

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.Б.26 Молекулярная биология

Направление подготовки (специальность) 06.03.01 Биология

Профиль образовательной программы «Биоэкология»

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций.....	3
1.1 Лекция № 1 История развития и методы молекулярной биологии. Нуклеиновые кислоты, нуклеотиды	3
1.2 Лекция № 2 Структура и функции ДНК и РНК, их физико-химические свойства.....	5
1.3 Лекция № 3 Генетический код. Репликация ДНК.....	7
1.4 Лекция № 4 Репарация ДНК.....	9
1.5 Лекция № 5 Рекомбинация. Транскрипция ее этапы, принцип и механизмы..	10
1.6 Лекция № 6 Хроматин, его свойства.....	14
1.7 Лекция № 7 Процессинг у прокариот. Процессинг у эукариот. Процессинг РНК и сборка субчастиц рибосом	16
1.8 Лекция № 8 Ошибки при синтезе ДНК. Репарация ДНК. Генетическая инженерия	18
1.9 Лекция № 9 Способы выделения ДНК из биологического материала. Понятие о вирусах.....	21
 2. Методические материалы по выполнению лабораторных работ.....	 25
2.1 Лабораторная работа № ЛР-1 История развития и методы молекулярной биологии. Нуклеиновые кислоты, нуклеотиды.....	25
2.2 Лабораторная работа № ЛР-2 Структура и функции ДНК и РНК, их физико-химические свойства.....	25
2.3 Лабораторная работа № ЛР-3 Генетический код. Репликация ДНК	25
2.4 Лабораторная работа № ЛР-4 Репликация у прокариотов.....	26
2.5 Лабораторная работа № ЛР-5 Репликация у эукариотов.....	26
2.6 Лабораторная работа № ЛР-6 Репарация.....	27
2.7 Лабораторная работа № ЛР-7 Рекомбинация.	27
2.8 Лабораторная работа № ЛР-8 Транскрипция у прокариот, ее этапы, принцип и механизмы.....	28
2.9 Лабораторная работа № ЛР-9 Регуляция транскрипции.....	28
2.10 Лабораторная работа № ЛР-10 Хроматин, его свойства.....	28
2.11 Лабораторная работа № ЛР-11 Процессинг у прокариот.....	29
2.12 Лабораторная работа № ЛР-12 Процессинг у эукариот.....	29
2.13 Лабораторная работа № ЛР-13 Процессинг РНК и сборка субчастиц рибосом.....	30
2.14 Лабораторная работа № ЛР-14 Ошибки при синтезе ДНК. Репарация ДНК. Генетическая инженерия	30
2.15 Лабораторная работа № ЛР-15 Полимеразная цепная реакция, как метод генной инженерии. Хромосомные болезни.....	31
2.16 Лабораторная работа № ЛР-16 Представление об обратной транскрипции ее значение. Теории возникновения онкологических заболеваний	31
2.17 Лабораторная работа № ЛР-17 Способы выделения ДНК из биологического материала. Понятие о вирусах.....	32
2.18 Лабораторная работа № ЛР-18 Итоговое занятие.....	32

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1 Лекция №1 (2 часа)

Тема: «История развития и методы молекулярной биологии. Нуклеиновые кислоты, нуклеотиды»

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Предмет молекулярной биологии, ее связь с другими биологическими дисциплинами.
2. Краткий обзор истории молекулярной биологии, основатели молекулярной биологии.
3. Современные задачи молекулярной биологии, связь с другими науками. Прикладное значение молекулярной биологии. Методы молекулярной биологии.
4. Нуклеиновые кислоты.

1.1.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса № 1 Предмет молекулярной биологии, ее связь с другими биологическими дисциплинами. Связь молекулярной биологии с биохимией, биофизикой, генетикой, цитологией. Направления молекулярной биологии:

Молекулярная биология – наука о механизмах хранения, воспроизведения, передачи и реализации генетической информации, о структуре и функциях нуклеиновых кислот и белков. Уотсон сформулировал следующее определение: молекулярная биология – наука, изучающая биологические явления на молекулярном уровне.

Предмет, задачи молекулярной биологии. Выделение молекулярной биологии в самостоятельную науку произошло в половине XX века. Первое официальное упоминание о ней принадлежит Уиверу, однако, по мнению многих авторов, настоящим годом рождения молекулярной биологии является 1944 год, что связано с открытием Освальда Эвери явления трансформации.

Направления молекулярной биологии:

- Молекулярная генетика – исследование структурно-функциональной организации генетического аппарата клетки и механизма реализации наследственной информации.
- Молекулярная вирусология – исследование молекулярных механизмов взаимодействия вирусов с клетками.
- Молекулярная иммунология – изучение закономерности иммунных реакций организма.
- Молекулярная биология развития – исследование появления разнокачественности клеток в ходе индивидуального развития организмов и специализации клеток. Основные объекты изучения: вирусы, бактериофаги; клетки и субклеточные структуры (органоиды); макромолекулы; многоклеточные организмы.

2. Наименование вопроса № 2 Краткий обзор истории молекулярной биологии, основатели молекулярной биологии.

Молекулярная биология исторически появилась как раздел биохимии в 1953 г. Джеймс Д. Уотсон и Фрэнсис Крик. В 1928 году Фредерик Гриффит впервые показал, что экстракт убитых нагреванием болезнетворных бактерий может передавать признак патогенности неопасным бактериям. Исследование трансформации бактерий в дальнейшем привело к очистке болезнетворного агента, которым, вопреки ожиданиям, оказался не белок, а нуклеиновая кислота. Сама по себе нуклеиновая кислота не опасна, она лишь переносит гены, определяющие патогенность и другие свойства микроорганизма. В 50-х годах XX века было показано, что у бактерий существует примитивный половой процесс, они способны обмениваться внехромосомной ДНК, плазмидами. Открытие плазмид, как и трансформации, легло в основу распространенной в

молекулярной биологии плазмидной технологии. Еще одним важным для методологии открытием стало обнаружение в начале XX века вирусов бактерий, бактериофагов. Заражение бактерий фагами приводит к изменению состава бактериальной РНК. Если без фагов состав РНК сходен с составом ДНК бактерии, то после заражения РНК становится похожа на ДНК бактериофага. В свою очередь, скорость синтеза белка в клетках зависит от количества РНК-белковых комплексов. Так была сформулирована центральная догма молекулярной биологии: ДНК → РНК → белок. Дальнейшее развитие молекулярной биологии сопровождалось изобретением метода определения нуклеотидной последовательности ДНК (У. Гилберт и Ф. Сенгер, Нобелевская премия по химии 1980 г.), так и новыми открытиями в области исследований строения и функционирования генов. К началу XXI века были получены данные о первичной структуре всей ДНК человека и целого ряда других организмов, наиболее важных для медицины, сельского хозяйства и научных исследований, что привело к возникновению нескольких новых направлений в биологии: геномики, биоинформатики и др. В нашей стране фундамент для развития этого направления заложен трудами академиков В.А. Энгельгардта, А.Н. Белозерского, А.А. Баева.

3. Наименование вопроса № 3 Современные задачи молекулярной биологии, связь с другими науками. Прикладное значение молекулярной биологии. Методы молекулярной биологии.

Задачи молекулярной биологии, ее связь с биохимией, биофизикой, генетикой, цитологией. Прикладное значение молекулярной биологии. Методы молекулярной биологии.

Физические:

- Микроскопия (используется электронная сканирующая, или криоэлектронная микроскопия);
- Ядерно-магнитный резонанс (ЯМР) – безвреден для живых клеток, для исследования образца получают спектр ядерного магнитного резонанса, который представляет собой диаграмму поглощения на резонансных частотах. Такой спектр отражает структуру и относительное содержание каждого типа молекул, их химическую природу;
- Рентгеноструктурный анализ;
- Радиоактивные изотопы.
- Физико-химические:
- Центрифугирование, скорость осаждения (седиментации) определяется размером и формой разделяемых компонентов;
- Хроматография;
- Электрофорез (движение заряженных молекул в направлении, противоположном заряженному электроду);
- Гель – электрофорез.

Биологические:

—Культура клеток и тканей. В культуре клеток появляются мутанты, которые могут бесконечно долго размножаться и образовывать клеточную линию. В отличие от раковых клеток, способных к непрерывному делению, мутантные клетки лучше растут в контакте с какой-нибудь поверхностью. Наиболее известные клеточные линии: Линия Hela – клетки карциномы шейки матки человека; 3Т3 – фибробласты (мышь); L6 – миобласты (крысы). Слиянием двух клеток различных организмов (человек, мышь) могут быть получены гетерокарионы – клетки с двумя отдельными ядрами. После митоза ядра объединяются, и гибридные клетки дают возможность изучать функции отдельных хромосом, взаимодействия внутриклеточных компонентов отдельных клеток. Эти клетки можно клонировать и получать гибридную клеточную линию.

–Метод моноклональных антител - используют для выявления молекул в сложных смесях. Антитела – белки, вырабатываемые позвоночными животными для защиты от антигенов, обладают высокой специфичностью.

–Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты в биологическом материале.

4. Наименование вопроса № 4 Нуклеиновые кислоты

Структура и биосинтез нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты, их общая характеристика. Первичная структура нуклеиновой кислоты. Определение нуклеотидной последовательности ДНК и РНК. Конформация компонентов нуклеиновых кислот. Структура ДНК. Принцип комплиментарности. Гибкость двойной спирали. Физические параметры конформационных форм ДНК. Понятие о параметрах сверхспирализованной молекулы ДНК. Топоизомеразы и топоизомеры ДНК. Тонкое строение первичной структуры нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты открыты в 1868 г. учёным Иоганном Фридрихом Мишером. Важность функции нуклеиновых кислот заключается в хранении и реализации генетической информации. Различают два вида нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) - обеспечивают хранение генетической информации; рибонуклеиновые кислоты (РНК) - принимающие участие в реализации генетической информации. Хромосома прокариотической клетки – нуклеоид, представляет собой собранную в компактное образование одну длинную двуцепочечную молекулу ДНК. В эукариотических клетках много молекул ДНК, неравномерно распределённых по нескольким хромосомам в виде комплексов с многочисленными белками. Генетический материал вирусов - нуклеиновые кислоты, причем у одних - ДНК, у других - РНК. Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) - биологические полимеры, мономеры которых – нуклеотиды. Нуклеотиды - фосфорные эфиры нуклеозидов. В РНК углеводный компонент - D-рибоза, в ДНК - D-2-дезоксирибоза. В качестве гетероциклических оснований ДНК содержит два пурина: аденин (А) и гуанин (G) и два пиримидина: тимин (Т) и цитозин (С). В РНК вместо тимина содержится урацил (U). Мономерные остатки в нуклеиновых кислотах между собой связаны фосфодиэфирными связями. В обеих кислотах эта связь осуществляется только за счёт 3'-ОН одного нуклеотидного остатка и 5'-ОН другого. Такую межнауклеотидную связь называют 3', 5'- фосфодиэфирной. Фосфодиэфирные связи ориентированы вдоль цепей обеих кислот одинаково, что придает им определенную полярность, или направление. Благодаря полярности, каждая полинуклеотидная цепь имеет 5' конец и 3'-конец, что говорит об антипараллельности цепи ДНК. На 5'- конце полинуклеотидной цепи 5-ОН группа дезоксирибозы не связана с другим нуклеотидом, на другом конце цепи 3-ОН группа тоже не связана с другим нуклеотидом. Правило антипараллельности означает, что две цепи в молекуле ДНК имеют противоположную направленность. За направление цепи по соглашению принято направление 5' → 3'. Из-за наличия 2'-ОН группы у рибозы, межнауклеотидные связи в РНК значительно мобильнее, чем в ДНК; они легко гидролизуются в присутствии щелочи. После окончания цикла синтеза ДНК некоторые пуриновые и пиримидиновые основания могут подвергаться химической модификации. Подходы к определению первичной структуры ДНК: в основе первого лежат химические реакции, в которых используются фрагменты очищенной ДНК; в основе второго - использование ДНК - копии очищенных сегментов, полученных ферментативным путем. Все гетероциклические основания, входящие в состав нуклеиновых кислот плоской конформации. Однако для остатков рибозы и дезоксирибозы плоская конформация энергетически невыгодна. Среди многочисленных теоретически возможных конформации этих остатков в полинуклеотидах реализуются только две: С2'-эндоконформация; С3'-эндоконформация. Син- и анти-конформациями.

