесс переписывания информации в иРНК по матрице ДНК

~процесс исправления ошибок в ДНК

~разрезание ДНК

~процесс биосинтеза белка по матрице кДНК, который протекает в ядре

::052::Транспортные РНК (тРНК)

~переносят информацию от ядра к шероховатому ЭПР

~приносят аминокислоты к месту синтеза белка (к рибосомам)

~разрезают ДНК по сайтам узнавания

~входят в состав рибосом

~переносят нуклеотиды к рибосомам и участвуют в процессе синтеза ДНК

::053::Акцепторный триплет ЦЦА

~к нему присоединяется специфическая аминокислота

~к нему присоединяется ДНК-полимераза

~к нему присоединяется РНК-полимераза

~символизирует окончание транскрипции

~триплет тРНК, соответствующий комплементарному кодону в иРНК

::054::Антикодон

~к нему присоединяется специфическая аминокислота

~символизирует окончание транскрипции

~триплет тРНК, соответствующий комплементарному кодону в иРНК

~символизирует окончание трансляции

~место прикрепления РНК-полимеразы

::055::Рибосомы

~клеточные органеллы, на которых происходит наработка АТФ для клетки

~клеточные органеллы, на которых протекает процесс биосинтеза белка

~неклеточные органеллы, на которых протекает процесс биосинтеза углеводов

~неклеточные включения, выполняющие запасную функцию

~неклеточные органеллы, на которых протекает процесс биосинтеза липидов

::056::Рибосомная РНК (р-РНК)

~служит каркасом рибосом и способствует связыванию иРНК с рибосомой в ходе синтеза белка

~переносит информацию из ядра на шероховатый ЭПР

~входит в состав клеточной мембраны

~служит каркасом эндоплазматического ретикулума

~переносит аминокислоты к рибосомам и участвует в процессе биосинтеза белка

::057::Единица Сведберга (S) характеризует

~длину молекулы ДНК приходящуюся на один виток

~скорость седиментации при центрифугировании

~размер промотора

~молекулярную массу рибосом

~размер субъединиц рибосом

::058::Аминоацил-тРНК-синтетаза

~фермент, восстанавливающий разрывы в молекуле ДНК

~фермент, разрезающий ДНК по сайту узнавания

~фермент, синтезирующий тРНК

~фермент, осуществляющий присоединение аминокислоты к своей тРНК

~белок, дезактивирующий свободные аминокислоты и присоединение их к тРНК

::059::Аминоацил-тРНК (aa-тРНК)

~образуется в результате присоединения к тРНК амино-группы

~образуется в результате транскрипции

~переносит информацию о гене из ядра на шероховатый ЭПР

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

~ активированная с помощью АТФ аминокислота, присоединенная к своей тРНК

::060::Инициация трансляции

~процесс восстановления молекулой ДНК двухцепочечного вида после денатурации

~начало процесса репликации

~присоединение иРНК к малой субъединице рибосомы

~отсоединение малой субъединицы рибосомы с соответствующего центра связывания на иРНК

~подготовка клетки к делению

::061::Кодон инициации АУГ

~стоп-кодон

~служит сигналом инициации трансляции, к нему присоединяется первая тРНК

~сигнал окончания трансляции

~сигнал окончания транскрипции

~сигнал инициации транскрипции

::062::Элонгация трансляции

~превращение ДНК из двухцепочечного вида в одноцепочечный

~присоединение к ДНК полимеразы

~удлинение полипептидной цепи путем присоединения аминокислот

~сшивка фосфодиэфирных связей в молекуле ДНК после разрыва

~укорочение нуклеотидной цепи путем убавления нуклеотидов

::063::Терминация трансляции

~прекращает синтез белка при поступлении в рибосому стоп-кодона

~препятствует синтезу белков к клетке

~останавливает клеточный цикл клетки

~запускает апоптоз

~активизирует дальнейшую элонгацию цепи.

::064::Пептидилтрансфераза - фермент, который

~соединяет предшествующую аминокислоту с вновь поступившей пептидной связью

~соединяет предшествующий нуклеотид с вновь пришедшим при транскрипции

~определяет уменьшение рН в клетке

~защищает белок от пептидаз

~отсоединяет вновь пришедшую аминокислоту

::065::Аминоацильный центр
~место прикрепления КЭПа к иРНК
~место синтеза белка в клетке
~участок рибосомы, к которому присоединяется тРНК, несущая аминокислоту (амино-ацил-тРНК)
~структура митохондрий
~большая субъединица рибосомы

::066::Пептидильный центр
~место прикрепления КЭПа к иРНК
~малая субъединица рибосомы
~место синтеза АТФ в митохондриях
~место сборки рибосом к клетке
~место связывания тРНК с растущим полипептидом на рибосоме

::067::Пептидная связь
~NH-NH
~CO-NH
~O-H
~COOH-NH
~COOH-COOH

::068::Четыре структуры белка
~1, 2, 3, 4
~первичная, вторичная, третичная и четвертичная
~A, B, C, D
~простая, нормальная, сложная, очень сложная
~A, T, G, Ц

::069::Четвертичная структура белка
~несколько белковых субъединиц объединенных в единый функциональный комплекс
~несколько полипептидных цепей с первичной структурой объединенных с белками-гистонами
~три полипептидные цепи с первичной структурой объединенные в единый комплекс
~две полипептидные цепи с первичной структурой объединенные в единый комплекс
~четыре полипептидные цепи с первичной структурой

объединенные в единый комплекс

::070::Исправление мутационных повреждений генов в ДНК называется

- ~репликация
- ~репарация
- ~реверсия
- ~реконструкция
- ~трансформация

::071::Трансверсия - мутация, в результате которой в ДНК происходит

- ~замена пуринового основания на пиримидиновое, и наоборот
- ~перенос участка хромосомы в новое положение
- ~сдвиг рамки считывания
- ~поворот участка хромосомы на 180°
- ~вставка новых нуклеотидов

::072::Какова комплементарная цепь для этой ДНК:
ТАГАЦТГГТА

- ~АУЦУГАЦЦАУ
- ~АТЦТГАЦЦАТ
- ~ТАГАЦТГГТА
- ~АТЦТАГЦЦАТ
- ~ТУГУЦТГГТУ

::073::Участок молекулы ДНК имеет строение 3'ГГЦ-ААЦ-ТТА5'. Какое строение имеет комплементарная ей и-РНК?

- ~5'ЦЦГ-УУГ-ААУ3'
- ~3'УУГ-ТТЦ-ААТ5'
- ~5'ЦЦГ-ААУ-УУГ3'
- ~3'ГГЦ-УУТ-ААУ5'
- ~5'ГГЦ-ААЦ-ТТА3'

::074::Молекула иРНК имеет строение: 5'УГУ-ЦАА-УЦА-УГА3'. Какое строение имеет комплементарная ей цепочка ДНК?

- ~5'ЦТЦ-ГУУ-ЦГУ-ЦТУ3'
- ~5'ТЦТ-АГГ-ТАГ-ТЦГ3'
- ~3'АЦА-ГТТ-АГТ-АЦТ5'
- ~5'АГА-ГТТ-УГУ-АГТ3'

~5'ТЦТ-ГУУ-ТГУ-ТЦУЗ'

::075::Если в ДНК 1500 цитозиновых нуклеотидов, которые составляют 15%, сколько других нуклеотидов в этой ДНК

~Г-1500, А-5000, Т-5000

~Г-1500, А-3500, Т-3500

~Г-5000, А-1500, Т-1500

~Г-1500, А-3500, Т-1500

~Г-3500, А-3500, Т-3500

::076::Если в ДНК 1500 цитозиновых нуклеотидов и они составляют 15%, то какова длина этой ДНК

~8000 н.п.

~3700 н.п.

~1000 н.п.

~5000 н.п.

~10000 н.п.

::077::При каком типе репликации ДНК каждая из ее цепей становится матрицей для синтеза новой цепи?

~аналогичный

~полуконсервативный

~идентичный

~дисперсный

~консервативный

::078::С помощью какого фермента осуществляется раскручивание спирали ДНК и разделение ее на две нити при репликации?

~РНК-полимераза

~хеликаза

~лигаза

~рестриктаза

~ДНК-полимераза

::079::Как называется способность клеток к исправлению повреждений в молекулах ДНК?

~транскрипция

~репарация

~репликация

- ~трансдукция
- ~трансформация

::080:: Повреждение ДНК ликвидируется с помощью специфических ферментов

- ~транскрипции
- ~мутации
- ~репараз
- ~обратной транскрипции
- ~репликации

::081:: Ультрафиолетовые лучи обуславливают возникновение в ДНК пиримидиновых димеров. Укажите их

- ~аденин и тимин
- ~гуанин и тимин
- ~тимин и цитозин
- ~гуанин и цитозин
- ~аденин и гуанин

::082:: Транскрипция – это

- ~одна из форм обмена генетической информацией
- ~процесс считывания генетической информации с ДНК на иРНК
- ~процесс синтеза белка по матрице иРНК, выполняемый рибосомами
- ~мутация, при которой в цепи ДНК происходит замена пуриновых оснований
- ~транспорт аминокислот тРНК

::083:: Трансляция – это

- ~процесс синтеза белка по матрице и РНК, протекающий на рибосомах
- ~одна из форм обмена генетической информацией
- ~процесс считывания генетической информации с ДНК на иРНК
- ~мутация, возникшая в процессе биосинтеза белка
- ~транспорт аминокислот тРНК

::084:: С нарушением какого процесса связана неспособность ферментных систем восстанавливать повреждения наследственного аппарата клеток?

- ~генная конверсия

- ~рекомбинация ДНК
- ~репарация ДНК
- ~генная комплементация
- ~редупликация ДНК

::085::Какой именно процесс будет изменён у больных пигментной ксеродермой (нарушение эксцизионной репарации)?

- ~вырезание интронов и соединение экзонов
- ~синтез и-РНК
- ~синтез первичной структуры белка
- ~созревание и-РНК
- ~восстановление молекулы ДНК

::086::Матрицей для синтеза одной молекулы иРНК при транскрипции у бактерий служит

- ~участок одной из цепей ДНК
- ~вся молекула ДНК
- ~целиком одна из цепей молекулы ДНК
- ~цепь молекулы ДНК без интронов
- ~цепь молекулы ДНК без экзонов

::087::Какое строение будет иметь про-иРНК у эукариот?

- ~интрон-интрон-экзон
- ~экзон-интрон-экзон
- ~экзон-экзон-интрон
- ~интрон-интрон
- ~экзон-экзон

::088::Последовательность аминокислот в молекуле гормона инсулина кодируется

- ~последовательностью структурных генов
- ~количеством и последовательностью азотистых оснований ДНК
- ~последовательностью нуклеотидов в экзонных участках гена
- ~определённым чередованием экзонных и интронных участков
- ~количеством и последовательностью нуклеотидов в интронных участках гена.