1.2 Лекция №2 (2 часа).

Тема: «Структура и функции ДНК и РНК, их физико-химические свойства»

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Особенности тонкого строения ДНК и РНК.
2. Физико-химические свойства нуклеиновых кислот.
3. Метод молекулярной гибридизации.

1.2.2 Краткое содержание вопросов

1. Вопрос №1 Особенности тонкого строения ДНК и РНК.

Принцип комплиментарности. Гибкость двойной спирали. Физические параметры конформационных форм ДНК. Понятие о параметрах сверхспирализованной молекулы ДНК. Топоизомеразы и топоизомеры ДНК. Общая характеристика ДНК Структура ДНК. Макромолекулярная структура ДНК. Дж. Уотсон и Ф. Крик, предложившие трехмерную модель структуры ДНК, основывались на следующие данные:

1. ДНК – полимер, состоящий из нуклеотидов, соединенных 3' – 5'-фосфодиэфирными связями.

2. Состав нуклеотидов ДНК подчиняется правилам Чаргаффа. 3. Структура ДНК спиральная, состоит более чем из одной полинуклеотидной цепи.

4. Структура ДНК скреплена водородными связями.

Согласно их модели, молекула ДНК имеет вид правильной, правозакрученной спирали, образованной двумя полинуклеотидными цепями, закрученными относительно друг друга и вокруг общей оси. Две полинуклеотидные цепи, расположенные по периферии молекулы, имеют антипараллельную ориентацию, т.е., при движении вдоль оси спирали от одного ее конца к другому в одной цепи, фосфодиэфирные связи имеют направление 3' - 5', а в другой - 5' - 3', на каждом из концов линейной молекулы ДНК расположены 5'-конец одной цепи и 3'-конец другой цепи. Гидрофильные пентозофосфатные остовы цепей расположены на внешней стороне двойной спирали, гидрофобные пуриновые и пиримидиновые основания обеих цепей уложены стопкой с интервалом 0,34 нм и направлены внутрь спирали; плоскости колец гетероциклических оснований перпендикулярны главной оси спирали. Биспиральные структуры в молекулах ДНК могут возникать в пределах одной полидезоксирибонуклеотидной цепи. Для этого в последовательности ДНК должны присутствовать инвертированные, или «палиндромные», повторяющиеся последовательности длиной от нескольких до многих тысяч пар оснований. Разнообразие форм ДНК. ДНК может находиться в линейной или кольцевой форме.

Структура и функции РНК. Макромолекулярная структура РНК. Виды РНК. Разнообразие форм ДНК. Рибонуклейновые кислоты (РНК) - одна из трех основных макромолекул содержащихся в клетках живых организмов. РНК - длинная цепь звеньев – нуклеотидов, каждый из которых состоит из азотистого основания, сахара рибозы и фосфатной группы. Их последовательность позволяет РНК кодировать генетическую информацию. Химический состав, модификации мономеров. Нуклеотиды РНК состоят из сахара - рибозы, к которой в положении 1' присоединено одно из оснований: аденин, гуанин, цитозин или урацил. Фосфатная группа соединяет рибозы в цепочку, образуя связи с 3' атомом углерода одной рибозы и в 5' положении другой. Фосфатные группы при физиологическом pH отрицательно заряжены, поэтому РНК - полианион. РНК транскрибируется как полимер четырех оснований (аденина (А), гуанина (G), урацила (U) и цитозина (C)), но в «зрелой» РНК есть много модифицированных оснований и сахаров. Азотистые основания в составе РНК могут образовывать водородные связи между цитозином и гуанином, аденином и урацилом, а также между гуанином и урацилом.

Отличия ДНК от РНК:

- ДНК содержит сахар дезоксирибозу, РНК - рибозу,
- Нуклеотид, комплементарный аденину, в РНК не тимин, как в ДНК, а урацил.

-ДНК существует в форме двойной спирали, состоящей из двух отдельных молекул. Молекулы РНК одноцепочечные.

Виды РНК: рибосомная (рРНК); транспортная (тРНК); информационная; другие виды РНК (мяРНК, мцРНК) и их функции. Другие виды РНК. Гетерогенная ядерная РНК. Малые ядерные РНК (мяРНК). Малые цитоплазматические РНК (мцРНК).

2 Вопрос №2 Физико-химические свойства нуклеиновых кислот.

Физико-химические свойства нуклеиновых кислот определяются высокой молекулярной массой и особенностями структурной организации. Для них характерны следующие свойства:

- Коллоидные и осмотические свойства;
- Высокая вязкость и плотность растворов;
- Оптические свойства
- Денатурация;
- Амфотерность.

3 Вопрос №3 Метод молекулярной гибридизации.

Образование комплексов между цепями нуклеиновых кислот в результате взаимодействия комплементарных нуклеотидов. Метод используется для идентификации микроорганизмов. Этапы анализа рекомбинантной ДНК основаны на комплементарности взаимодействия цепей нуклеиновых кислот - необходимом условии синтеза ДНК и РНК. Путем нагревания или обработки щелочью двухцепочечную ДНК разделяют на отдельные цепи (денатурированная ДНК). Денатурированную ДНК инкубируют в условиях, обеспечивающих гибридизацию нуклеиновых кислот, то есть повторное образование двухцепочечных молекул путем спаривания нуклеотидов комплементарных цепей. Метод позволяет различить полностью и частично гомологичные последовательности. Использование радиоактивной метки или нерадиоактивные методы. Применяется гибридизация нуклеиновых кислот с аллель-специфическими зондами, который представляет собой синтетический одноцепочечный олигонуклеотид, длиной 15-20 нуклеотидов. Гибридизация - связывание комплементарных цепей нуклеиновых кислот.

1.3 Лекция № 3 (2 часа)

Тема: «Генетический код. Репликация ДНК»

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Генетический код, его свойства.
2. Воспроизведения ДНК.
3. Репликация. Ее особенности у про- и эукариот.
4. Ошибки репликации.

1.3.2 Краткое содержание вопросов

1. Вопрос №1 Генетический код, его свойства.

Генетический код – это система записи наследственной информации в молекулах нуклеиновых кислот, основанная на определенном чередовании последовательностей нуклеотидов в ДНК или РНК, образующих кодоны, соответствующие аминокислотам в белке.

Генетический код имеет несколько свойств:

- Триплетность.
- Врожденность или избыточность.
- Однозначность.
- Полярность.
- Неперекрываемость.

- Компактность.
- Универсальность.

Код, состоящий из трех оснований, обеспечивает включение всех 20 аминокислот в состав белка, каждой аминокислоте должно соответствовать три последовательных основания ДНК. Зависимость между основаниями и аминокислотами известна под названием генетического кода.

Основные особенности генетического кода:

- Аминокислота кодируется триплетом оснований в полинуклеотидной цепи ДНК.
- Код является универсальным. У всех живых организмов одни и те же триплеты кодируют одни и те же аминокислоты
- Аминокислота может кодироваться более чем одним триплетом
- Код неперекрывающийся, то есть каждое основание может принадлежать только одному триплету. Гены эукариот содержат как кодирующие участки, которые несут информацию для синтеза специфического белка (они были названы экзонами), так и не кодирующие (названные интронами). При триплетном коде на каждую аминокислоту должно приходиться по тринуклеотида. Благодаря существованию интронов, гены эукариот могут нести информацию для кодирования не только одного специфического белка, как у прокариот, но, в зависимости от специфики ткани, в которой они функционируют, результатом их деятельности может быть синтез разных белков.

2. Вопрос №2 Воспроизведения ДНК.

Процесс воспроизведения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). При этом из одной молекулы ДНК в результате её удвоения образуются две молекулы – точные копии исходной ДНК. Репликации – сохранение и точная передача генетической информации в ряду поколений клеток и организмов, а также при воспроизведении ДНК-содержащих структур (митохондрий, пластид, некоторых вирусов). Перед началом синтеза специальный фермент расплетает цепи двойной спирали ДНК, они расходятся, и на каждой цепи другой фермент находит точку начала синтеза. Затем на матрицах, происходит синтез новых цепей, по принципу комплементарности азотистых оснований. Расплетание цепей родительской ДНК и репликация идут параллельно. После завершения синтеза каждая новая молекула ДНК состоит из одной старой, родительской, цепи и одной новой - полуконсервативный способ. Способы репликации.

3. Вопрос №3 Репликация. Ее особенности у про- и эукариот.

Точность воспроизведения ДНК. Вилка репликации, события на отстающей нити. Ферменты в репликационной вилке. Регуляция инициации репликации у *E.coli*. Точка начала репликации. Репликоны у эукариот. Ошибки репликации. Хромосомные болезни. Первичный отбор нуклеотидов идет по принципу комплементарности. Способностью к этому виду отбора обладают все ДНК-полимеразы благодаря полимеризационной 5'3' активности. Редактирующий отбор. Его проводят все полимеразы благодаря экзонуклеазной активности 3'5'. Исправление ошибок в уже синтезированной ДНК. Этим занимаются ферменты репарации. Репликативный комплекс белков - реплисома - изучен достаточно хорошо у *E. coli*. Основные компоненты системы репликации в филогенезе функционально консервативны, и любой белковый компонент системы прокариот имеет свой прототип в системе репликации ДНК млекопитающих. Общей чертой является функционирование в репликативной вилке ДНК-топоизомераз, хеликаз, белков, связывающих и стабилизирующих односпиральную ДНК, высокополимерных ДНК-полимераз, праймаз, 3'-5'-экзонуклеаз, лигаз. У белков разных организмов, выполняющих одинаковые функции в репликации, в большинстве случаев отсутствует гомология в аминокислотных последовательностях. Так, не обнаружено сходства у белка SSB *E. coli* и белка RPA репликативной системы человека, То же самое характерно и для р-субъединицы ДНК-полимеразы III *E. coli* и белка PCNA человека. Это указывает на

возможность выполнения одних и тех же функций полипептидными цепями с разными аминокислотными последовательностями, также на вероятное конвергентное эволюционное происхождение таких белков и их функций из разных неродственных белков-предшественников. Репликация ДНК у прокариот и эукариот существенно различается. Для высших организмов характерна: более сложная организация инициации репликации; строгий временной порядок включения репликонов; временная согласованность последующих актов лигирования ДНК по фланкирующим репликоны концам; сложная связь реплисом с матриксом ядра и, наконец, своеобразный механизм репликации теломерных участков эукариотических хромосом.

4. Вопрос №4 Ошибки репликации.

Ошибка репликации - нарушением в структуре гена, или мутация. Мутация копируется в дочерние клетки, и все потомство станет получать копии ДНК с мутированным геном. Воздействие ошибки на ген. Коррекция ошибок.

1.4. Лекция №4 (2 часа)

Тема: «Репарация ДНК»

1.4.1. Вопросы лекции:

1. Прямая репарация тиминовых димеров и метилированного гуанина.
2. Эксцизионная репарация.
3. Механизм преимущественной репарации транскрибируемых генов.
4. Механизм репарации неспаренных нуклеотидов. SOS-репарация.

1.4.2 Краткое содержание вопросов

1. Вопрос №1 Виды репарации.

Прямая репарация тиминовых димеров и метилированного гуанина. Эксцизионная репарация. Прямая репарация наиболее простой путь устранения повреждений в ДНК, в котором обычно задействованы специфические ферменты, способные быстро устранять соответствующее повреждение, восстанавливая исходную структуру нуклеотидов. Так действует, например, Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза, которая снимает метильную группу с азотистого основания на один из собственных остатков цистеина.

2. Вопрос №2 Эксцизионная репарация.

Эксцизионная репарация включает удаление повреждённых азотистых оснований из ДНК и последующее восстановление нормальной структуры молекулы. Тип репарации, имеющей место в тех случаях, когда процесс эксцизионной репарации недостаточен для полного исправления повреждения: после репликации с образованием ДНК, содержащей поврежденные участки, образуются одноцепочечные бреши, заполняемые в процессе гомологичной рекомбинации при помощи белка RecA. Пострепликативная репарация была открыта в клетках *E.Coli*, не способных выщеплять тиминовые димеры. Это единственный тип репарации, не имеющий этапа узнавания повреждения.

3. Вопрос №3 Механизм преимущественной репарации транскрибируемых генов.

Механизм репарации неспаренных нуклеотидов. SOS-репарация. Гены задействованные в SOS-репарации.

Важным механизмом удаления повреждений в ДНК является эксцизионная репарация. Специфическая нуклеаза удаляет небольшой сегмент ДНК, включающий поврежденный участок. Удаленный участок восстанавливается ДНК-полимеразой, использующей в качестве матрицы комплементарную цепь. Наконец, оставшийся одноцепочечный разрыв закрывается ДНК-лигазой. Тиминовые димеры могут быть удалены фотореактивацией. Специфическая фотолиаза связывается с дефектным участком

ДНК и после облучения расщепляет димер с образованием отдельных нуклеиновых оснований. Третий механизм - это репарация в результате рекомбинации. В этом процессе участок, содержащий повреждение, пропускается во время репликации. Образующаяся брешь закрывается путем сдвига соответствующего сегмента из правильно реплицированной второй цепи. Новая брешь ликвидируется с участием полимераз и ДНК-лигаз. В завершение первоначальный дефект устраняется путем вырезания. Два типа нарушений структуры ДНК приводят к мутациям. Это, во-первых, включение нормальных нуклеотидов в аномальное окружение из последовательностей нуклеотидов, приводящих к образованию неправильно спаренных оснований и петель разных размеров. Во-вторых, появление повреждений ДНК в виде аномальных нуклеотидов в правильных последовательностях ДНК. В этом случае речь идет о различных химических модификациях нуклеотидов, включая их разрушение и образование поперечных сшивок. Повреждения ДНК могут приводить к задержке и блокированию репликации и транскрипции. Среди первичных повреждений наиболее часто встречаются биспиримидиновые фотопродукты: пиримидиновые димеры циклобутанового типа, соединенные связью 6-4. Как про-, так и эукариоты имеют несколько ферментных систем, которые разделяют пиримидиновые димеры или восстанавливают исходную структуру азотистых оснований. К таким репаративным системам относится, прежде всего, система эксцизионной репарации осуществляющая вырезание поврежденных нуклеотидов или азотистых оснований. Система ферментативной фотореактивации ДНК, основным компонентом которой является ДНК-фотолиаза, разделяет пиримидиновые димеры, превращая их в нормальные пиримидиновые основания. Кроме того, поврежденные УФ-светом молекулы ДНК могут репарироваться с участием систем рекомбинации и в процессе пострепликативного синтеза ДНК. Действие систем репарации поврежденной ДНК распространяется не только на фотопродукты, но и на другие модифицированные основания, образующиеся под действием химических мутагенов. Система, распознающая неправильно спаренные основания в двойной спирали ДНК, возникающие в результате ошибок репликации.

4. Вопрос №4 Механизм репарации неспаренных нуклеотидов. SOS-репарация.

Апуринизация. Репарация ошибок репликации ДНК. Рекомбинация (пострепликативная) репарация. Особое место среди клеточных репарирующих систем занимает "ошибочная" репарация. У бактерии *E.coli* ферменты этой системы синтезируются только в ответ на действие на клетку ДНК-повреждающих агентов, напр. УФ излучения. Поэтому эту систему репарации называют иногда SOS-системой. Основная задача такой системы - модифицировать ДНК-полимеразу и поврежденный участок ДНК таким образом, чтобы не блокировалось действие ДНК-полимеразы. У *E.coli* это достигается в результате совместного действия на ДНК и комплекс ДНК-ДНК-полимеразы в области дефекта фермента RecA и UmuCD. Система SOS-репарации играет важную роль, т. к. благодаря ей появляется возможность сохранить генетическую информацию при попадании организмов в условия, при которых значительно повышается частота мутаций. Системы репарации являются основными факторами, определяющими нормальное функционирование клеточной ДНК и генетической стабильность клетки. Известен в настоящее время ряд наследственных заболеваний человека, связанных с нарушением репарации - пигментная ксеродерма, атаксия-телеангиэктазия и прогерия.

1.5. Лекция №5 (2 часа)

Тема: «Рекомбинация. Транскрипция ее этапы, принцип и механизмы»

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Понятие об общей (гомологичной) и сайтспецифической рекомбинации, их отличия.

2. Роль рекомбинации в пострепликативной репарации.
3. Рекомбинация у высших эукариот. Сайтспецифическая рекомбинация, типы хромосомных перестроек, осуществляемых при данной рекомбинации.
4. Особенности структуры РНК-полимеразы. Стадии транскрипционного цикла.
5. Репликация и транскрипция. Сверхспирализация и транскрипция.
6. Терминация и транскрипция. Регуляция транскрипции в развитии фага λ .

1.5.2. Краткое содержание вопросов

1. Вопрос №1 Понятие об общей (гомологичной) и сайтспецифической рекомбинации, их отличия.

Понятие об общей (гомологичной) и сайтспецифической рекомбинации. Различия молекулярных механизмов общей и сайтспецифической рекомбинации. Роль рекомбинации в пострепликативной репарации. RecBCD комплекс. RecA белок. Под генетической рекомбинацией понимают процессы, приводящие к перераспределению нуклеотидных последовательностей в геномах. Эти процессы лежат в основе генетической изменчивости, позволяющей организмам приспосабливаться к окружающей среде и обеспечивать длительное существование видов. На возможность генетической рекомбинации как обмена участками гомологичных хромосом впервые указал в 1903г. Т. Бовери. В ходе общей рекомбинации обмен генетическим материалом происходит между гомологичными нуклеотидными последовательностями ДНК, чаще всего между двумя копиями одной и той же хромосомы. В процессе рекомбинации у *E. coli* принимают участие несколько белков, обеспечивающих поиск и рекомбинацию гомологичных последовательностей ДНК. Так, белок RecBCD присоединяется к двойной спирали ДНК и движется вдоль молекулы, осуществляя ее расплетание в поиске сайта рекомбинации. Этот белок действует как хеликаза. Затем белок RecBCD, действуя как нуклеаза, осуществляет разрыв в одной из цепей ДНК, в результате чего высвобождается небольшой одноцепочечный участок ДНК, который может провзаимодействовать с комплементарным участком другой молекулы ДНК. Для обеспечения комплементарного взаимодействия высвободившийся участок одной из цепей ДНК, называемый «ус», поддерживается в вытянутом состоянии с помощью SSB-белка. Этот белок участвует как в репликации бактериальных ДНК, так и в их рекомбинации. В точке рекомбинации возникает гетеродуплексное соединение молекул ДНК, которое может включать взаимодействие нескольких тысяч пар оснований. Затем происходит разрыв в другой цепи ДНК, создающий предпосылки для рекомбинации с перекрещиванием цепей. При этом возникает характерная крестообразная структура. Разрыв и сшивание которой завершает общую рекомбинацию в отсутствие кроссинговера. При кроссинговере в крестообразной структуре могут происходить вращения составляющих ее элементов относительно друг друга. Эти вращения, сопровождающиеся изомеризацией цепей, создают условия для крупномасштабного обмена участками между молекулами ДНК. Таким образом, у эукариот в результате генетической рекомбинации с кроссинговером осуществляется перемещение из хромосомы в хромосому больших гомологичных последовательностей, однако общая последовательность расположения генов в хромосоме не нарушается. Совершенно иные последствия может вызвать сайт-специфическая рекомбинация.

2. Вопрос №2 Роль рекомбинации в пострепликативной репарации.

Различия молекулярных механизмов общей и сайтспецифической рекомбинации. Роль рекомбинации в пострепликативной репарации. Модели рекомбинации. Сайт-специфическая рекомбинация не требует гомологии ДНК. В этом случае в обмен вступают короткие специфические нуклеотидные последовательности ДНК. При этом изменяется распределение нуклеотидных последовательностей в геноме. Существует особый фермент рекомбинации, который «узнает» специфические последовательности в одной или двух рекомбинирующих молекулах ДНК, а комплементарного спаривания протяженных участков

не происходит. Генетическая рекомбинация включает в себя возможность рекомбинации РНК-геномов, свойственных многим вирусам. Механизмы рекомбинации РНК еще не достаточно изучены. У ряда вирусов, например вирусов гриппа, рекомбинация осуществляется как обмен целыми молекулами РНК, что обеспечивает высокую изменчивость вирусов и соответственно затрудняет борьбу с ними. РНК-содержащие бактериофаги также способны к рекомбинации, приводящей к образованию новых молекул РНК, причем партнерами и такой рекомбинации могут выступать природные, и полученные искусственным путем (синтетические) молекулы РНК, что используется при синтезе антисмысловых РНК и рибозимов с целью создания специфических препаратов для борьбы с вирусными инфекциями.