::089::Как называется процесс синтеза иРНК по матрице ДНК?

- ~репликация
- ~элонгация

- ~трансляция
- ~транскрипция
- ~терминация

::090:: Процесс транскрипции у эукариот осуществляется в

- ~ядре
- ~митохондриях
- ~цитоплазме
- ~лизосомах
- ~комплексе Гольджи

::091:: Синтез иРНК идет на матрице ДНК по принципу комплементарности. Какие кодоны иРНК будут комплементарны триплетам ДНК 3'АТГ-ЦГТ5'?

- ~5'АУГ-ЦГУ3'
- ~5'УАЦ-ГЦА3'
- ~5'АТГ-ЦГТ3'
- ~5'УАГ-ЦГУ3'
- ~5'ТАГ-УГУ3'

::092:: Транскрипция прекращается после того как РНК-полимераза, передвигаясь по ДНК, достигает участка который называется

- ~оператор
- ~репрессор
- ~регулятор
- ~терминатор
- ~стоп-кодон

::093:: Участок ДНК между иницирующим и стоп-кодонами –

- ~промотор
- ~оператор
- ~структурная часть гена
- ~сайленсер
- ~энхансер

::094:: Сколько нуклеотидов кодирует одну аминокислоту?

- ~1
- ~2
- ~3

~4

~5

::095::Стартовым кодоном является

~ГГГ

~УУУ

~ААА

~АУГ

~ЦЦЦ

::096::Генетический код

~моноплетен

~диплетен

~триплетен

~тетраплетен

~пентаплетен

::097::Сколько триплетов если нуклеотидов четыре?

~14

~60

~64

~104

~204

::098::Сколько в генетическом коде стоп-кодонов?

~1

~2

~3

~4

~5

::099::Сколько в гене интронов, если экзонов 8?

~5

~6

~7

~8

~9

::100::Интроны встречаются в геномах

~*Homo sapiens*

~*Agrobacterium tumefaciens*

~*Escherichia coli*

~*Thermus aquaticus*

~*Bacillus turingiensis*

::101::Геном – это

~вся ДНК в гаплоидном наборе хромосом данного вида

~участок молекулы ДНК, несущий информацию об одном белке

~совокупность хромосом организма

~название международного проекта по молекулярной биологии

~место локализации хромосом

::102::Протеом -

~совокупность генов организма

~совокупность всех белков организма

~совокупность всех аминокислот организма

~совокупность ферментов организма

~участок молекулы ДНК, несущий информацию об одном белке

::103::Нуклеотидная последовательность генома вируса SV-40 составляет

~1245 н.п.

~2543 н.п.

~3896 н.п.

~4876 н.п.

~5224 н.п.

::104::Болезнь «корончатые галлы» у растений вызвана

~Ti-плазмидой бактерии *Agrobacterium tumefaciens*

~рестриктазой EcoRI из бактерии *Escherichia coli*

~искусственной плазмидой pBR322, созданной Ф. Боливаром и Р.

Родригесом

~плазмидой pUC18

~саркома вирусом SV40

::105::Нуклеотидная последовательность митохондриального генома человека (мт- ДНК) составляет

~11389 н.п.

~14277 н.п.

~15365 н.п.

~16659 н.п.

~18908 н.п.

::106::Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР-амплификации) фрагментов ДНК in vitro был разработан

~К. Мюллісом

~Дж. Уотсоном и Ф. Криком

~Р. Холли и Г. Кораной

~Г. Темином и Д. Балтимором

~А. Максамом и У. Гилбертом

::107::Международный консорциум по секвенированию генома человека создан

~в 1900 г.

~в 1953 г.

~в 1927 г.

~в 1990 г.

~в 1978 г.

::108::В 1990 г. предпринята первая попытка генотерапии для лечения

~комбинированного иммунодефицита (ADA) у трехлетней девочки Ашанти де Силва

~серповидно-клеточной анемии у пятилетней девочки Ашанти де Силва

~прогерии у шестилетнего мальчика Андреса Хопкинса

~муковисцидоза у семилетней девочки Брайан Дженикс

~лейкемии у 56-летнего мужчины Адама Смита

::109::В 1992 г. впервые начали выращивать в промышленных масштабах трансгенный табак, устойчивый к насекомым

~в Китае

~в США

~в Германии

~в Японии

~в Бразилии

::110::Первое трансгенное растение, предназначенное для употребления в пищу было

~картофель «Голд» устойчивый к каларадскому жуку

~кукуруза «Торнадо» устойчивая к кукурузному мотыльку
~помидор «Флавр-Савр» с длительным сроком хранения
~соя «Раундап» устойчивая к гербициду глифосату
~яблоки «Стоун» с длительным сроком хранения

::111::Полное секвенирование генома человека было завершено

~в 2001 г.

~в 1983 г.

~в 2005 г.

~в 1990 г.

~в 1978 г.

::112::Размер генома человека

~3,2 млн. п. н.

~3,2 тыс. п. н.

~3,2 млрд. п. н.

~32 млрд. п. н.

~32 тыс. п. н.

::113::Размер генома мыши

~2,2 млн. п. н.

~2,2 тыс. п. н.

~3,2 млрд. п. н.

~2,2 млрд. п. н.

~22 тыс. п. н.

::114::Размер генома нематоды *Caenorhabditis elegans*

~80 млн. п. н.

~800 тыс. п. н.

~8 млрд. п. н.

~2,2 млрд. п. н.

~8 тыс. п. н.

::115::Размер генома арабидопсиса

~80 млн. п. н.

~800 тыс. п. н.

~8 млрд. п. н.

~2,2 млрд. п. н.

~8 тыс. п. н.

::116::Размер генома дрозофилы

~80 млн. п. н.

~175 млн. п. н.

~8 млрд. п. н.

~1,75 млрд. п. н.

~175 тыс. п. н.

::117::Фермент ДНК-лигазу открыли

~Г. Мендель в 1900 г.

~Дж. Уотсон в 1953 г.

~Г. Мёллер в 1927 г.

~Э. Тейтум в 1941 г.

~М. Геллер, Б. Вейс и С. Рихардсон в 1966 г.

::118::Лауреаты Нобелевской премии 1978 г. за открытие фермента - рестриктазы

~М. Геллер, Б. Вейс и С. Рихардсон

~Дж. Уотсон и Ф. Крик

~В. Арбер, Д. Натанс и Х. Смит

~Г. Темин и Д. Балтимор

~П. Берг и Г. Бойр

::119::Какой прибор осуществляет процесс определения нуклеотидных последовательностей?

~рН-метр

~секвенатор

~дозиметр

~мультиметр

~центрифуга

::120::Направление исследований изучающее совокупность белков и их взаимодействия в живых организмах

~это физиология

~это анатомия

~это морфология

~это геномика

~это протеомика

::121::Количество генов у человека (Homo sapiens)

~100 000

~20 000

~45 000

~15 000

~32 000

::122::Количество генов у плодовой мушки (*Drosophila melanogaster*)

~13 000

~20 000

~25 000

~32 000

~50 000

::123::Количество генов у арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*)

~25 000

~13 000

~35 000

~10 000

~40 000

::124::Количество генов у круглого червя (*Caenorhabditis elegans*)

~10 000

~12 000

~25 000

~19 000

~33 000

::125::Количество генов у пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*)

~21 000

~15 000

~10 000

~7 300

~6 100

::126::В чем измеряется размер генома?

~в килограммах

~в метрах

~в литрах

~в нуклеотидных парах (н.п.)

~В Вольтах

::127::Кто был инициатором проекта «Геном человека»?

~Г. Мендель

~Дж. Уотсон

~Б. Гейтс

~Дж. Буш

~К. Мюллис

::128::Плазмида – это

~самореплицирующаяся кольцевая молекула ДНК бактерий

~фермент, разрезающий молекулу ДНК

~точка начала транскрипции

~место протекания процесса трансляции

~фермент, сшивающий фрагменты ДНК

::129::Каков размер гена кодирующего белок из 1000 аминокислот?

~1000

~2000

~3000

~4000

~5000

::130::Каков размер белка, если ген содержит 6000 нуклеотидов?

~1000

~2000

~3000

~4000

~5000

::131::Аннотированный банк молекулярно-генетических данных

~Google

~GenBank

~Yandex

~mail.ru

~tut.by

::132::Определение взаимного соответствия нуклеотидов или аминокислотных остатков в последовательностях

- ~секвенирование
- ~взвешивание
- ~прочтение
- ~амплификация
- ~выравнивание

::133::Идентификация всех генов и кодируемых белков, мобильных элементов и семейств повторов в просеквенированном геноме

- ~аннотация генома
- ~электрофорез
- ~секвенирование
- ~ПЦР
- ~ПДРФ

::134::Структурное сходство групп сцепления генов у организмов разных биологических видов

- ~конвергенция
- ~синтения
- ~ароморфоз
- ~параллелизм
- ~идилия

::135::Что такое репортерный ген?

- ~ген, извлеченный из корреспондента
- ~ген транскрипции
- ~ген трансляции
- ~ген репликации
- ~ген, позволяющий проверить экспрессию встроенного фрагмента ДНК

::136::Максимальным по размерам (240 млн. н.п.) в геноме человека является ген

- ~гемоглобина
- ~аденозиндезаминазы
- ~дистрофина
- ~фактора VIII свертываемости крови
- ~актинина

::137::Размер гена инсулина человека составляет

~1,4 млн. н.п.

~1400 н.п.

~14000 н.п.

~14 млн. н.п.

~140 млн. н.п.

::138::Особые последовательности в ДНК, способные удаляться и встраиваться в случайное место на ДНК

~мобильные генетические элементы (транспозоны)

~гены

~аллели

~теломеры

~центромеры

::139::Количественный предел возможных делений клетки называется

~клеточным циклом

~барьером Хейфлика

~бритвой Оккама

~законом Мерфи

~митозом

::140::Сколько генов в геноме Микоплазмы (*Mycoplasma genitalium*)?