3. Вопрос №3 Рекомбинация у высших эукариот. Сайтспецифическая рекомбинация, типы хромосомных перестроек, осуществляемых при данной рекомбинации. Сайтспецифическая рекомбинация. Типы хромосомных перестроек, осуществляемых при сайтспецифической рекомбинации. Сайтспецифическая рекомбинация не требует гомологии ДНК. В этом случае в обмен вступают короткие специфические нуклеотидные последовательности ДНК. Изменяется распределение нуклеотидных последовательностей в геноме. Существует особый фермент рекомбинации, который «узнает» специфические последовательности в одной или двух рекомбинирующих молекулах ДНК, а комплементарного спаривания протяженных участков не происходит. Первая исследованная система такой рекомбинации - включение бактериофага альфа, в ДНК *E. coli*. Фермент, осуществляющим этот процесс, называют лямбда-интегразой. Данный фермент связывает между собой ДНК бактериофага и определенный участок ДНК бактерии, разрывая цепи обеих молекул, а после взаимодействия фаговой и бактериальной ДНК сшивает их. ДНК фага оказывается интегрированной в геном клетки-хозяина. Интеграза кодируется геномом бактериофага. Лямбда-интеграза действует аналогично ДНК топоизомеразе бактерий, вносит обратимые разрывы в цепи ДНК в процессе репликации. Сайт-специфическая рекомбинация лежит в основе перемещения генов в пределах одной молекулы ДНК и объясняет, таким образом, феномен «прыгающих» генов, свойственных как про- и эукариотам. Рекомбинация может затрагивать как кодирующие, так и регуляторные последовательности геномов, может выступать как один из способов регуляции экспрессии генов. Данные перестройки наблюдаются в повторяющихся последовательностях геномов многих организмов и носят название обращенных повторов. Перестройки в геномах могут носить запрограммированный характер на определенных стадиях дифференцировки клеток, что выявлено, в частности, при дифференцировке гетероцист у цианобактерий. Запрограммированные перестройки - формирование генов иммуноглобулинов в клетках-предшественниках В-лимфоцитов позвоночных животных. Сборка этих генов осуществляется путем рекомбинации и совмещения разобщенных фрагментов, затем происходят транскрипция и биосинтез разнообразных молекул иммуноглобулинов в В-лимфоцитах. Во всех других соматических клетках животных фрагменты генов иммуноглобулинов остаются разобщенными и биосинтез иммуноглобулинов не происходит. Генетическая рекомбинация включает в себя возможность рекомбинации РНК-геномов, свойственных многим вирусам. У вирусов гриппа, рекомбинация осуществляется как обмен целыми молекулами РНК, что обеспечивает высокую изменчивость вирусов и соответственно затрудняет борьбу с ними. РНК-содержащие бактериофаги также способны к рекомбинации, приводящей к образованию новых молекул РНК, партнерами и такой рекомбинации могут выступать природные и полученные искусственным путем молекулы РНК. Перспективы имеют исследования в области получения рекомбинантных РНК и для разработки систем внеклеточного синтеза белков.

4. Вопрос №4 Особенности структуры РНК-полимеразы. Стадии транскрипционного цикла.

Транскрипцией называют биосинтез РНК на матрице ДНК. Это первая стадия реализации генетической информации, в процессе которой определенные участки нуклеотидной последовательности ДНК «переписываются» в комплементарные одноцепочечные молекулы РНК. В результате транскрипции образуются мРНК, копирующие аминокислотные последовательности белков, а также тРНК, рРНК и другие виды РНК, выполняющие структурные, регуляторные и каталитические функции. В основе транскрипции лежит фундаментальный принцип комплементарности азотистых оснований полинуклеотидных цепей ДНК и РНК. Процесс осуществляется с участием ферментов - РНК-полимераз, и большой группы белков - регуляторов транскрипции. Синтез РНК на матрице ДНК ведут РНК-полимеразы (ДНК-зависимые). РНК-полимеразы в отличие от ДНК-полимераз не нуждаются в праймере и используют рибонуклеозид-5'-трифосфаты. У эукариот разные виды РНК синтезируются различными РНК-полимеразами, у бактерий один фермент синтезирует все виды РНК. У всех организмов процессу транскрипции подвергается одновременно определенные ее участки - транскриптоны молекулы ДНК. Транскриптоны бактерий называют оперонами. Опероны включают в себя нуклеотидные последовательности, кодирующие структуру нескольких белков называемые цистронами, или структурными генами. Белки-регуляторы транскрипции.

Транскрипция у прокариот. Бактериальные РНК-полимеразы - сложные белки, состоящие из нескольких субъединиц. Фермент *E. coli* содержит пять постоянно присутствующих протомеров: две субъединицы α и по одной β , β' и ω . После присоединения к кору еще одной субъединицы - ω фактора - образуется холофермент РНК-полимеразы, она способна узнавать промоторную область в оперонах бактерий и инициировать процесс транскрипции. Узнавание промоторов происходит только после присоединения к кор-ферменту σ -фактора. После инициации синтеза РНК σ -субъединица отделяется от холофермента и дальнейшая транскрипция осуществляется кор-ферментом.

Для синтеза РНК необходимо расплетание двуцепочечной молекулы ДНК, чтобы РНК-полимераза получила доступ к азотистым основаниям матрицы. РНК-полимераза расплетает двуцепочечную молекулу ДНК с помощью особого ДНК-раскручивающего сайта, взаимодействуя с матрицей с помощью «цинковых пальцев». РНК-полимераза непрерывно раскручивает спираль впереди того участка, где происходит синтез РНК здесь на короткое время образуется открытый комплекс. Затем фермент вновь закручивает ДНК уже позади участка полимеризации РНК, и готовая часть РНК-транскрипта выводится из комплекса через особый канал, свойственный РНК-полимеразе.

5. Вопрос №5 Репликация и транскрипция. Сверхспирализация и транскрипция.

Репликативный комплекс белков - реплисома - изучен у *E. coli*. Черты ее строения и функционирования у про- и эукариот общие. Инициация репликации и прерывистый синтез ДНК на отстающей цепи осуществляются по РНК-праймерному механизму и являются универсальным свойством репликации ДНК у про- и эукариот. Основной белковый компонент системы прокариот имеет свой прототип в системе репликации ДНК млекопитающих. Общей чертой является функционирование в репликативной вилке ДНК-топоизомераз, хеликаз, белков, высокополимерных ДНК-полимераз, праймаз, 3'-5'-экзонуклеаз, лигаз. У белков разных организмов, выполняющих одинаковые функции в репликации, отсутствует гомология в аминокислотных последовательностях. Так, не обнаружено сходства у белка SSB *E. coli* и белка RPA репликативной системы человека, Это указывает на возможность выполнения одних и тех же функций полипептидными цепями с разными аминокислотными последовательностями, и на вероятное конвергентное эволюционное происхождение таких белков и их функций из разных неродственных белков-предшественников. Репликация ДНК у прокариот и эукариот различается. Для высших организмов характерны: более сложная организация инициации репликации:

- множественность репликонов у эукариот и одnoreпликонная организация у бактерий,
- строгий временной порядок включения репликонов,
- временная согласованность последующих актов лигирования ДНК по фланкирующим репликоны концам,
- сложная связь реплисом с матриксом ядра,
- своеобразный механизм репликации теломерных участков эукариотических хромосом.

6. Вопрос №6 Терминация и транскрипция. Регуляция транскрипции в развитии фага λ .

Терминация транскрипции определяется особой нуклеотидной последовательностью в ДНК, расположенной в зоне терминатора бактериальных оперонов и называемой стоп-сигналом. В стоп-сигнале имеется GC-богатый участок, обладающий центральной симметрией и представляющий собой самокомплементарную нуклеотидную последовательность. Регуляции транскрипции имеет важное значение для понимания механизмов дифференциальной активности {экспрессии} генов в онтогенезе любого про- или эукариотического организма. Регуляция транскрипции у бактериофага λ . Существует два способа существования Фага λ , в зараженной клетке: пассивным или активным. Молекулярной основой Переключения способов существования фага λ являются события, происходят в аппарате транскрипции. Регуляция транскрипции осуществляется двумя белками: Cro-белком и λ –репрессором.

1.6. Лекция №6 (2 часа)

Тема: «Хроматин, его свойства»

1.6.1 Вопросы лекции:

1. Хроматин. Его свойства
2. Виды хроматина;
3. Уровни компактизации хроматина;

1.6.2. Краткое содержание вопросов

1. Вопрос №1 Хроматин. Его свойства

Хромосомы основные структурные и функциональные компоненты ядра. Химическая организация: ДНК, строение молекулы и свойства; РНК, строение молекулы, свойства, содержание в хромосомах. Белки хромосом: гистоны и негистоновые белки, их количество, структурная роль. В интерфазном ядре хроматин располагается отдельными сгустками на периферии ядра или внутри ядра в виде переплетающихся нитей. В состав хроматина входят сложные комплексы дезоксирибонуклеидов, ДНК, РНК и специальные хромосомные белки – гистоны. Общее количество ДНК в ядерных структурах. В геноме прокариотов, отсутствует последовательность оснований, все участки их ДНК несут последовательности генетических объектов. У эукариотов в состав их ДНК входят две подфракции:

-фракция с высоко или часто повторяющейся последовательностью, здесь сходные участки могут быть повторены 10^6 .

-фракция с умеренно повторяющейся последовательностью, встречается в геноме 10^3 .

Фракции с часто повторяющимися последовательностями обладают большой плотностью, чем основная масса ДНК - сателлитная ДНК, эта фракция не участвует в синтезе РНК и белка в клетке, то есть участвует в транскрипции. Сателлитная ДНК участвует в распознавании гомологичного района хромосом при мейозе. К белкам хроматина, относя гистоны и негистоновые белки. Гистоны - основные белки, составляют основные аминокислоты (лизин и аргинин), эти белки не содержат триптофана. Негистоновые белки: ферменты, связанные с хроматином; другие белки; специфические белки регуляторы, узнающие нуклеотидные последовательности в ДНК. В составе

хроматина могут находиться липиды. Структуры хроматина – фибриллы хромосом. Ступени структурной укладки молекул ДНК. Фибриллярные элементы ядра.

2. Вопрос №2 Виды хроматина.

Хроматин интерфазного ядра представляет собой ДНК (хромосомы). В этот период хромосомы теряют компактную форму, разрыхляются, деконденсируются. В зависимости от степени деконденсации хромосом в ядрах его называют диффузным хроматином, гетерохроматином. Хромосомы клеток находятся в двух структурно-функциональных состояниях. Гетерохроматин и эухроматин. При переходе от интерфазы к митозу хромосомы - гетерохроматические. Участки хромосом, которые в интерфазе деконденсируются - эухроматическими или эухроматин. Гетерохроматические участки располагаются в теломерных, центромерных околядрышковых районах хромосом и оказывают сильное влияние на функцию соседних с ними эухроматических участков. Факультативный гетерохроматин - участок хроматина, который временно переходит в конденсированное состояние. При этом на этих участках хроматина может прекратиться синтез РНК. Но такое состояние ядра временное и при восстановлении функциональной активности ядра хроматин разрыхляется и переходит в эухроматическое состояние. Структурный хроматин такими переходами не обладает. Зоны структурного гетерохроматина в ядрах не активны в синтезе РНК и их репликация происходит в конце периода синтеза ядерной ДНК. Гетерохроматин содержит большую долю ДНК с повторяющимися последовательностями, а также сателлитную ДНК, эти фракции ДНК не участвуют в транскрипции РНК и вообще не активны. Место локализации структурного гетерохроматина. Функциональное значение структурного гетерохроматина. Строение хромосом. Хромонема ее спиральная укладка в хромосоме. Матрикс хромосом и его функция. Репродукция хромосом. Синтез ДНК в интерфазе. Механизм редупликации молекулы ДНК. Функциональная активность интерфазных и митотических хромосом. Метacentрические, субметacentрические, акроцентрические хромосомы. Хромонема ее спиральная укладка в хромосоме. Матрикс хромосом и его функция. Репродукция хромосом. Синтез ДНК в интерфазе. Механизм редупликации молекулы ДНК. Функциональная активность интерфазных и митотических хромосом. Ультраструктура митотических хромосом. Элементарные фибриллы или нити ДНП входят в структуру митотических хромосом как основная часть. В состав хромосом входят элементарные фибриллы. Хромосомы имеют вид тел состоящих из перепутанных изгибающихся нитей-фибрилл. Плотное их расположение и образует хромосому ее тело, на срезах тело хромосомы представлено равномерно заполненными сечениями элементарных хромосомных фибрилл - хромонемы. Процесс конденсации хромосомного материала.

Процесс образования митотической хромосомы:

- конденсация элементарных хромосомных фибрилл, приводящих к образованию структуры в виде хромонемы.

- взаимная конденсация и уплотнение отдельных хромонем или участков хромонемы в виде конечной структуры – митотической хромосомы.

Фибрилла ДНП – хромонема – хромосома.

Общая архитектура митотических хромосом. Матрикс митотических хромосом. Морфология митотических хромосом. У большинства хромосом зона первичной перетяжки (центромеры), делит хромосому на два плеча. Хромосомы с равными или почти равными плечами называют метacentрическими, с плечами неодинаковой длины - субметacentрическими. Палочковидные хромосомы с очень коротким, почти незаметным вторым плечом называют акроцентрическими. В области первичной перетяжки расположен кинетохор. Вторичные перетяжки, располагающиеся вблизи одного из концов хромосомы и отделяющие маленький участок — спутник хромосомы называют ядрышковыми организаторами. В этих местах локализована ДНК, ответственная за синтез рибосомных РНК. Плечи хромосом оканчиваются теломерами - конечными участками.

Теломерные участки хромосом. Размеры хромосом. Совокупность числа, размеров и особенностей строения хромосом называется кариотипом данного вида. Общая архитектура митотических хромосом. Тело хромосомы построено за счет спиральной укладки хромонемной нити или нескольких нитей. На поперечных сечениях митотических хромосом особенно в телофазе видно, что в центре хромосомы располагается зона свободная от хроматиновых элементов. Хроматин располагается в периферической зоне хромосомы в виде кольца. Хромосома имеет вид полого цилиндра, стенки которого построены из хроматина.

3. Вопрос №3 Уровни компактизации хроматина.

Общая архитектура митотических хромосом. Тело хромосомы построено за счет спиральной укладки хромонемной нити или нескольких нитей. На поперечных сечениях митотических хромосом особенно в телофазе видно, что в центре хромосомы располагается зона свободная от хроматиновых элементов. Хроматин располагается в периферической зоне хромосомы в виде кольца. Хромосома имеет вид полого цилиндра, стенки которого построены из хроматина. Матрикс митотических хромосом. Возле хроматинового материала располагается компонент нехроматиновой природы, он называется матриксом митотической хромосомы, и он как бы обволакивает хромосому. В состав матрикса входит РНК. Эта зона обнаруживается при деконденсации хромосом и содержит большое количество тонких фибрилл и рибосомальных гранул. Компоненты матрикса синтезируются в интерфазе предыдущего клеточного цикла. Поэтому хромосомы участвуют не только в переносе генетического материала в виде ДНК, но и принимают участие в переносе продуктов их активности в виде рибонуклеиновых компонентов матрикса. Матрикс выявляется в хромосомах после исчезновения ядрышка в профазе. Ядрышко, как и матрикс содержат РНК и эта РНК рибосомального типа. Ядрышко и матрикс сходны по строению – в их состав входит тонкие фибриллы и рибосомальные частицы. При возникновении ядрышка после митоза происходит обособление фибриллярного компонента матрикса на поверхности хромосом. В зависимости от степени деконденсации хромосом в ядрах хромосомы клеток находятся в двух структурно-функциональных состояниях. Гетерохроматин и эухроматин.

1.7. Лекция №7 (2 часа)

Тема: «Процессинг у прокариот. Процессинг у эукариот. Процессинг РНК и сборка субчастиц рибосом»

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Определение процессинга.
2. Посттранскрипционная модификация первичных транскриптов.
3. Интроны, сплайсинг. Особенности структуры и механизм сплайсинга.
4. Особенности процессинга тРНК и рРНК у бактерий.

1.7.2 Краткое содержание вопросов

1. Вопрос №1 Определение процессинга.

Процессинг у прокариот. Процессинг у эукариот. Нуклеазная, лигазная и киназная реакции. Образующиеся в результате транскрипции первичные РНК-транскрипты поначалу далеко не всегда представляют собой функционально активные молекулы РНК. Этот процесс посттранскрипции ионной модификации первичных транскриптов называется процессингом. Процессинг мРНК эукариот, который включает три главных момента: сплайсинг, экзонирование 5'-конца и полиаденилирование 3'-конца первичных транскриптов. Процессинг у эукариот затрагивает все виды первичных транскриптов эукариотических генов. Продукты транскрипции. Вырезание интрона и лигирование остальной части молекулы-предшественника. Процессинг у прокариот в основном

затрагивает предшественники рРНК и тРНК, тогда как полицистроновые мРНК используются для трансляции сразу после их синтеза на соответствующих оперонах. Поли (А)-хвосты есть и у мРНК прокариот, но они короче, чем у мРНК эукариот и встречаются не у всех молекул мРНК. В отличие от эукариот полиаденилирование дестабилизирует структуру ряда мРНК бактерий. У эукариот гены рРНК содержат особые интроны, для которых характерен уникальный механизм сплайсинга. Такие интроны встречаются также в генах рРНК митохондрий, хлоропластов, дрожжей и грибов, однако они не выявлены в генах позвоночных животных. Аутосплайсинг. РНК-лигазы, способные осуществлять реакции внутримолекулярного и межмолекулярного лигирования. Классы РНК-лигазы и их функции.

2. Вопрос №2 Посттранскрипционная модификация первичных транскриптов.

Процессинг мРНК у эукариот. Посттранскрипционные модификации мРНК особенно существенны для эукариот, что связано с мозаичным строением их генов, содержащих не кодирующие последовательности - интроны. Число интронов в генах эукариот может достигать нескольких десятков, что диктует необходимость существования четкой системы сплайсинга первичных транскриптов.

3. Вопрос №3 Интроны, сплайсинг. Особенности структуры и механизм сплайсинга.

Сплайсинг состоит в вырезании из пре-мРНК некодирующих областей - интронов - и сшивании кодирующих структуру белка участков - экзонов. Механизмы сплайсинга. Сплайсинг состоит в вырезании из пре-мРНК некодирующих областей - интронов - и сшивании кодирующих структуру белка участков - экзонов. Различают несколько различных механизмов сплайсинга. Кэпирование представляет собой образование на 5'-конце мРНК особой структуры - кэпа. Кэпирование происходит вскоре после начала синтеза мРНК и осуществляется с участием GTP, из состава которого GMP переносится на 5'-дифосфат первого нуклеотида мРНК. Полиаденилирование осуществляется ферментом поли (А)-полимеразой и приводит к образованию на 3'-конце олиго(А)-фрагмента, содержащего 100 - 200 остатков адениловой кислоты подряд и называемого также «поли (А)-хвостом». Поли (А)-хвост определяет стабильность мРНК и время ее жизни в клетке. Кроме того, у эукариот поли (А)-хвост возможно способствует выходу мРНК из ядра в цитоплазму, а также существен для регуляции трансляции мРНК.

4. Вопрос №4 Особенности процессинга тРНК и рРНК у бактерий.

Процессинг у бактерий - образование зрелых молекул рРНК и тРНК. Первичный транскрипт, содержащий последовательности РНК, образуется на оперонах, включающих гены 16S рРНК, 23S рРНК, 5S рРНК и тРНК. Последовательности (спейсеры), существенные для процессинга. Вычленение индивидуальных рРНК с участием эндонуклеаз. РНКазы III узнают и расщепляют двунитевые участки - дуплексы, образующиеся за счет спейсеров и составляющие стебли петель в структуре предшественников. В петлях этих шпилек содержатся последовательности зрелых молекул 16S рРНК и 23S рРНК. Другой фермент - РНКазы М5, расщепляет от первичного транскрипта 5S рРНК. Образующиеся после первичного эндонуклеотического расщепления пре-тРНК подвергаются процессингу при участии двух ферментов эндонуклеазы Р и экзонуклеазы D. С 5'-конца на пре-тРНК действует эндонуклеаза Р, а с конца - экзонуклеаза D. Гибридный фермент, содержащий РНК - компонент РНКазы Р, выделенный из *E. coli*, и белковую часть - из соответствующего фермента человека. Эндонуклеазное действие РНКазы Р заключается в отщеплении 41 нуклеотида от 5'-концевой последовательности предшественника и сразу приводит к формированию 5'-конца тРНК. Экзонуклеаза D отщепляет последовательно несколько нуклеотидов с 3'-конца молекулы-предшественника, останавливаясь на аденозине, соседствующем с двумя

цитидиловыми нуклеотидами, и таким образом формируется 3'-конец тРНК, содержащий стандартную последовательность. Одновременно с процессингом рРНК и тРНК осуществляется модифицирование ряда азотистых оснований.

1.8 Лекция №8 (2 часа)

Тема: «Ошибки при синтезе ДНК. Репарация ДНК. Генетическая инженерия»

1.8.1. Вопросы лекции:

1. Ошибки при синтезе ДНК, их количество *in vitro*.
2. Этапы проверки ДНК при репарации.
3. Функциональное значение ферментов репарации.
4. Типы спонтанных и индуцируемых повреждений ДНК. Типы повреждения ДНК.
5. Полимеразная цепная реакция как метод генной инженерии. Методика выполнения ПЦР; Современные модификации ПЦР.

1.8.2 Краткое содержание вопросов

1. Вопрос №1 Ошибки при синтезе ДНК, их количество *in vitro*.

Ошибки спаривания азотистых оснований во время репликации ДНК происходят достаточно часто, в результате которых в дочернюю цепь ДНК включаются некомплементарные нуклеотидам материнской цепи нуклеотиды – мисмэтчи. Несмотря на то, что ДНК-полимераза у прокариот обладает способностью к самокоррекции, ее усилия по устранению ошибочно присоединенных нуклеотидов иногда оказываются недостаточны, и тогда в ДНК остаются некоторые неправильные пары. Репарация происходит с использованием определенной системы, связанной с метилированием ДНК. Действие этой системы репарации основано на том, что после репликации через определенное время ДНК подвергается метилированию. У *E. coli* метилируется в основном аденин с образованием N6-метил-аденина. До этого момента вновь синтезированная (дочерняя) цепь остается неметилированной. Если в такой цепи есть неспаренные нуклеотиды, то она подвергается репарации: Метилирование метит ДНК и включает систему исправления ошибок репликации.

В этой системе репарации узнаются особые структуры:

- последовательность G-N6-mA-T-C,
- деформация в двойной спирали в месте отсутствия комплементарности.