~125

~250

~525

~750

~1000

::141::Перенос генов с помощью Ti-плазмид бактерий *Agrobacterium tumefaciens*

~эффективен только для бактерий

~эффективен только для животных

~эффективен для однодольных и двудольных растений

~эффективен только для однодольных растений

~эффективен только для двудольных растений

::142::Баллистический метод переноса генов

~не эффективен для растений

- ~эффективен только для животных
- ~эффективен для растений (в основном, однодольных)
- ~эффективен только для бактерий
- ~эффективен только для вирусов

::143::При встраивании чужеродного гена в геном растений используют следующий репортерный ген

- ~ген устойчивости к канамицину
- ~ген устойчивости к гербицидам
- ~ген устойчивости к инсектицидам
- ~ген инсулина
- ~ген интерферона

::144::Какое растение впервые было наделено устойчивостью к гербициду Roundup генно-инженерным методом

- ~кукуруза
- ~соя
- ~хлопок
- ~картофель
- ~томат

::145::Ген bt токсина (*Bacillus turingiensis*) применяется генными инженерами

- ~для ускорения синтеза хлорофилла в листьях
- ~для ускорения роста растений
- ~для синтеза в растении бета-каротина
- ~для наделения растений устойчивостью к гербицидам
- ~для борьбы с насекомыми вредителями

::146::В каком методе секвенирования используется дидезоксинуклеотидтрифосфаты?

- ~в полимеразной цепной реакции
- ~в секвенировании по Сэнгеру (ферментативный метод)
- ~в секвенировании по Максому-Гилберту (метод химической дегградации)
- ~в репликации
- ~в транскрипции

::147::Каков процент структурных генов в геноме *Escherichia coli*?

- ~5
- ~10
- ~15
- ~20
- ~50

::148::Каков процент структурных генов в геноме человека?

- ~5
- ~10
- ~15
- ~20
- ~50

::149::Какие ферменты будут эффективно разрезать ДНК на фрагменты?

- ~рестриктазы
- ~лигазы
- ~полимеразы
- ~фосфотазы
- ~дегидрогеназы

::150::Опероны присутствуют в геноме?

- ~ Escherichia coli
- ~Mus musculus
- ~Homo sapiens
- ~Felis catus
- ~Canis familiaris

::151::При какой температуре протекает первый этап ПЦР-амплификации?

- ~95
- ~74
- ~60
- ~30
- ~10

::152::При какой температуре протекает второй этап ПЦР-амплификации?

- ~95
- ~72

~60
~30
~10

::153:: При какой температуре протекает третий этап ПЦР-амплификации?

~95
~72
~60
~30
~10

::154:: Нуклеотидная последовательность генома *Escherichia coli* составляет

~4600 н.п.
~4,6 тыс. н.п.
~4,6 млн. н.п.
~46 тыс. н.п.
~460 тыс. н.п.

::155:: Максимальный размер генома необходимый для жизни

~100-150
~150-200
~250-350
~350-400
~400-500

::156:: Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomics (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::157:: Метод позволяющий качественно и количественно определять присутствие целевой ДНК в образце

~секвенирование
~Саузерн-блоттинг

~гель-электрофорез
~ ПЦР в реальном времени
~хроматография

::158::Трисомия по 21 хромосоме – это
~синдром Патау
~синдром «кошачьего крика»
~синдром Дауна
~синдром Клейнфельтера
~синдром Шершевского-Тернера

::159::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomics (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::160::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomics (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::161::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomics (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::162::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomics (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::163::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::164::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::165::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::166::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома

человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::167::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::168::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::169::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::170::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::171::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::172::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::173::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::174::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::175::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::176::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::177::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::178::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::179::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::180::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::181::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::182::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::183::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::184::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::185::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::186::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::187::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::188::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::189::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::190::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::191::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::192::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета
~фирмой Applied Biosystems (США)
~Международным консорциумом по секвенированию генома человека
~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::193::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан
~фирмой Celera Genomisc (США)
~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского

университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::194::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::195::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::196::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::197::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::198::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::199::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

::200::Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан

~фирмой Celera Genomisc (США)

~в лаборатории молекулярной генетики Кембриджского университета

~фирмой Applied Biosystems (США)

~Международным консорциумом по секвенированию генома человека

~в Институте цитологии и генетики СО РАН (Россия)

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ГГУ имени Ф. Скорины

И.В. Семченко



Регистрационный № УД-16.02.20-56/уч.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Учебная программа учреждения высшего образования
по учебной дисциплине для специальности:
1-31 80 01 Биология

2020

Учебная программа составлена на основе учебной программы ведущего учреждения высшего образования (Белорусский государственный университет) «Молекулярная диагностика» для специальности 1-31 80 01 Биология № УД-8270/уч. и учебных планов ГГУ имени Ф. Скорины специальности 1-31 80 01 Биология, регистрационные номера G 31-2-01/Д-19 от 09.04.2019 и G 31-2-01/3-19 от 09.04.2019.

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;

С.А. Зятков, старший преподаватель кафедры зоологии, физиологии и генетики учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

А.В. Крук, первый проректор учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины», к.б.н., доцент

Рекомендована к утверждению:
кафедрой зоологии, физиологии и генетики

протокол № 09 от 13.04.2020

Научно-методическим советом ГГУ имени Ф. Скорины

протокол № 06 от 20.05.2020

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Цель и задачи учебной дисциплины

Цель учебной дисциплины - формирование у студентов представлений о современных методах молекулярной диагностики, об основных достижениях прикладной биохимии, иммунологии, генетики и молекулярной биологии, а также о последствиях революции в молекулярно-диагностических методах для медицины, фармакологии, сельского хозяйства и криминалистики.

Задачи учебной дисциплины: познакомить студентов с современными методами детекции нерегулярных биополимеров, дать представление о направлении развития современных инструментальных методов диагностики.

Место учебной дисциплины в системе подготовки магистра

Учебная дисциплина относится к компоненту учреждения образования учебного плана и входит учебный модуль «Анализ геномных и транскриптомных данных».

Связи с другими учебными дисциплинами, включая учебные дисциплины компонента учреждения высшего образования, дисциплины специализации и др.

Учебная программа составлена с учетом межпредметных связей с учебными дисциплинами «Биоинформатика», «Структурно-функциональная организация геномов», «Аналитические методы транскриптомики» и др.

Требования к компетенциям:

Освоение учебной дисциплины «Молекулярная диагностика» совместно с другими учебными дисциплинами учебного модуля «Анализ геномных и транскриптомных данных» должно обеспечить формирование специализированной компетенции СК-9 «Быть способным применять знания алгоритмов и подходов, используемых в анализе геномных и транскриптомных данных, для решения молекулярно-генетических задач в фундаментальных и прикладных исследованиях, владеть методами молекулярной диагностики и молекулярной систематики».

В результате освоения учебной дисциплины обучающийся должен:

знать:

- строение нерегулярных биологических полимеров;
- принципы, лежащие в основе современных методов детекции биологических макромолекул;
- возможности различных методов молекулярной диагностики;
- особенности организации организмов различной сложности, принципы и специфику их молекулярной детекции;
- требования к организации современных молекулярно-диагностических лабораторий;

уметь:

-корректно оперировать основными биохимическими, генетическими, микробиологическими терминами;

-подбирать приемлемый метод для молекулярно-диагностических исследований,

владеть:

- методами молекулярной диагностики.

Структура учебной дисциплины

Дисциплина изучается в 3 (для очной формы обучения) и 4 семестре (для заочной формы обучения). Всего на изучение учебной дисциплины «Молекулярная диагностика» отведено:

- для очной формы получения высшего образования - 90 часов, в том числе 36 аудиторных часов, из них: лекции - 14 часов, практические занятия - 10 часов, управляемая самостоятельная работа (УСР) - 12 часов.

- для заочной формы получения высшего образования - 90 часов, в том числе 12 аудиторных часов, из них: лекции - 4 часов, практические занятия - 4 часа, управляемая самостоятельная работа (УСР) - 4 часа.

Трудоемкость учебной дисциплины составляет 3 зачетные единицы.

Форма текущей аттестации - зачет.

СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА

Раздел 1. ВВЕДЕНИЕ. СТРОЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ

Тема 1.1. Введение

Определение, цель и принципы молекулярной диагностики. Краткая история развития молекулярно-диагностических методов. Основные классы природных биополимеров.

Тема 1.2. Строение нуклеиновых кислот

Строение и функции нуклеиновых кислот и их роль в передаче наследственного материала. Наличие специфических нерегулярных участков нуклеиновых кислот и белков, доступных для детекции биологическими, химическими и физическими методами. Методы выделения и очистки нуклеиновых кислот.

Тема 1.3. Строение белковых макромолекул

Происхождение белковых биополимерных молекул. Наличие специфических нерегулярных участков биополимеров, доступных для детекции биологическими, химическими и физическими методами. Методы выделения и очистки биополимеров. Ферменты, применяемые в молекулярной диагностике.

Раздел 2. МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Тема 2.1 Физико-химические методы

Методы разделения биомолекул (хроматография, электрофорез) и способы детекции результатов. Биосинтетическое мечение нуклеиновых кислот и белков. Электрофоретический анализ нуклеиновых кислот и белков.

Тема 2.2 Иммунологические методы

Рассмотрение простейших методов на примере реакции агглютинации и преципитации. Использование радиоактивных, флуоресцентных и ферментных меток при иммунологических анализах. Возможности и ограничения методов иммуноферментного анализа (ИФА). Разновидности методов ИФА.

Тема 2.3 Молекулярно-биологические методы

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот. Методы гибридизации в растворе и на твердом носителе. Метод «сэндвич»-гибридизации. Метод блот гибридизации по Саузерну. Метод нозерн-блот-гибридизации. Метод гибридизации in situ. ДНК-биочипы, их преимущества и недостатки.

Тема 2.4 Методы амплификации нуклеиновых кислот

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и её модификации - вложенная («nested»), обратнo-транскрипционная, in situ, мультиплексная, количественная (с детекцией в режиме реального времени – Real-time PCR). Капельно-цифровая ПЦР. Иммуно-ПЦР. Лигазная цепная реакция. Мультиплексная амплификация лигированных зондов (MLPA). Изотермическая

амплификация нуклеиновых кислот - метод транскрипционной амплификации (NASBA), петлевая изотермическая амплификация (LAMP). Детекция продуктов амплификации. Организация технологического процесса постановки амплификации нуклеиновых кислот, устройство ПЦР-лаборатории.

Тема 2.5 Методы секвенирования нуклеиновых кислот

Основные методы секвенирования ДНК (метод Максама-Гилберта и метод Сэнгера). Автоматическое секвенирование ДНК. Анализ больших последовательностей ДНК. Секвенирование нуклеиновых кислот, методы первого, второго и третьего поколения. Метагеномный анализ.

Раздел 3. ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В РАЗЛИЧНЫХ СФЕРАХ ПРИМЕНЕНИЯ

Тема 3.1 Особенности молекулярной диагностики в медицине

Диагностика наследственных заболеваний. Особенности диагностики митохондриальных мутаций. Молекулярные технологии в диагностике инфекционных болезней.

Тема 3.2 Молекулярная диагностика в онкологии

История открытия канцерогенеза. Факторы, способствующие возникновению опухоли. Генетические аспекты канцерогенеза. Протоонкогены. Гены супрессоры. Развитие раковой опухоли на примере генов BRCA1 и BRCA2.

Тема 3.3 Генетическая дактилоскопия

Особенности молекулярной диагностики в криминалистике. ПЦР-дактилоскопия, с помощью сателлитной ДНК. Работы А. Джеффриса по минисателлитному анализу. Микросателлитный анализ в генной дактилоскопии. Определение отцовства, материнства, родства по ДНК. Использование однонуклеотидных полиморфизмов, переменных микро- и минисателлитных ДНК в качестве молекулярно-генетических маркеров.

Тема 3.4 Анализ состава продуктов питания

Анализ продуктов питания на наличие токсинов или патогенной микробиоты. Детекция качества и происхождения продуктов питания (мясо, рыба, соя, пальмовое масло и т.д.), а также фитопатогенных организмов.

Тема 3.5 Молекулярно-генетическая детекция ГМО

Получение и применение трансгенных микроорганизмов, растений и животных. Особенности молекулярной диагностики ГМО. Методы молекулярной диагностики ГМО и в селекционной работе.

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ КАРТА УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЫ
(дневная форма получения образования)

Номер раздела, темы	Название раздела, темы	Количество аудиторных часов					Количество часов УСР	Форма контроля знаний
		Лекции	Практические занятия	Семинарские занятия	Лабораторные занятия	Иное		
1	Введение. Строение биологических макромолекул 1. Введение 2. Строение нуклеиновых кислот 3. Строение белковых макромолекул	2	2				4	Тестовые задания
2	Методы молекулярной диагностики 1. Физико-химические методы 2. Иммунологические методы 3. Молекулярно-биологические методы 4. Методы амплификации нуклеиновых кислот 5. Методы секвенирования нуклеиновых кислот	6	4				4	Тестовые задания
3	Особенности молекулярной диагностики в различных сферах применения 1. Особенности молекулярной диагностики в медицине 2. Молекулярная диагностика в онкологии и фармакологии 3. Генная дактилоскопия 4. Анализ состава продуктов питания 5. Молекулярно-генетическая детекция ГМО	6	4				4	Тестовые задания
Итого		14	10				12	Зачет

Профессор, д.б.н.

Гончаренко Г.Г.

Старший преподаватель

Зятков С.А.

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ КАРТА УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЫ
(заочная форма получения образования)

Номер раздела, темы	Название раздела, темы	Количество аудиторных часов					Количество часов УСР	Форма контроля знаний
		Лекции	Практические занятия	Семинарские занятия	Лабораторные занятия	Иное		
1	Введение. Строение биологических макромолекул 1. Введение 2. Строение нуклеиновых кислот 3. Строение белковых макромолекул	2						Тестовые задания
2	Методы молекулярной диагностики 1. Физико-химические методы 2. Иммунологические методы 3. Молекулярно-биологические методы 4. Методы амплификации нуклеиновых кислот 5. Методы секвенирования нуклеиновых кислот		2				4	Тестовые задания
3	Особенности молекулярной диагностики в различных сферах применения 1. Особенности молекулярной диагностики в медицине 2. Молекулярная диагностика в онкологии и фармакологии 3. Генная дактилоскопия 4. Анализ состава продуктов питания 5. Молекулярно-генетическая детекция ГМО	2	2					Тестовые задания
Итого		4	4				4	Зачет

Профессор, д.б.н.

Гончаренко Г.Г.

Старший преподаватель

Зятков С.А.

ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Перечень основной литературы

1. Сафонова О.А. Современные иммунологические и молекулярно-генетические методы диагностики / О.А. Сафонова, А.В. Семенихина, Т.И. Рахманова, Т.Н. Попова, И.Ю. Степанова. - Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2009. - 68 с.
2. Ершов Ю.А. Основы молекулярной диагностики. Метаболомика / Ю.А. Ершов. - М.: Гэотар-Медиа, 2016. - 336 с.
3. Иллариошкин С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование / С.Н. Иллариошкин. - М.: Медицинское информационное агентство, 2004. - 207 с.
4. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. - М.: Мир, 1999. - 558 с.

Перечень дополнительной литературы

1. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.
2. Основы биотехнологии : учебно-методический комплекс для специальности: 1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность) / сост.: Г. Г. Гончаренко, А. В. Крук ; Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины. - Гомель, 2015. - 247 с.
3. Ребриков Д.В. NGS. Высокопроизводительное секвенирование / Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. - М.: Бином, 2014. - 232 с.
4. Введение в молекулярную диагностику. В 2 томах / под ред. М.А. Пальцева. - М.: Медицина, 2010. - 368 с и 504 с.
5. Patrinos G. Molecular Diagnostics. 3rd Edition / G.P. Patrinos, W. Ansorge, P.B. Danielson - Academic Press, 2016. - 506 p.
6. Bruns D.E. Fundamentals of Molecular Diagnostics / D.E. Bruns, E. R. Ashwood, C.A. Burtis. - Elsevier Health Sciences, 2007. - 298 p.
7. Nucleic Acids as Molecular Diagnostics / Ed. A. Keller and E. Meese. - Wiley, 2014.-360 p.
8. Grody W.W. Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory / W.W. Grody, R.M. Nakamura, F.L. Kiechle. - Academic Press, 2009. - 519 p.
9. Molecular Methods in Plant Disease Diagnostics: Principles and Protocols / Ed. N. Boonham, J. Tomlinson, R. Mumford. - CABI, 2016. - 200 p.
10. Molecular Forensics / Ed. R. Rapley, D. Whitehouse. - Wiley, 2007. - 258 p

Перечень рекомендуемых средств диагностики и методика формирования итоговой оценки

В качестве формы текущей аттестации студентов по учебной дисциплине рекомендован зачёт. Для текущего контроля качества усвоения знаний студентами можно рекомендуется использовать следующий диагностический инструментарий:

- написание студентом эссе;
- проведение коллоквиума;
- устные опросы.

Примерный перечень заданий для управляемой самостоятельной работы обучающихся

Раздел 2. Методы молекулярной диагностики

Тема 2.1 Физико-химические методы

Методы разделения биомолекул (хроматография, электрофорез) и способы детекции результатов. Обзор коммерческих продуктов для молекулярной диагностики, основанных только на физико-химических методах.

Форма контроля - подготовка эссе и презентации на образовательном портале LMS Moodle.

Тема 2.2 Иммунологические методы

Использование реакции антиген-антитело и методы усиления детектирования такого взаимодействия.

Форма контроля - подготовка эссе и презентации на образовательном портале LMS Moodle.

Тема 2.3 Молекулярно-биологические методы

Использование белков, которые избирательно взаимодействуют с определёнными последовательностями нуклеиновых кислот. Примеры диагностических систем, реализованных на таком взаимодействии.

Форма контроля - подготовка эссе и презентации на образовательном портале LMS Moodle.

Примерная тематика практических занятий

Практическое занятие № 1. Строение биологических макромолекул (2 часа).

Практические занятия № 2, 3. Анализ методов амплификации и детекции нуклеиновых кислот (4 часа).

Практические занятия № 4, 5. Работа с последовательностями биополимеров: анализ получаемых данных (4 часа).

Описание инновационных подходов к преподаванию учебной дисциплины

При организации образовательного процесса используется метод анализа конкретных ситуаций, который предполагает:

- приобретение студентом знаний и умений для решения практических задач;
- анализ ситуации, используя профессиональные знания, собственный опыт, дополнительную литературу и иные источники.

Методические рекомендации по организации самостоятельной работы обучающихся

При изучении учебной дисциплины рекомендуется использовать следующие формы самостоятельной работы:

- поиск (подбор) и обзор литературы и электронных источников по индивидуально заданной проблеме курса;
- работы, предусматривающие решение задач и выполнение упражнений, выдаваемых на практических занятиях;
- изучение материала, вынесенного на самостоятельную проработку;
- подготовка к практическим семинарским занятиям;
- подготовка к зачёту;
- научно-исследовательские работы;
- анализ статистических и фактических материалов по заданной теме, проведение расчетов, составление схем и моделей на основе статистических материалов;
- подготовка и написание эссе на заданные темы.

Примерный перечень вопросов к зачету

1. Основные классы природных биополимеров. Функции и особенности строения нуклеиновых кислот, белков, углеводов.
2. Методы выделения и очистки биополимеров.
3. Ферменты, применяемые в молекулярной диагностике.
4. Иммунодиагностические методы.
5. Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот. ДНК-биочипы.
6. Полимеразная цепная реакция и её модификации.
7. Детекция продуктов амплификации по конечной точке и в режиме реального времени.
8. Организация технологического процесса постановки ПЦР - устройство ПЦР-лаборатории.
9. Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот.
10. Полимеразная лигазная реакция. Метод мультиплексной амплификации лигированных зондов.
11. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.
12. Случайная амплификация полиморфной ДНК.

13. Первое поколение методов секвенирования ДНК.
14. Второе поколение методов секвенирования ДНК.
15. Третье поколение методов секвенирования ДНК.
16. Физико-химические методы, используемые в молекулярной диагностике.
17. Особенности молекулярной диагностики в медицине.
18. Особенности молекулярной диагностики в сельском хозяйстве.
19. Особенности молекулярной диагностики в криминалистике.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

**ПРОТОКОЛ СОГЛАСОВАНИЯ УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЫ
ДИСЦИПЛИНЫ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА»
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)
Структурно-функциональная организация геномов	Кафедра зоологии, физиологии и генетики	Содержание учебной программы одобрить	Рекомендовать к утверждению учебную программу в представленном варианте протокол № __ от _____.2020 г.
Биоинформатика	Кафедра зоологии, физиологии и генетики	Содержание учебной программы одобрить	Рекомендовать к утверждению учебную программу в представленном варианте протокол № __ от _____.2020 г.

**ДОПОЛНЕНИЯ И ИЗМЕНЕНИЯ К УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЕ
ПО ИЗУЧАЕМОЙ УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ**

на ____ / ____ учебный год

№ № пп	Дополнения и изменения	Основание

Учебная программа пересмотрена и одобрена на заседании кафедры
(протокол № ____ от _____ 2020 г.)

Заведующий кафедрой _____ Г.Г. Гончаренко

УТВЕРЖДАЮ

Декан биологического факультета

УО «ГГУ им. Ф. Скорины», д.б.н. _____ В.С. Аверин

4.2 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)* – 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.

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

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

Аминоацил-тРНК-синтетаза (кодаза) - фермент, который катализирует присоединение аминокислоты к соответствующей ей молекуле тРНК (рис).

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.