В устранении неспаренных нуклеотидов в полуметилированной молекуле ДНК принимает участие достаточно сложный комплекс ферментов репарации, который сканирует поверхность молекулы ДНК, вырезает участок дочерней цепи, прибегающей к мисмэтчам, а затем создает условия для застраивания его нужными нуклеотидами. Различные компоненты этого комплекса обладают разными активностями нуклеазной, хеликазной, АТРазной, необходимыми для внесения разрывов в ДНК и выщепления нуклеотидов, расплетания двойной спирали ДНК и энергетического обеспечения движения комплекса вдоль репарируемой части молекулы.

2. Вопрос №2 Этапы проверки ДНК при репарации.

Причины ошибок при синтезе ДНК.Способность ошибаться заложена в самой структуре фермента. *In vitro* происходит 1 ошибка на 100 тыс. нукл. для средней ДНК-полимеразы. *In vitro* можно уменьшить вероятность ошибки до 1 на 1млн. нукл., если добавить *SSB*, *геликазу* и *лигазу*. Увеличение вероятности ошибки происходит из-за конкуренции этих ионов с ионами магния за связывание с ДНК-полимеразой. Способ повышения количества ошибок - добавление аналогов нуклеотидов. Это одно из средств борьбы со СПИДом и раком. Аналоги одинаково вредны для всех клеток, однако в пораженных вирусом клетках чаще проходит репликация.

Этапы проверки:

- Первичный отбор нуклеотидов идет по принципу комплементарности.

Способностью к этому виду отбора обладают все ДНК-полимеразы благодаря полимеризационной 5'-3' активности.

-Редактирующий отбор. Его проводят все полимеразы благодаря экзонуклеазной активности 3'-5'.

-Исправление ошибок в уже синтезированной ДНК. Этим занимаются ферменты репарации.

Основные реparable повреждения в ДНК и принципы их устранения:

-Апуринизация. Каждая соматическая клетка теряет за сутки около 10000 пуринов и пиримидинов. В ДНК образуются АП-сайты. Причины апуринизации: изменение pH, ионизирующее излучение, повышение температуры и т.д. Разрывается N-гликозидная связь между пуриновым основанием и дезоксирибозой

-Дезаминирование. Аденин превращается в гипоксантин, который образует две водородные связи с цитозином. Гуанин превращается в ксантин и образует водородные связи с тиминами. При дезаминировании цитозина образуется урацил. Тимин не может быть дезаминирован (единственный в ДНК). Наличие тимина в ДНК (вместо урацила) позволяет отличать дезаминированный цитозин (т.е. урацил) от законного урацила, если бы он был в ДНК. N-гликозилаза - фермент, который узнает дезаминированное основание, разрывает N-гликозидную связь и удаляет неправильное основание. После этого специфическая эндонуклеаза вносит одноцепочечный разрыв, и фосфодиэстераза отщепляет от ДНК ту сахарофосфатную группу, к которой теперь не присоединено основание. У E.coli. У эукариот. Под действием ультрафиолетового света происходит ковалентное сшивание рядом стоящих пиримидинов. При сшивании тиминами образуется циклобутановое производное, блокирующее репликацию. Фермент фотолиаза - узнает тиминовые димеры и на свету или в темноте образует с ними комплекс. При освещении видимым светом происходит активация фермента, циклобутановое кольцо разрывается, и вновь получаются два тимина. Этот процесс называется фотореактивацией. Дезаминированные основания, и тиминовые димеры могут удаляться с помощью эксцизионной репарации.

3. Вопрос №3 Функциональное значение ферментов репарации.

Ферменты репарации:

-Эндонуклеазы – расщепляют связи внутри ДНК.

-Экзонуклеазы – расщепляют связи с концов, могут быть специфичными для 5' и 3' концов ДНК.

-ДНК-полимеразы – заполняют брешь, используя комплементарную цепь в виде матрицы.

-Лигаза – катализирует образование фосфородиэфирных связей, используя энергию гидролиза АТФ.

-ДНК-гликозилаза – расщепляет N-гликозидную связь.

-АР-эндонуклеаза – разрезает ДНК в апуриновых или апириимидиновых участках с образованием 5' конца

Механизм репарации основан на наличии в молекуле ДНК двух комплементарных цепей. Искажение последовательности нуклеотидов в одной из них обнаруживается специфическими ферментами. Затем соответствующий участок удаляется и замещается новым, синтезированным на второй комплементарной цепи ДНК. Такую репарацию называют эксцизионной, т.е. с "вырезанием". Она осуществляется до очередного цикла репликации, поэтому ее называют также дорепликативной. Важным моментом в запуске механизма репарации является обнаружение ошибки в структуре ДНК. Нередко такие ошибки возникают во вновь синтезированной цепи в процессе репликации. Ферменты репарации должны обнаружить именно эту цепь. Объектом узнавания ферментами репарации могут также служить разрывы в цепи ДНК. У высших организмов, где синтез ДНК происходит отдельными репликациями, вновь синтезируемая цепь ДНК имеет разрывы, что делает возможным ее узнавание. Восстановление структуры ДНК при утрате

пуриновых оснований одной из ее цепей предполагает обнаружение дефекта с помощью фермента эндонуклеазы. измененный участок с несколькими примыкающими к нему нуклеотидами удаляется ферментом экзонуклеазой, а на его месте в соответствии с порядком оснований комплементарной цепи образуется правильная нуклеотидная последовательность. При изменении одного из оснований в цепи ДНК в восстановлении исходной структуры принимают участие ферменты ДНК-гликозилазы. Образование в полинуклеотидных цепях под действием УФ-лучей тиминовых димеров (Т-Т) требует участия ферментов, узнающих не отдельные измененные основания, а более протяженные повреждения структуры ДНК. Репаративный процесс связан с удалением участка, несущего димер, и восстановлением нормальной последовательности нуклеотидов путем синтеза на комплементарной цепи ДНК. В случае, когда система эксцизионной репарации не исправляет изменения, возникшего в одной цепи ДНК, в ходе репликации происходит фиксация этого изменения и оно становится достоянием обеих цепей ДНК. Это приводит к замене одной пары комплементарных нуклеотидов на другую либо к появлению разрывов (брешей) во вновь синтезированной цепи против измененных участков. Восстановление нормальной структуры ДНК при этом может произойти и после репликации.

4. Вопрос №4 Типы спонтанных и индуцируемых повреждений ДНК. Типы повреждения ДНК.

Под действием физических и химических агентов, а также при нормальном биосинтезе ДНК в ней могут возникать повреждения. Клетки имеют механизмы исправления повреждений в нитях ДНК. Способность клеток к исправлению повреждений в молекулах ДНК - репарация. Это процесс удаления поврежденного участка и восстановления правильной структуры ДНК. Характерен только для ДНК и обусловлен особенностями ее структуры, а именно: комплементарностью и антипараллельностью цепей. Обеспечивает сохранение генетического материала. Происходит при участии специальных ферментов

Типы повреждений ДНК на уровне одного нуклеотида.

- Отсутствие основания (депуринизация).
- Некомплементарное основание.
- Нарушенное основание (дезаминирование).

Структурные:

- Одноцепочечные разрывы.
- Образование неспецифических связей между цепями (тиминовые димеры и поперечные сшивки).
- Двухцепочечные разрывы.

5 Вопрос №5 Полимеразная цепная реакция как метод генной инженерии.

Методика выполнения ПЦР; Современные модификации ПЦР.

Принципы ПЦР диагностики. ПЦР используется для амплификации определенного участка цепи ДНК (ДНК-мишень). Основной набор ПЦР требует нескольких компонентов и реактивов. Они включают:

- ДНК-матрицу, содержащую целевой участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера, комплементарные 3'-концам каждой из смысловой и антисмысловой цепей ДНК-мишени.
- Taq-полимераза или иная ДНК-полимераза, действующая при оптимальной температуре около 70 ° С.
- Дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ; трифосфатные группы, содержащие нуклеотиды), строительные блоки, из которых ДНК-полимераза синтезирует новую цепь ДНК.
- Буферный раствор, обеспечивающий подходящие химические условия для оптимальной активности и стабильности ДНК-полимеразы.

-Двухвалентные катионы, ионы магния или марганца; Одновалентные катионы ионов калия.

Методика выполнения ПЦР. ПЦР проводится в реакционном объеме 10-200 мкл в небольших реакционных пробирках, в термоциклере-амплификаторе. Амплификатор нагревает и охлаждает реакционные пробирки для достижения температур, необходимых на каждом этапе реакции. Многие современные амплификаторы используют эффект Пельтье, который позволяет нагревать и охлаждать блок с ПЦР-пробирками просто путем изменения направления электрического тока. Тонкостенные реакционные пробирки способствуют благоприятной теплопроводности для обеспечения быстрого теплового равновесия.

Стадии полимеразной цепной реакции. Процесс ПЦР можно разделить на три этапа: Экспоненциальная амплификация: В течение каждого цикла, количество продукта удваивается. Стадия выравнивания: реакция замедляется, так как ДНК-полимераза теряет активность и потребление реактивов, таких как дНТФ и праймеры, заставляет их стать ограничивающими. Продукт не накапливается из-за истощения реактивов и ферментов.

Вариации основных методов полимеразной цепной реакции. Аллель-специфичная ПЦР. ПЦР-сборка или сборка циклирования полимеразы. Асимметричная ПЦР. Геликаза-зависимая амплификация. Инвертированная ПЦР. ПЦР, опосредованная лигированием. Мультиплексная ПЦР. Вложенная ПЦР. Количественная ПЦР. Ступенчатая ПЦР. Универсальная. Цифровая ПЦР. Виртуальная ПЦР. Электронная ПЦР. e-ПЦР - относится к вычислительным средствам, применяющимся для вычисления результатов теоретической полимеразной цепной реакции с помощью данного набора праймеров (зондов) для амплификации последовательностей ДНК из секвенированного генома или транскриптома.

1.9 Лекция №9 (2 часа)

Тема: «Обратная транскрипция, ее значение. Теории возникновения онкологических заболеваний Способы выделения ДНК из биологического материала. Понятие о вирусах»

1.9.1 Вопросы лекции:

1. Представление об обратной транскрипции.
- 2 Теории возникновения онкологических заболеваний:
 - канцерогенная теория рака;
 - генетическая, вирусная теории рака.
 - теория Л. Зильбера.
- 3 Антионкогены.
- 4 Методы генетической инженерии.Выделение геномной ДНК.
- 5 Хромосомные болезни.

1.9.2. Краткое содержание вопросов

1. Вопрос 1 Представление об обратной транскрипции.