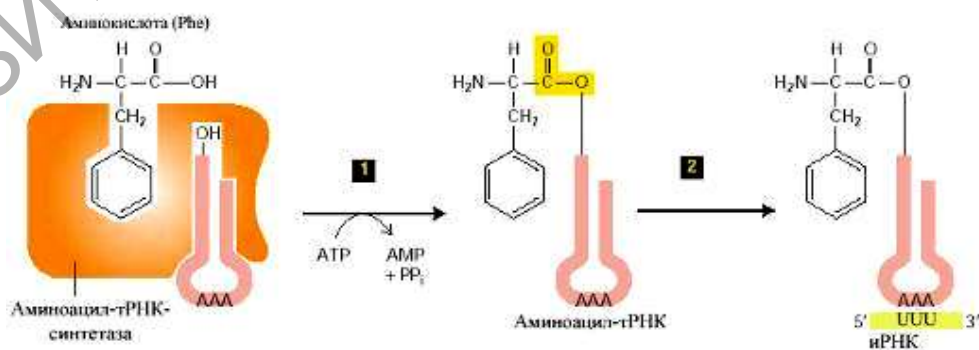


Рис. Присоединение аминокислоты фенилаланина к терминальному аденозину соответствующей тРНК с помощью фермента аминоацил-тРНК-синтетазы (1 этап) и соединение антикодона AAA аминокислот-тРНК^{Phe} с соответствующим кодоном УУУ мРНК (этап 2)

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.

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

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

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

Амплификатор, 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°C) и удлинение праймера (синтез цепи ДНК при $70\text{-}72^\circ\text{C}$).

Антиген («иммуноген») – вещество, которое вызывает возникновение специфического иммунного ответа и специфически реагирует с антителами, возникающими при введении антигена в организм.

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

Антитело – сложное природное соединение (гликозилированный полипептид), возникающее в результате иммунного ответа организма при введении в организм или попадании в него чужеродных веществ, а также возбудителей инфекционных болезней, разнообразных паразитов и т.д.

Б

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

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

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

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

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

Бластула (*blastula*) – зародыш многоклеточных животных, образующийся в процессе последовательных дроблений яйца (зиготы), от

типа которых зависит строение Б.

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

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, функционально эквивалентен боксу Прибнова у прокариот.

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.).

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

Величина генома (genome size) – количество пар оснований (п.о.) 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.

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 раз-

рушена в процессе репликации, и В. освобождается из клетки. В., патогенные для бактерий называют бактериофагами (см.).

Вирус sv-40, вирус обезьян – полиомавирус, геном которого состоит из кольцевой двунитчатой молекулы ДНК размером в 5,2 кб, содержащей 5 генов. Впервые был обнаружен у 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.

Выравнивание последовательностей (alignment) азотистых оснований в нуклеиновых кислотах или аминокислот в полипептидных цепях белков называют определением взаимного соответствия остатков (нуклеиновых оснований или аминокислотных остатков, соответственно) в этих двух или нескольких последовательностях, при котором сохраняется исходный порядок остатков в последовательностях.

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. Входят в состав гетерохроматина и сателлитной ДНК.

Г

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

Гель – желеобразный матрикс, состоящий из полимерного компонента и буферного раствора, используется для разделения в процессе электрофореза молекул 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 некодирующих

(интроны) последовательностей. Интронные последовательности чаще всего встречаются у эукариот. Любой Г., занимает строго определенное место, или локус (см.), в хромосоме и может мутировать в различные аллельные состояния, а также рекомбинировать с гомологичными генами. Действие Г. проявляется в фенотипе. По выполняемым функциям Г. подразделяют на 3 класса: а) структурные Г., которые транскрибируются (см. Транскрипция) на ДНК, а затем транслируются на рибосомах (см. Трансляция) в полипептидные цепочки; б) структурные Г., которые транскрибируются в рРНК или тРНК и сами непосредственно используются; в) регуляторные Г., которые не транскрибируются, но служат сайтами узнавания (см.) для ферментов и др. белков при репликации и транскрипции ДНК. Термин введен В. Иогансеном в 1909 г. и нередко заменяется понятиями "наследственный фактор".

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

Ген-регулятор (*regulator gene*) – ген, кодирующий белок-репрессор, взаимодействующий с геном-оператором и таким образом регулирующий транскрипцию "своего" оперона у прокариот.

Генная терапия - лечение наследственных заболеваний путем введения генов в клетки пациентов с целью направленного изменения генных дефектов.

Генетическая дактилоскопия и идентификация индивидуумов – точная идентификация (дактилоскопия) 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.

Генная дактилоскопия – точная идентификация (дактилоскопия) особи на основе молекулярно-генетического анализа индивидуальных образцов ДНК (см. ДНК-фингерпринтинг, Фингерпринт ДНК).

Геном (*genome*) – совокупность генов, составляющих гаплоидный набор хромосом данного вида организма. Основным 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 (*genomic 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 оогамия (у всех животных, всех высших и многих низших растений), при которой яйцеклетка и сперматозоид (спермий) различаются по размеру, форме и поведению.

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

Глобальное выравнивание – это выравнивание всей последовательности относительно другой последовательности.

ГМО (генетически модифицированный организм) – организм, генотип которого был искусственно изменён при помощи методов генной инженерии (см. Наследственно измененные организмы, трансформированные организмы, трансгенные организмы).

Гуанин, Г [guanine, G, исп. *huanu* – навоз и *-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.

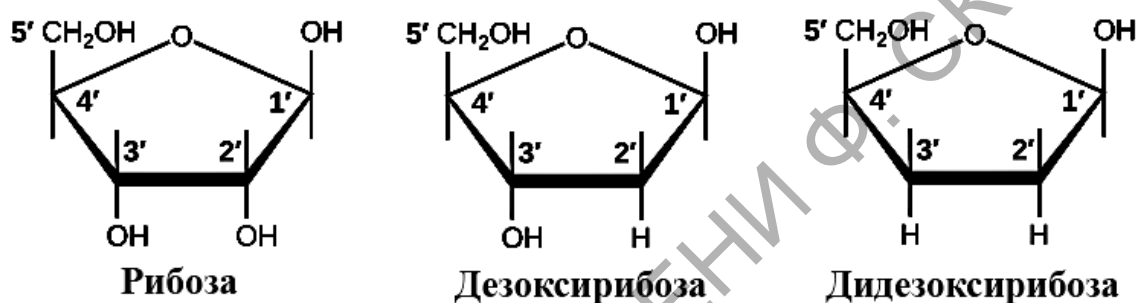
Д

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 дезоксинуклеотидов.



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 (*ssДНК*), как, напр., у некоторых вирусов, или двунитчатой (*dsДНК*) у всех высших организмов. У двунитчатой ДНК две комплементарные нити закручены в спираль, одна нить вокруг другой с противоположной ориентацией (антипараллельны, 5' → → → 3' и, наоборот, 3' → → → 5'). Две нити удерживаются вместе водородными связями между комплементарными основаниями (А = Т; Г = Ц). ДНК способна к самоудвоению, что обеспечивает генетическую преемственность между поколениями в процессе размножения. Нарушение последовательностей нуклеотидов в цепи ДНК приводит к наследственным изменениям – мутациям.

Денатурация ДНК – 1. Процесс разъединения двойной спирали нуклеиновых кислот на комплементарные одноцепочечные нити под действием физических и химических факторов (температуры, давления, pH и др.). 2. Первая стадия ПЦР в ходе которой происходит нагревание температуры в реакционной смеси *in vitro* до 90°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., содержит 79 экзонов).

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

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

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

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

ДНК-полимеразы (*DNA-polymerases*) – ферменты, участвующие в синтезе ДНК. У *E. coli* были выделены 3 типа ДНК-п.: *pol I*, *pol II* и *pol III*. *Pol III* является основным ферментом, ответственным за репликацию (см.) ДНК в клетке бактерий. Два др. фермента функционируют преимущественно при восстановлении (репарации) ДНК. Эукариоты содержат множество видов ДНК-п., находящихся в разных

частях клетки: в ядре, цитоплазме или митохондриях, и выполняют различные функции, такие, как репликация, репарация и рекомбинация.

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

Е

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

EcoRI – одна из широко применяемых рестрикционных эндонуклеаз, или рестриктаз (см.), извлекаемая из *Escherichia coli*, которая в двухцепочечной ДНК узнает последовательность из шести нуклеотидов ГААТТЦ и разрезает ее между Г и А, образуя липкие концы (см.).

И

Инвертированный повтор – участок молекулы нуклеиновой кислоты, два сегмента которого имеют одинаковую нуклеотидную последовательность, но противоположную ее ориентацию.

Иницирующий кодон (*initiator codon*) – кодон АУГ в составе мРНК, кодирующий метионин (формилметионин), с которого начинается (инициируется) синтез многих (возможно - всех) полипептидных цепей, у бактерий кроме АУГ инициацию определяет иногда ГУГ, у эукариот – всегда АУГ.

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 (см.) 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 приёмов переноса фрагментов ДНК, целых генов или их частей.

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

In vivo – это выращивание живого материала в естественных условиях.

К

Канцерогенез (рак) – сложный многостадийный процесс, для реализации которого необходимо несколько последовательных генетических событий, включающих аномальную или неконтролируемую пролиферацию (размножение) клеток.

Капиллярный электрофорез – метод основанный на разделении компонентов сложной смеси (фрагментов ДНК) в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля.

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 плаزمидях (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 секвенса ДНК (см. Секвенирование ДНК).

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

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

Кладограмма – это филогенетическое дерево, не содержащее информации о длинах ветвей.

Клон – культура, возникшая из одной клетки.

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

Клонирование гена (*gene cloning*) – см. Клонирование

Клонирование ДНК (*DNA cloning*) – использование технологии рекомбинантной ДНК для инсерции (включения) фрагмента ДНК, напр, гена, в клонирующий вектор (см.) и размножение этой последовательности путем трансформации вектора в подходящую клетку-хозяина, напр, в клетки кишечной палочки.

Кодон – последовательность из трех рядом стоящих 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 дезоксирибозы.

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 3'-terminus*) – один из концов линейной молекулы ДНК или РНК, несущий нуклеотид со свободной гидроксильной (ОН⁻) группой у 5'-атома углерода рибозы или дезоксирибозы. С 5'-конца начинается синтез полинуклеотидных цепей в процессе репликации (см.), транскрипции (см.) и репарации (см.).

Конкатамер ДНК (*DNA concatemer*) – структура из нескольких повторяющихся (одна за другой) единиц гена. У некоторых фагов (напр., фагλ и T4) геном во время репликации представлен в виде конкатамерных молекул – больших молекул ДНК, образованных из нескольких tandemно повторяющихся единиц генома.

Конструирование гибридных молекул ДНК – создание новых форм биологически активных ДНК с помощью искусственных приёмов переноса и сшивания различных фрагментов ДНК.

Контиг (*contig*) – это консенсусная непрерывная нуклеотидная последовательность, составленная из отдельных перекрывающихся *ридов*. *Контиги* являются первым исходным результатом обработки сырых *ридов* с помощью программы-сборщика генома.

Концевая (терминальная) трансфераза (*terminal transferase*) – фермент, катализирующий достройку 10-40 дезоксинуклеотид-5'-трифосфатов к 3'-ОН-группам обоих концов двунитчатой ДНК или к одонитчатой ДНК, образуя 3'-гомополимерное удлинение нити (полидезоксиаденилат) и освобождая неорганический пирофосфат. Фермент используется для радиоактивного мечения молекулы ДНК и образования гомополимерных хвостов на 3'-концах ДНК. Т. т. широко используется в технологиях рекомбинантной ДНК (см.).

Конъюгат – искусственная молекула, которая состоит не менее чем из двух химически объединенных компонентов, часто различного происхождения; для проведения ИФА используют обычно конъюгаты, которые содержат ферментную (или иную) метку, пришитую к антигену (антигенам), антителам или белку A *Staphylococcus aureus*.

Космиды – векторная плаزمид, 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 -

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 β -галактозидазу), *lacY* (β -галактозид-пермеазу), *lacA* (β -галактозидтрансацилазу), – в результате транскрипции Л.о. образуется полицистронная мРНК; белок-репрессор 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 β -галактозидазу. Этот фермент катализирует превращение дисахаридов лактозы в моносахариды и глюкозу. *lac-Z-ген* входит в состав различных клонирующих векторов и выполняет роль репортерного гена (см.) в экспериментах по трансформации.

Лигаза, синтетаза – см. ДНК-лигаза.

Лигирование (*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.).

Линия – культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

Линкер, линкерная ДНК (*linker, l. DNA*) – Синтетический олигонуклеотид определенной последовательности, содержащий один или несколько сайтов узнавания (см.) для рестрикционных эндонуклеаз (см.). Л. может быть лигирован к любому тупому концу (см.) дуплексной ДНК с помощью *T4*ДНК-лигазы (см.).

Липкий конец – термин, относящийся к двунитчатой молекуле ДНК, у которой одна нить длиннее ("выступающая"), чем другая ("заглубленная"). Выступающий участок нити может спариваться с др., комплементарным ему выступающим (липким) концом. Пример: два коротких (12 нуклеотидов) однонитчатых 5'-выступов на каждом конце линейного генома фага лямбда (*cos*-сайт). Эти Л. к. комплементарны по последовательностям нуклеотидов друг другу и могут спариваться, образуя кольцевую ДНК.

Локальное выравнивание – это поиск части последовательности, которая совпадает с частью другой последовательности.

Люцефераза – фермент, катализирующий реакцию, сопровож-

дающуюся 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.

Маркер для селекции (селективный маркер) – специальный ген, кодирующий устойчивость к к.-л. антибиотику (напр., канамицину), который вводят в вектор для последующего отбора трансформантов.

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 O₆-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.

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 использоваться в различных генетических экспериментах.

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 (митохондрий и пластид), состоящие из большого количества – до 100 и выше – tandemно повторяющихся иден-

тичных «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.), средне-повторяющиеся, тандемно 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 тандемных повторов (см.), что ведет к образованию последовательностей длиной от 0,1 до 20 кб. Короткий тандемно повторяющийся М.-с., являясь хорошим генетическим маркером для анализа сцепления (см. ДНК-фингерпринтинг), может использоваться в качестве гибридизационного зонда для одновременного обнаружения высокополиморфных М.-с. в пределах рестриктов ДНК. Вероятность идентичности того же набора фрагментов ДНК у двух человек теоретически настолько мала, что каждый человек считается уникальным по набору полос (за исключением однойцевых близнецов, см.), выявляющихся в результате гибридизации на радиоавтографах.

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-кодonom 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.

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 мо-



Рис. – Дж. Уотсон и Ф. Крик. 1953 г.

дела 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 тиминном 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 диагностика может давать точную идентификацию наследственных заболеваний на всех стадиях развития и жизни организма человека, начиная с восьмиклеточной бластулы (пре-эмбриона), всех эмбриональных стадий внутриутробного развития, пост эмбриональных стадий и т.д.

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.

Мутаген – физический или химический агент, увеличивающий частоту мутаций по сравнению со спонтанным уровнем.

Мутуализм [лат. *mutuus* взаимный, обоюдный] - форма симбиоза (обоюдосторонний симбиоз), при которой оба партнера приносят друг другу пользу.

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.

Нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды (nucleic acid) – универсальные биополимеры, состоящие из рибо- или дезоксирибонуклеозидмонофосфатов, соединенных фосфодиэфирными связями, образованными между 5'-фосфатом одного нуклеотида и 3'-гидроксильной группой следующего. Различаются по типу входящих сахаров на 2 основных типа Н.к. - дезоксирибонуклеиновая кислота, ДНК (DNA) и рибонуклеиновая кислота, РНК (RNA). Главная роль Н.к. - хранение и передача генетической информации. Термин Н.к. предложен в 1889. Впервые Н.к. обнаружена Ф.Мишером в 1868 в лейкоцитах человека и сперматозоидах лосося.

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 двунитчатую ДНК с использованием в качестве матрицы однонитчатой РНК. О. т. широко используются в ДНК-рекомбинантной технологии для синтеза кДНК (см.) с информационной РНК и в генной инженерии для получения нужных ДНК *in vitro*. У некоторых ретровирусов (см.) О. т. является мономером, у других – димером.

Олиго(dT) праймер (*oligo(dT) primer*) – синтетический гомополимерный олигодезоксирибонуклеотид, который может быть подсоединен к поли(А) хвосту (см.) полиаденилированной иРНК и использоваться как праймер (см.) для синтеза первой нити кДНК с помощью обратной транскриптазы.

Олигонуклеотидные затравки – см. праймер.

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 прочитывании 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 λ , *E. coli* и вируса обезьян sv-40.

Плазмиды – внехромосомный (экстрахромосомный) генетический элемент, кольцевая, автономно реплицирующаяся дуплексная молекула ДНК, имеющая размеры от 1 до 200 и более кб и от одной до нескольких сот копий на бактериальную клетку. Число копий П. может зависеть от факторов среды. П. обычно придают селективные преимущества клетке хозяина (напр., устойчивость к антибиотикам). Конъюгативные П. имеют набор генов, обеспечивающих их перенос в др. клетки. Бактериальные П. широко используются для конструирования векторов клонирования. Термин «П.» предложен Дж. Ледербергом и др. в 1952 г.

Плазмида pBR322 – серия сравнительно небольших, мультикопийных и неконъюгативных плазмидных векторов клонирования, содержащих гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину, а также несколько уникальных сайтов клонирования (или полилинкеры). Сайты клонирования локализованы в пределах одного из генов устойчивости. Это позволяет обнаруживать инсерцированную чужеродную ДНК по исчезновению устойчивости к антибиотику на селективной среде. Плазмида синтезирована в 1977 г. мексиканскими исследователями Боливаром и Родригесом. Они использовали ген тетрациклин-устойчивости от 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^r* геном, кодирующим ампициллин-устойчивость, ориджином репликации *ori* (см.) и последовательностями, кодирующими α -пептид *lac-Z*-гена (β -галактозидазы) с полилинкером (см.). Инсерция чужеродной ДНК в полилинкер приводит к нарушению β -галактозидазного гена. В этом случае хозяйская бактериальная клетка образует бесцветные колонии, если она растет на среде с ампициллином и субстратом *X-gal*, который должен расщепляться при помощи β -галактозидазы. Штаммы, трансформированные плазмидой pUC18 без вставки чужеродной ДНК на той же среде с *X-gal*, образуют колонии окрашенные в синий цвет. Т. обр., можно легко отбирать рекомбинантные (т. е. с чужеродной ДНК) колонии.

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).

Покрытие (*coverage*) – это сколько раз в среднем нуклеотид генома покрыт *ридами*. Для секвенирования *de novo* хорошим (*high coverage*) считается покрытие 50-100х.

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 клонирования чужеродных ДНК в любом из этих сайтов.

Полимеризация – третья стадия цикла ПЦР в ходе которой при увеличении температуры в реакционной смеси *in vitro* с 50°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 ценная реакция, ПЦР (*polymerase chain reaction, PCR*) – процесс амплификации (см.) *in vitro*, при котором фрагмент ДНК длиной до 15 кб может быть амплифицирован (размножен) до 10^8 раз (копий). Для этого синтезируются два олигонуклеотида размером в 10-30 нуклеотидов, комплементарных последовательностям на двух концах исследуемой ДНК. Избыточное количество этих двух олигонуклеотидных праймеров (см.) смешивается с геномной ДНК, смесь нагревается для денатурации дуплексов ДНК. При последующем снижении температуры праймеры присоединяются к их геномным гомологам и могут с помощью ДНК-полимеразы удлиниться, т. е. на ДНК-матрице синтезируется вторая цепь. Последовательный процесс (цикл процессов) денатурации, отжига праймера и его удлинения повторяется 20-40 раз. В результате происходит экспоненциальное увеличение копий изучаемой ДНК. За 25 амплификационных циклов количество целевых последовательностей ДНК увеличивается приблизительно в 10^6 раз. Для синтеза новых цепей ДНК используются термостабильные ДНК-полимеразы (*Taq*-полимераза, *Vent*TM-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 в реальном времени (количественная ПЦР, кПЦР, ПЦР-РВ, англ. *Real-time PCR, qPCR*) – лабораторный метод, основанный на классическом ПЦР, позволяющий определять не только присутствие целевой нуклеотидной последовательности в образце, но и измерять количество её копий.

Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами (*arbitrarily primed polymerase chain reaction, AP-PCR*) – модификация

стандартного метода ПЦР, позволяющая осуществлять амплификацию (см.) целевых последовательностей ДНК с помощью произвольно взятых праймеров (см.), без предварительного знания нуклеотидных последовательностей данного генома. Метод позволяет выявлять полиморфизм между штаммами бактерий и грибов, различными сортами растений.

Полиморфизм [гр. *polys* – много + *morphe* – форма] – многоформность, существование организмов одного и того же вида, различающихся между собою по форме тела или др. признакам.

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.

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 двунитчатой молекуле ДНК число адениновых оснований всегда равно числу тиминовых ($A = T$), а число гуаниновых – числу цитозиновых ($G = C$) оснований. Согласно П. Ч. количество пиримидинов ($T + C$) равно сумме пуринов ($A + G$). П. Ч. открыто в 1950 г. и лежит в основе классической модели ДНК Уотсона-Крика.