Обратная транскрипция – процесс синтеза двуцепочечной ДНК на матрице одноцепочечной РНК. Идея обратной транскрипции сначала была не популярна, так как противоречила центральной догме молекулярной биологии (транскрипция ДНК в РНК, затем трансляция РНК в белок). Темин и Балтимор в 1970 году, независимо друг от друга, открыли фермент, катализирующий данный процесс, так возможность обратной транскрипции была подтверждена. Фермент получил название РНК-зависимой ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы или ревертазы (В.А.Энгельгардт). Обратная транскрипция необходима для осуществления интеграции генома ретровирусов, представленного молекулами одноцепочечной РНК, в хромосому клетки – хозяина. При этом обратная транскриптаза вируса превращает одноцепочечную РНК вируса в

двухцепочечную молекулу ДНК, способную к интеграции. Обратная транскрипция лежит в основе целого ряда методик, широко используемых в современных лабораториях: ОТ-ПЦР (ПЦР, совмещенная с обратной транскрипцией), исследование уровня экспрессии генов с помощью количественной ПЦР или гибридизационных технологий, подготовка библиотек кДНК, клонирование генов, генно-инженерные исследования. В лабораторной практике часто применяются обратная транскриптаза вируса лейкоза мышей Молони и обратная транскриптаза вируса миелобластома птиц. Ферменты, созданные специально модифицированные методами белковой инженерии. В основном, усилия экспериментаторов, создающих новые модификации обратных транскриптаз, направлены на увеличение термостабильности и уменьшение РНКазной активности ферментов. Повышение термостабильности позволяет увеличить температуру прохождения реакции обратной транскрипции, что способствует разрушению вторичных структур в матрице РНК, и, как следствие, увеличивает длину получаемого обратного транскрипта. Обратные транскриптазы в дополнение к полимеразной активности обладают также рибонуклеазной активностью и способны разрушать РНК в РНК-ДНК дуплексах. Данная активность отрицательно сказывается на длине и выходе обратного транскрипта. Поэтому выключение РНКазной активности путем введения мутаций благоприятно сказывается на свойствах обратной транскриптазы.

2. Вопрос 2 Теории возникновения онкологических заболеваний:

- Канцерогенная теория рака.
- Генетическая, вирусная теории рака.
- Теория Л. Зильбера.

Теория рака:

- Канцерогенная теория. Известны профессиональные раковые заболевания: рак кожи у трубочистов, рак губы у кровельщиков и пр. Бензпирен - первый описанный канцероген. Определение: канцерогены - это вещества, повышающие частоту возникновения рака.
- Генетическая теория. Появилась в 30-х годах. У лабораторных мышей известны высоко- и низкоракковые лабораторные линии
- Вирусная теория. В молоке мышей был найден "фактор молока".

По гипотезе Л. Зильбера причиной рака может быть вирус, который становится геном. Большинство изученных вирусных онкогенов кодируют протеинкиназу, фермент, который фосфорилирует белки. Как правило - это тирозиновая протеинкиназа. В клетке есть собственные протеинкиназы, в том числе и тирозиновая, но гораздо более активны сериновая и треониновая. Гены, кодирующие клеточные протеинкиназы, обозначают онсс, вирусные - онсв. Онсс - клеточные гены, работающие в дифференцированных клетках. Онсс имеют интроны, онсв - не имеют. Онсв либо добавляет тирозиновую протеинкиназу - и сказывается дозовый эффект гена тирозиновой протеинкиназы, либо, по сравнению с клеткой, не имеющей онсв, клетка, его имеющая, фосфорилирует тирозин, а не серин или треонин, как обычно, то есть происходит смена мишени. Это белки цитоскелета (нарушение адгезии), мембранные белки (нарушение контактного торможения), гистоны (нарушение регуляции, компактизации, облегчение репликации ДНК). Ретровирусы возникли в результате внедрения мобильных элементов в непосредственной близости от онсс генов. В дальнейшем онсс превратился в онсв, а клеточная полимеразы - в обратную транскриптазу. Вирус начал самостоятельную жизнь. Стадия провируса говорит о его клеточном происхождении. В медицине рак - это злокачественная опухоль только эпителиальных тканей. Метастазы - возникающие опухоли в районе удаления от исходной опухоли. Рак - болезнь генома. Одним из путей активации онсс является такая перестройка генома, в результате которой рядом с онкогеном появляется новый регуляторный элемент, обеспечивающий его более активную транскрипцию. Структурная мутация в протоонкогене, т.е. в нормальном клеточном гене, способном превратиться в онкоген. Существуют антионкогены, или гены-супрессоры опухолей, подавление

активности которых приводит к развитию опухолей. К онкогенам относят некоторые гены белков - факторов роста, а также гены рецепторов факторов роста. Перепроизводство факторов роста или нарушение структуры их рецепторов может привести к более частому делению клеток. Изменения в генах могут превратить нормальную клетку в раковую. Подавление активности генов, ответственных за рост и размножение клеток, осуществляется белковыми продуктами генов - супрессоров опухолей. Только находясь в комплексе с циклинами, циклинзависимые протеинкиназы способны фосфорилировать белки мишени, необходимые для перехода в следующую фазу клеточного цикла. Специальные белки сканируют ДНК перед репликацией на предмет выявления нерепарированных повреждений. Если ДНК не проходит тест, то включаются системы реализации "запрограммированной смерти" - апоптоза, в результате чего разрушаются жизненно важные структуры клетки, в том числе хромосомы и цитоскелет. Апоптоз определяется большим числом генов. Когда ген выведен из строя, клетки с поврежденной (мутантной) ДНК перестают выбраковываться и в них происходит накопление новых мутаций, которые могут затрагивать как протоонкогены, так и гены-супрессоры опухолей.

3. Вопрос №3 Антионкогены.

Антионкогены или гены - супрессоры рака. В геноме клеток обнаруживаются гены, которые, напротив, тормозят пролиферацию клеток и оказывают антионкогенное действие. Потеря клеткой таких генов может приводить к развитию рака. Наиболее изученными антионкогенами являются p53 и Rb. Потеря Rb обнаруживается в редко встречаемой опухоли ретинобластоме. В случаях наследственного дефекта Rb нормальный ген отсутствует только на одной аллеле. Вторая аллель остается сохранной, поэтому опухоль может развиваться только при одновременном повреждении второго сохранного гена Rb. В случае спонтанно развившейся ретинобластомы потеря Rb затрагивает сразу оба аллеля. Молекулой 1995 года назван ген-супрессор p53. Существуют две формы антионкогена p53: "дикая" (неизменная) и мутированная. В опухолевых клетках при многих типах рака обнаруживается накопление мутированной или "дикой" формы p53 в избыточном количестве, что оказывает отрицательное действие на регуляцию клеточного цикла, в связи, с чем клетка приобретает способность к усиленной пролиферации. Регуляция пролиферативной активности клетки с помощью p53 осуществляется через усиление или ослабление им апоптоза. Активация p53 на фоне активации клеточных онкогенов c-fos и c-myc приводит к смерти опухолевых клеток, что и наблюдается при действии на опухоль химиопрепаратов и радиации. Мутации p53 или инактивация его другими способами на фоне усиления экспрессии c-fos, c-myc и bcl-2, наоборот, заканчиваются усилением пролиферации клеток и злокачественной трансформацией.

4. Вопрос №4 Методы генетической инженерии. Выделение геномной ДНК.

Методы генетической инженерии _ расщепление ДНК (рестрикция), гибридизация нуклеиновых кислот, клонирование ДНК, определение нуклеотидных последовательностей (секвестирование), химико-ферментативный синтез полинуклеотидов. Полимеразная цепная реакция и методы амплификации нуклеиновых кислот. Понятие генной инженерии. Основной инструментарий; Рестрикция ДНК. Рестриктазы, их виды; Гибридизация нуклеиновых кислот. ДНК-зонды. Биотининг, его виды. Клонирование ДНК. Основные достижения генной инженерии. Генная инженерия – искусство использования знаний, методов и техники, физико-химической биологии и молекулярной генетики для конструирования организмов с заданными наследственными свойствами. Состоит из двух разделов: собственно генная инженерия; геномная инженерия. Генная инженерия, или техника рекомбинации ДНК – набор различных методов молекулярной биологии, позволяющий *in vitro* получить наследуемый генетический материал из организма донора и внедрить его в реципиента. Геномная

инженерия – глубокое вмешательство в геном, вплоть до создания новых видов. Этапы генно-инженерного опыта. Инструменты генной инженерии. Рестрикция ДНК осуществляется с помощью специфических ферментов – рестриктаз, которые являются эндонуклеазами и метилтрансферазами бактериального происхождения, предназначенные для защиты клеток бактерий от чужеродной ДНК, при этом, на собственные ДНК эти ферменты не действуют, так как в сайтах рестрикции ДНК, модифицированного метилированием, имеется защита от деградации.

3 типа рестриктаз:

1. Рестриктаза типа I. Специфичны к неметилированным двуцепочечным ДНК; Кофакторы – S- аденозилметионин, АТФ, Mg^{2+} . Разрывы - случайны, продукты расщепления гетерогенны.

2. Рестриктаза типа II. Специфически распознают сайты рестрикции в ДНК; Кофакторы – Mg^{2+} . Рестриктазы этого типа узнают в ДНК палиндромные последовательности оснований, которые являются сайтами рестрикции. Палиндромные последовательности - последовательности оснований, которые читаются вперед и назад одинаково. Эти последовательности могут быть различных размеров, но те, которые используются рестриктазами. Рестриктазы гидролизуют фосфодиэфирные связи в двух цепях ДНК, осуществляют симметричные, либо несимметричные разрывы в зоне палиндромных последовательностей. В первом случае образуются тупые концы. Во втором случае действие рестриктаз приводит к образованию в ДНК «липких концов», которые способны к самокомплиментарности. «Липкие концы» широко используются в генно-инженерных опытах.

3. Рестриктаза типа III. Кофакторы – S- аденозилметионин, АТФ, Mg^{2+} . Они узнают неполиндромные последовательности, длиной 5-6 нуклеотидных пар и расщепляют ДНК в стороне от сайтов узнавания, на расстоянии 24-25 нуклеотидных пар. Далее, ДНК – фрагменты подвергают электрофорезу – гель для разделения по размеру. После этого, нужные ДНК – фрагменты секвенируют, т.е., определяют нуклеотидную последовательность, используя химическое секвенирование или энзимотипичное секвенирование.

Гибридизация нуклеиновых кислот. ДНК-зонды. Биоттинг. Если две изолированные цепи ДНК выдерживать при температуре $65^{\circ}C$, то они вновь спариваются – ренатурация, гибридизация или отжиг. При конструировании гибридной ДНК, гибридизация нуклеиновых кислот проводится двумя методами:

-Коннекторный – гибридизация продуктов рестрикции разных геномов осуществляется путем наращивания на их концах «липких» участков с помощью ферментов – трансферазы.

-Рестриктазно-лигазный – наиболее популярный в генной инженерии, используется одна рестриктаза II типа, дающая фрагменты рестрикции с «липкими» концами.

5. Вопрос 5 Хромосомные болезни.

Хромосомные болезни обусловлены изменением числа или структуры хромосом. Такие нарушения могут возникать либо в половых клетках родителей, либо в процессе деления оплодотворенной яйцеклетки (зигота) под действием биологически активных физических, химических, вирусологических, бактериологических и других факторов. Различают хромосомные синдромы, обусловленные изменением половых хромосом, и синдромы, вызванные аномалиями аутосом (любой из 22 пар неполовых хромосом). Среди аномалий половых хромосом наиболее часты синдром Шерешевского — Тернера, при котором в хромосомном наборе отсутствует одна половая хромосома, и синдром Клайнфелтера, при котором имеется одна или несколько добавочных половых хромосом. Наиболее распространенным синдромом, обусловленным аномалией аутосом, является болезнь Дауна. В хромосомном наборе больных присутствует лишняя 21-я хромосома. Клиническая картина хромосомных синдромов складывается из сочетания врожденных

пороков, дизэмбриогенетических стигм, отставания в физическом и нервно-психическом развитии.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ

ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа 1 (2 часа)

Тема: Молекулярная биология – предмет, задачи. Нуклеиновые кислоты, нуклеотиды

2.1.1 Цель работы: Предмет и задачи молекулярной биологии. Становление молекулярной биологии как науки. Нуклеиновые кислоты, их структура. Участие нуклеиновых кислот в передаче наследственной информации. Физические параметры конформационных форм ДНК. Понятие о параметрах сверхспирализованной молекулы ДНК. Топоизомеразы и топоизомеры ДНК.