Праймер, затравка (*primer*) – короткий олигонуклеотид ДНК или РНК, комплементарный участку более длинной молекулы ДНК или РНК. К его 3'-ОН-концу ДНК-полимераза (см.) может добавлять нуклеотиды в растущую цепь ДНК в 5'–3'-направлении. У прокариот РНК-полимераза (см.) катализирует синтез таких РНК-праймеров для репликации ДНК. П. также нужны для РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы, см.). *In vitro* (см.) используются синтетические П. размером до 10 п. о. для реакции полимеризации

ДНК с помощью ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы, П. нужны для синтеза кДНК, ДНК секвенирования по Сэнгеру (см.), полимеразной цепной реакции, ПЦР (см.) и др.

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 взаимодействующих молекул или их частей, приводящая, как правило, к образованию вторичных (Ван-дер-Вальсовых, водородных, ионных) связей между ними. Уникальность и прочность комплементарных структур определяется высокой избирательностью, большой площадью взаимодействия на уровне атомных группировок или зарядов по принципу «ключ - замок» (комплексы антиген – антитело и фермент – субстрат, четвертичная структура белков, вторичная и третичная структура нуклеиновых кислот). Наиб. ярко К. проявилась в структуре двуспиральных ДНК и РНК, где две полинуклеотидные цепи образуют в результате комплементарного взаимодействия пар пуриновых и пиримидиновых оснований (А-Т, Г-Ц) двуспиральную молекулу. Уникальная вторичная и третичная структура одноцепочечных полинуклеотидов (тРНК, рРНК) также определяется комплементарным спариванием оснований с образованием «петель» и «шпилек» вдоль по цепи. К. лежит в основе мн. явлений биол. специфичности, связанных с «узнаванием» на молекулярном уровне.

Прионы [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 α -спиралей белка в β -слои. Прионы – единственные инфекционные агенты, размножение которых происходит без участия нуклеиновых кислот.

Промотор (*promoter*) – участок молекулы ДНК длиной 80-120 п. н., к которому присоединяются молекулы РНК-полимеразы, что сопровождается инициацией транскрипции соответствующих генов; каждый ген (или оперон) имеет свой П., контролирующий его тран-

скрипцию; 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.

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.

Проявитель – смесь ферментного субстрата с хромогеном, которая служит для обнаружения (проявления) иммуноферментной реакции; после взаимодействия фермента с субстратом реакционная смесь, содержащая продукт реакции, окрашивается под действием хромогена.

ПЦР (PCR) – см. Полимеразная цепная реакция.

ПЦР-амплификации – см. полимеразная цепная реакция (ПЦР), амплификация генов.

ПЦР в реальном времени (Real-time PCR, qPCR, qRT-PCR) – лабораторный метод на основе полимеразной цепной реакции, включающий в себя одновременно детекцию и количественное определение специфической последовательности ДНК в образце.

ПЦР технологии – различные методы размножения (амплификация) ДНК с помощью ПЦР.

Р

Радиоактивно меченный ДНКовый зонд – см. ДНКовый зонд.

Разделение рестрикционных фрагментов ДНК – см. Электрофорез в агарозном геле.

Распознаваемые участки – см. Сайты распознавания.

Репликация – процесс точного самовоспроизведения молекул нуклеиновых кислот, сопровождающийся передачей точных копий генетической информации в ряду поколений. Термин Р. в основном используется для определения процесса синтеза новой нити ДНК на

матричной нити ДНК с целью точного копирования информации, содержащейся в геноме. Р. ДНК является полуконсервативной. Основные стадии этого процесса включают разделение нитей ДНК с образованием репликативной вилки, связывание ДНК-полимеразы и добавление комплементарных нуклеотидов начиная с 3'-конца. Нить, непрерывно реплицирующаяся (ведущая нить, лидерная нить), должна отделяться от др. (запаздывающей) нити, которая реплицируется прерывисто, короткими кусками (фрагменты Оказаки). После синтеза фрагменты Оказаки лигируются (с участием ДНК-лигазы), образуя целую запаздывающую нить.

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. Бренне-ром в 1963.

Репортерный ген (*reporter gene*) – ген, хорошо изученный генетически и биохимически, который легко может быть сшит с регуляторной областью др. генов. Его активность в норме не обнаруживается в организме, в который этот ген переносится. Активность большинства Р. г. можно легко протестировать достаточно простыми методами (напр., определением ферментативной активности белкового продукта для галактозидазы, β -глюкуронидазы, хлорамфениколацетилтрансферазы, люциферазы, неомицин фосфотрансферазы, нопалинсинтазы и др.).

Репрессор – [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.

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.

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.

Референсный геном (*reference genome*) – созданная учеными электронная база данных нуклеотидных последовательностей, которая представляет собой эталон генома какого-либо вида.

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 многих вирусов вся генетическая информация вместо ДНК содержится в одно- и двунитчатых РНК.

Рибосома – органоид клетки, с помощью которого осуществляется биосинтез белка. Р. представляет собой асимметричную рибонуклеопротеидную частицу диаметром 10–20 μm , которая состоит из двух субъединиц и обладающая каталитической функцией, ответственной за образование пептидных связей, т. е. за полимеризацию аминокислотных остатков в полипептидную цепь белка. При связывании Р. с информационной РНК начинается синтез полипептидов.

Малая субъединица содержит единственную цепь рРНК (16S – у прокариот, хлоропластов и растений, 18S рРНК – у животных), связанную с рибосомными белками (S-белки), которая связывается с иРНК. Большая субъединица является комплексом большой цепи рРНК (23S рРНК – у прокариот, 25S – у растений и митохондрий, 28S – у животных) и одной или двух малых рРНК (5S – у прокариот, 5S и 5,8S – у эукариот), а также рибосомных L-белков. Этот комплекс имеет центры для присоединения 2–3 молекул транспортной РНК.

Рид (read) – короткая нуклеотидная последовательность, полученная в ходе секвенирования. Размер *риды* зависит от типа используемого метода секвенирования и секвенатора. Так для «сэнгеровских» секвенаторов можно получать *риды* до 1000 н.п., при этом после 700–800 н.п. качество считывания начинает падать.

С

Сайт клонирования – место (сайт) расщепления ДНК определенной рестриктазой в векторе клонирования, которое локализовано в пределах одного из генов устойчивости. Это позволяет обнаруживать инсерцированную чужеродную ДНК по исчезновению устойчивости к антибиотик у на селективной среде в процессе клонирования (см.).

Сайт рестрикции – последовательность пар оснований в молекуле ДНК, в месте расположения которой определенная рестрикционная нуклеаза разрезает (расщепляет) ее.

Сайт узнавания – специфическая последовательность ДНК, с которой связываются рестрикционные эндонуклеазы, а также начинается расщепление молекулы ДНК данным ферментом. Для каждой рестриктазы имеется собственная специфическая последовательность узнавания. Обычно С. у. представлен коротким палиндромом (см.).

Cos-сайты (cos-sites) – односторонние, комплементарные участки на обоих концах ДНК фага лямбда (см. Липкие концы), состоящие из 12 нуклеотидов. Обеспечивают фагу образование кольцевых структур путем соединения комплементарных концов и упаковку ДНК в фаговые частицы. Cos-с. используются для конструирования космид (см.).

Самостоятельная репликация – способность ряда внехромосомных генетических элементов (плазмид) к автономной репликации.

Сателлитная ДНК – избыточная геномная ДНК, как правило, резко отличающаяся соотношением 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 (см.); С.ДНК может быть выделена при центрифугировании в градиенте плотности хлорида цезия в виде до-

бавочной, спутниковой (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.

Сборка генома (genome assembly) – процесс воссоздания генома из большого числа коротких нуклеотидных фрагментов (*ридов*) длиной от 50 до нескольких тысяч нуклеотидов в одну или несколько длинных последовательностей (*контигов* или *скаффолдов*).

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 de novo – расшифровка абсолютно неизвестных последовательностей ДНК, например, генома какого-нибудь нового вида.

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 в XX веке. Вначале ДНК режется на фрагменты размером 0,6–2,0 кб, концы фрагментов метятся радиоактивной или нерадиоактивной меткой и плавятся для получения одонитчатых молекул. Радиоактивное мечение может осуществляться изотопами серы ^{35}S или фосфора ^{32}P , нерадиоактивное мечение – с помощью биотиновой или флуоресцентной метки. После мечения образец ДНК разделяется на 4 части, каждую из которых обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно из четырех оснований ДНК. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений. Когда эти повреждённые молекулы обрабатывают пиперидином, в ДНК образуется разрыв в том месте, где находилось разрушенное основание. В результате получается набор 5'-меченых фрагментов, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца молекулы. Фрагменты, полученные в результате 4 типов реакции, подвергаются электрофорезу (см.) в полиакриламидном геле, и затем полосы выявляются соответствующим методом в зависимости от способа мечения. На основе результатов электрофореза определяются нуклеотиды и их последовательность в исходной ДНК.

Секвенирование ДНК по Сэнгеру, ферментативный метод (*Sanger sequencing or enzymatic method s.*) – техника секвенирования (см.) одонитчатой ДНК. В основе метода – присоединение к одонитчатой ДНК-матрицы секвенирующего праймера (синтетических олигонуклеотидов). Реакционная смесь переносится в 4 пробирки, куда добавляются все 4 дезоксинуклеозидтрифосфата, один из которых мечен по ^{32}P . Каждая пробирка содержит также различные дидезоксинуклеозидтрифосфаты (ддАТФ, ддЦТФ, ддГТФ и ддТТФ). Для синтеза комплементарной цепи к одонитчатой 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, цепь прерывается. 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 и с помощью радиоавтографии выявляются радиоактивные полосы. Последовательность нуклеотидов в исходной ДНК-матрице прочитывается прямо с радиоав-

тограммы.

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.

Сигнальный пептид – участок из 15-30 аминокислотных остатков на N-конце белка, который, как полагают, участвует в секреции (прохождении через клеточную мембрану) белка. После выделения белка из клетки сигнальный пептид удаляется.

Сиквенс ДНК – см. *Секвенирование ДНК*.

Скаффолд (*scaffold*) – это последовательность *контигов* расположенных и ориентированных в порядке их расположения на (теоретической) хромосоме. Для получения скаффолдов необходимы как сами контиги, так и вспомогательная информация (например, референсный геном, или данные *paired-end*) которая позволит расположить *континги* относительно друг друга.

Скрининг (англ. *screening* - отбор, сортировка) – поиск в генной библиотеке клонов конкретной колонии, содержащей нужный фрагмент чужеродной ДНК.

Слияние изолированных протопластов – формирование одной клетки из двух и более объединением их поверхностных мембран.

Создание рекомбинантных ДНК – конструирование новых последовательностей ДНК, образованных *in vitro* путем сшивания двух или более негомологичных молекул ДНК. Первая рекомбинантная ДНК была создана (сконструирована) в 1972 г. П. Бергом и включала в себя фрагменты фага λ , *E. coli* и вируса обезьян *sv40* (см. Первая рекомбинантная (гибридная) молекула ДНК).

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 эу-

кариот; в результате С. происходит удаление из молекулы-предшественника последовательностей интронов и ковалентное соединение последовательностей экзонов с образованием зрелых молекул мРНК.

Стоп-кодон, нонсенс-к., терминатор – тринуклеотид в информационной РНК, 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.

Субстрат – вещество, на которое специфически направлено действие фермента. В результате взаимодействия фермента с субстратом возникает продукт реакции.

Sma I – одна из рестрикционных эндонуклеаз, или рестриктаз (см.), которая в двухцепочечной ДНК узнает последовательность из шести нуклеотидов ЦЦЦГГГ и разрезает ее между Ц и Г, образуя ровные (тупые) концы (см.).

Т

Tag-полимераза, Tag-ДНК-полимераза (*Tag polymerase or Tag DNA p*) – фермент из термофильной эубактерии *Thermus aquaticus*, осуществляющий полимеризацию дезоксинуклеотидов. Фермент исключительно термостабилен (оптимум температуры 70-75 °С) и обеспечивает выборочную амплификацию (см.) любой клонированной ДНК до 10 млн. раз с высокой точностью методом т. н. полимеразной цепной реакции (см. ПЦР). Может использоваться для мечения фрагментов ДНК с помощью радиоактивных нуклеотидов, а также биотина или дигоксигенина.

Thermus aquaticus – термофильная эубактерия, обитающая в горячих источниках. Из нее был выделен фермент Tag-полимераза, который отличается устойчивостью к высокой температуре и способен работать с большой скоростью при температуре 70°С в ходе третьей стадии цикла ПЦР.

Таблица (словарь) генетических кодов, 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 полипептидной цепи от рибосомы (см.).

Тандемный повтор (*tandem repeat*) – организация двух или более расположенных рядом одинаковых последовательностей в преде-

лах двунитчатой молекулы ДНК. Возможны два типа их ориентации – прямые повторы (голова к хвосту 5' – ЦГААТЦ ГТТАТЦГ ГТТАТЦГ АЦГГТ – 3') или не прямые повторы (голова к голове 5' – ЦГААТЦ ЦТТАТЦГ ГЦТАТТГ АЦГГТ – 3'). Т. п. в области кодирующих генов могут вести к тандемно повторяющимся аминокислотным последовательностям.

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)_n, 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 ААЦЦЦЦ) Э. Блэберном и Дж. Галлом в 1978.

Температура плавления – одна из основных характеристик данной 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; Т. п. 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.

Ti-плазмида (*Ti-plasmid, tumor inducing plasmid*) – плазмида почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, специфический Т-участок которой способен включаться в клетки двудольных растений и внед-

ряться в их ядерную ДНК, что ведет к образованию специфических опухолей (галлов); элементы Ti-п. широко используются в качестве векторов в генной инженерии растений.

Тимин, Т [thymine, Т, 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. Синтетический аналог тимина – 5-бромурацил – сильный мутаген.

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.

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.

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 рибосомы к месту синтеза белка осуществляют тРНК. Каждая тРНК при-

соединяется своим антикодоном к соответствующему кодону мРНК, определяя последовательность аминокислот в полипептидной цепи. Синтез полипептидной цепи начинается с аминоконца (N-конец) и заканчивается карбоксильным концом (C-конец). Изменение скорости трансляции мРНК регулирует экспрессию генов.

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.)

Транспортная РНК (т-РНК) – низкомолекулярная РНК (содержит 75-90 нуклеотидов), обеспечивающая перенос аминокислот к рибосомам (см.) для включения их в белки. т-РНК имеют специфическую вторичную структуру в виде “листа клевера”, антикодон расположен в антикодоновой петле, а на 5'-конце всегда находится гуанин (G). Аминокислоты присоединяются к 3'-концу последовательности ССА в тРНК в результате реакции аминоацилирования. Модель “листа клевера” для вторичной структуры тРНК предложена Р. Холли с сотр. в 1965 г.

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 интегрирует (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 введён хотя бы один активно функционирующий ген от другого организма (см. Трансформированные организмы, ГМО).

Трансформированные организмы – организмы с изменёнными наследственными свойствами в результате проникновения в них чужеродной ДНК (см. Трансгенные организмы, ГМО).

Триплет – комбинация из трех последовательно расположенных нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты (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).

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.

Уникальные (неповторяющиеся) последовательности ДНК (*non-repetitious DNA sequences*) – участки 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.

Упаковка ДНК – совокупность процессов спирализации и самоукладки двухцепочечной молекулы ДНК, ведущих к резкому сокращению ее абсолютной длины; эффективность У. оценивается по индексу упаковки.

Урацил, У [uracil, U,] – пиримидиновое основание (2,4-диоксопиримидин), 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.

Участок расщепления – см. Сайт рестрикции.

Участок узнавания – см. Сайт узнавания.

Ф

Фаги – см. Бактериофаги.

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).

Фильтр из нитроцеллюлозной плёнки – см. Нитроцеллюлозная (пленка) мембрана.

Фингерпринт ДНК (DNA fingerprint) – высокоспецифичные гибридизационные полосы на электрофореграммах (фингерпринт), образующиеся как результат полиморфизма длины рестрикционных фрагментов геномной ДНК (ПДРФ, см.). Причиной такого полиморфизма могут быть мутации в пределах сайта рестрикции (см.), повторы ДНК (мини- и микросателлиты) и др.

Фланкирующая последовательность ДНК – характеризует любую нуклеотидную последовательность, расположенную рядом («на фланге») с другой последовательностью; различают 5'- и 3'-Ф.П. ДНК, т.е. прилегающие к основной последовательности соответственно с 5'- и 3'-конца полинуклеотидной цепи.

Фосфорилирование – процесс переноса остатка фосфорной кислоты от фосфорилирующего агента-донора к субстрату, катализируемый ферментами и ведущий к образованию сложных эфиров фосфорной кислоты. В живых клетках Ф. – 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. н.п., а у млекопитающих – около 100 н.п.) 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.

Фолдинг белка (англ. folding - укладка белка) – процесс спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространственную структуру (так называемая третичная структура).

Х

X-Gal – специальный субстрат, который расщепляется ферментом β -галактозидазой (продукт гена *lac-Z*) (см.) с образованием не-

растворимого 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 – [гр. 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 – [гр. chroma – цвет] – это вещество хромосом, представляющее собой комплекс ДНК и белков. Х. находится внутри ядра клеток эукариот и входит в состав нуклеоида у прокариот. Х. окрашивается основными красителями. Термин введен в литературу Флемингом (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 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.

Цитозин, Ц [cytosine, C] – 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 – форма пространственной организации белков, обусловленная различными вариантами взаиморасположения и взаимодействия отдельных полипептидных цепей. Ч.с. имеют только белки состоящие из двух и более полипептидных цепей (субъединиц).

Чужеродная ДНК – ДНК какого-либо организма по отношению к организму-реципиенту.

Ш

Шапероны – сем. 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.

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 нитронами (см.). Э. выполняют 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).

Экспрессия гена – реализация генетической информации, закодированной в ДНК, путем ее транскрипции (см.) и трансляции (см.) иРНК.

Электрофорез в агарозном геле – Метод разделения заряженных биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот и т. д.) в электрическом поле, базирующийся на их различии по электрическому заряду, форме и размеру. Молекулы мигрируют через инертный агарозный гель под действием электрического поля. Э. открыт Ф. Ф. Рейсом в 1807 г. В биологии Э. начал использовать А. Тизелиус, сконструировавший первый прибор для электрофоретического разделения белков в 30-е гг. XX в.

Электрофоретическая камера – часть прибора для проведения электрофореза. Различают вертикальную и горизонтальную Э.к.

Элонгация (*elongation*) – удлинение нуклеотидной цепи путем добавления новых нуклеотидов (ДНК- или РНК-синтез) или аминокислотной цепи путем присоединения аминокислот.

Энхансер – специфическая цис-действующая последовательность нуклеотидов, 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 факкультативный гетерохроматин в процессе инактивации X-хромосомы.

4.3 ПЕРЕЧЕНЬ РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Сафонова, О.А. Современные иммунологические и молекулярно-генетические методы диагностики / О.А. Сафонова [и др.]. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2009. – 68 с.
2. Ершов, Ю.А. Основы молекулярной диагностики. Метаболомика / Ю.А. Ершов. - М.: Гэотар-Медиа, 2016. – 336 с.
3. Иллариошкин, С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование / С.Н. Иллариошкин. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 207 с.
4. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. - М. : Мир, 1999. – 558 с.

Дополнительная

1. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 183 с.
2. Основы биотехнологии: учебно-методический комплекс для специальности: 1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность) / сост.: Г. Г. Гончаренко, А. В. Крук; Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины. – Гомель, 2015. – 247 с.
3. Ребриков Д.В. NGS. Высокопроизводительное секвенирование / Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. – М. : Бином, 2014. – 232 с.
4. Введение в молекулярную диагностику. В 2 томах / под ред. М.А. Пальцева. – М.: Медицина, 2010. – Т. 1. – 368 с.
5. Введение в молекулярную диагностику: учебно-методическое пособие: в 2 томах / под ред. М. А. Пальцева, Д. В. Залетаева. – М.: Медицина, 2011. – Т. 2. – 504 с.
6. Patrinos, G. Molecular Diagnostics. 3rd Edition / G.P. Patrinos, W. Anson, P.B. Danielson - Academic Press, 2016. – 506 p.
7. Bruns, D.E. Fundamentals of Molecular Diagnostics / D.E. Bruns, E. R. Ashwood, C.A. Burtis. - Elsevier Health Sciences, 2007. – 298 p.
8. Nucleic Acids as Molecular Diagnostics / Ed. A. Keller, E. Meese. - Wiley, 2014. – 360 p.
9. Grody, W.W. Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory / W.W. Grody, R.M. Nakamura, F.L. Kiechle. - Academic Press, 2009. – 519 p.
10. Molecular Methods in Plant Disease Diagnostics: Principles and Protocols / Ed. N. Boonham, J. Tomlinson, R. Mumford. – CABI, 2016. – 200 p.
11. Molecular Forensics / Ed. R. Rapley, D. Whitehouse. – Wiley, 2007. – 258 p.