2.1.2 Задачи работы:

1. Предмет изучения молекулярной биологии?
2. Знать структуру дезоксирибонуклеотида;
3. Указать, чем обусловлены кислотные свойства ДНК;
4. Дать классификацию оснований, входящих в состав ДНК;
5. Указать каким образом ДНК упакована в ядре.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица № 3. Схема строения ДНК;
2. Таблица № 8. Схема строения дезоксирибонуклеотида;
3. Таблица № 9. Схема строения фосфодиэфирной связи;

2.1.4 Описание (ход) работы:

1. Определение нуклеиновых кислот.
2. Какие основания входят в состав ДНК
3. Чем РНК отличается от ДНК?

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «Структура и функции ДНК и РНК, их физико-химические свойства».

2.2.1 Цель работы: Физико-химические свойства нуклеиновых кислот. Кинетика нуклеиновых кислот. Ренатурация, денатурация. Нуклеотиды, особенности их расположения, принцип комплиментарности. Частота встречаемости в определенном соседстве любых двух оснований.

2.2.2 Задачи работы:

1. Знать физико-химические свойства нуклеиновых кислот.
2. Знать принцип комплиментарности пар оснований;
3. Дать характеристику сахарофосфатного комплекса;
4. Указать сколько водородных связей образуется между парами атомов;

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица № 3. Схема строения ДНК
2. Таблица № 4. Комплиментарные участки ДНК

2.2.4 Описание (ход) работы:

1. Сколько пар оснований формируют один виток спирали ДНК?
2. ДНК – это лево-или правозакрученная спираль?
3. Какова частота встречаемости в ДНК прокариот и эукариот?
4. Нуклеотиды, их строение.
5. Чем отличается ренатурация от денатурации?

2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Тема: «Генетический код. Репликация ДНК»

2.3.1 Цель работы: Генетический код его свойства. Свойства двойной спирали ДНК. Гибкость двойной спирали. Семейства, образованные правыми спиралями. Структуры в пределах каждого семейства. Репликация ДНК.

2.3.2 Задачи работы:

1. Иметь понятие генетического кода, его свойств;
2. Уметь объяснить, чем обусловлена гибкость двойной спирали;
3. Знать основы структур А-семейства и В-семейства, Z-формы;
4. Определить от чего зависит разное число пар, приходящихся на виток спирали, разный наклон пар оснований к оси спирали;
5. Дать понятие репликации ДНК.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица № 3. Схема строения ДНК
2. Таблица № 4. Комплементарные участки ДНК
3. Таблица № 7. Спираль ДНК

2.3.4 Описание (ход) работы:

1. Что такое генетический код?
2. Что такое гибкость двойной спирали?
3. Каким образом происходит размещение спирали ДНК в хромосоме?
4. Какие изменения происходят в структурах семейств в зависимости от концентрации соли, температуры?
5. Объяснить процессы репликации ДНК

2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).

Тема: «Репликация у прокариотов»

2.4.1 Цель работы: Процесс удвоения родительских молекул геномной ДНК во время воспроизводства клеток. Белки и ферменты, принимающие участие в репликации. Стадии репликации. Особенности репликации у *E. coli*. Понятие о репликоне. Свойства и функции ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*.

2.4.2 Задачи работы:

1. Дать характеристику репликации у *E. coli*;
2. Уметь показать зависимость репликации от белков и ферментов;
3. Знать строение репликативной вилки;
4. Объяснить процессы, происходящие при репликации.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Таблица № 3. Схема строения ДНК

Таблица № 10. Синтез цепей ДНК в репликативной вилке.

Таблица № 11. Белки, входящие в состав репликативного комплекса *E. coli*.

2.4.4 Описание (ход) работы:

1. Для чего должна происходить репликация?
2. Как происходит синтез комплементарной дочерней цепи?
3. Каковы особенности механизмов происходящих во время репликации?
4. Каковы функции белков и ферментов, входящих в состав репликативного комплекса *E. coli*

2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

Тема: «Репликация у эукариот»

2.5.1 Цель работы: Процесс удвоения родительских молекул геномной ДНК во время воспроизводства клеток. Белки и ферменты, принимающие участие в репликации. Стадии репликации. Структура и работа промоторов. Ошибки репликации.

2.5.2 Задачи работы:

1. Дать характеристику репликации у эукариот;
2. Уметь показать зависимость репликации от белков и ферментов;

3. Знать строение репликативной вилки;
4. Объяснить процессы, происходящие при репликации;

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица № 3. Схема строения ДНК
2. Таблица № 10. Синтез цепей ДНК в репликативной вилке.
3. Таблица № 11. Белки, входящие в состав репликативного комплекса эукариот.

2.5.4 Описание (ход) работы:

1. Для чего должна происходить репликация?
2. Как происходит синтез комплиментарной дочерней цепи?
3. Каковы особенности механизмов происходящих во время репликации?
4. Каковы функции белков и ферментов, входящих в состав репликативного комплекса эукариот?

2.6 Лабораторная работа №6 (2 часа).

Тема: «Репарация ДНК»

2.6.1 Цель работы: Механизм репарации неспаренных нуклеотидов. SOS репарация. Индукция активности группы генов, задействованных в клеточных процессах, сопряженных с репарацией ДНК.

2.6.2 Задачи работы:

1. Сущность и значение репарации;
2. Уметь показать зависимость начала SOS репарации от количества повреждений в клетке;
3. Знать, как протекает SOS репарация.

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица № 10. Синтез цепей ДНК в репликативной вилке.
2. Таблица № 12. Гены, задействованные в SOS репарации повреждений ДНК
3. Таблица № 24. Структуры рРНК.

2.6.4 Описание (ход) работы:

1. Чем обусловлена репарация?
2. Значение репарации;
3. Когда происходит SOS репарация?
4. Каковы отличительные и сходные процессы при рекомбинантной и SOS репарациях?
5. Что является структурной основой для формирования рибонуклеопротеинового тьяжа?

2.7 Лабораторная работа №7 (2 часа).

Тема: «Рекомбинация»

2.7.1 Цель работы: Понятие об общей (гомологичной) и сайтспецифической рекомбинации. Различия молекулярных механизмов общей и сайтспецифической рекомбинации. Роль рекомбинации в пострепликативной репарации. RecBCD комплекс. RecA белок. Рекомбинация у высших эукариот. Сайтспецифическая рекомбинация. Типы хромосомных перестроек, осуществляемых при сайтспецифической рекомбинации.

2.7.2 Задачи работы:

1. Дать характеристику рекомбинации;
2. Уметь объяснить, что такое сайтспецифическая рекомбинация;
3. Объяснить влияние RecBCD комплекса;
4. Объяснить роль рекомбинации в пострепликативной репарации;

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица № 3. Схема строения ДНК
2. Таблица № 4. Комплиментарные участки ДНК

3. Таблица № 7. Спираль ДНК

4. Таблицы № 27. Возможные конформации нуклеотидных единиц

2.7.4 Описание (ход) работы:

1. Значение RecA белка;
2. Типы хромосомных перестроек;
3. Рекомбинация у высших эукариот;

2.8 Лабораторная работа №8 (2 часа).

Тема: «Транскрипция у прокариот, ее этапы, принцип и механизмы»

2.8.1 Цель работы: Особенности структуры РНК-полимеразы. Стадии транскрипционного цикла. Репликация и транскрипция. Сверхспирализация и транскрипция. Терминация и транскрипция. Регуляция транскрипции в развитии фага

2.8.2 Задачи работы:

1. Знать транскрипцию прокариот;
2. Знать особенности структуры РНК-полимеразы;
3. Уметь идентифицировать стадии транскрипционного цикла.

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица № 21. Транскрипция у прокариот.
2. Таблица № 20. Стадии транскрипционного цикла.

2.8.4 Описание (ход) работы:

1. Как происходит транскрипция у прокариот?
2. Охарактеризуйте стадии транскрипционного цикла;
3. Сверхспирализация и транскрипция;
4. Объяснить понятие регуляции транскрипции в развитии фага λ ;

2.9 Лабораторная работа №9 (2 часа).

Тема: «Регуляция транскрипции»

2.9.1 Цель работы: Регуляция транскрипции и механизм экспрессии генов. Белки активаторы и репрессоры транскрипции. Оперон как группа согласованно регулируемых генов. Оператор как участок оперона.

2.9.2 Задачи работы:

1. Знать регуляцию транскрипции;
2. Знать особенности механизма экспрессии генов;
3. Уметь идентифицировать стадии транскрипционного цикла;

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица № 22. Транскрипция.
2. Таблица № 20. Стадии транскрипционного цикла

2.9.4 Описание (ход) работы:

1. Как происходит регуляция транскрипции?
2. Охарактеризуйте стадии транскрипционного цикла;
3. Отличие оперона от оператора.

2.10 Лабораторная работа №10 (2 часа).

Тема: «Хроматин, его свойства»

2.10.1 Цель работы: Структурная организация нуклеосом. Модификация гистонов и динамическая структура хроматина. Представление о «перемоделировании» хроматина. Особенности структуры хроматина половых хромосом в связи с компенсацией различий числа генов X-хромосом у разных полов. Представление о петельной организации хромосом.

2.10.2 Задачи работы:

1. Уметь определить состав хроматина;
2. Объяснить строение нуклеосомного коры;

3. Дать характеристику модификаций гистонов и динамической структуры хроматина;

4. Определить взаимосвязь хроматина и общей регуляции транскрипции у эукариот;

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица №17. ДНК и гистоны в составе хроматина.

2. Таблица №18. Компактизация молекулы ДНК в составе хроматина.

2.10.4 Описание (ход) работы:

1. Как протекает деконденсация хроматина в зоне активной транскрипции?

2. Как происходит взаимодействие ДНК и гистонов в составе хроматина?

3. Какой состав имеют хроматосомы?

4. К какой группе относят негистоновые белки хроматина?

5. Что такое конденсированный хроматин?

2.11 Лабораторная работа №11 (2 часа).

Тема: «Процессинг у прокариот»

2.11.1 Цель работы: Определение процессинга. Посттранскрипционная модификация первичных транскриптов. Особенности процессинга тРНК и рРНК у бактерий. Ферменты процессинга прокариот. Посттранскрипционная модификация первичных транскриптов. Интроны, сплайсинг. Особенности структуры и механизм сплайсинга. Особенности процессинга рРНК в ядрышке.

2.11.2 Задачи работы:

1. Знать процессинг у прокариот;

2. Знать ферменты процессинга прокариот;

3. Спейсеры как вставочные последовательности для процессинга;

4. Знать процессинг у эукариот;

5. Знать процессинг тРНК, рРНК и мРНК у прокариот;

6. Знать особенности структуры и механизм сплайсинга;

2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица №15. Процессинг рРНК у прокариот.

2. Таблица №17. Процессинг тРНК

2.11.4 Описание (ход) работы:

1. Каким ферментом осуществляется полиаденилирование у прокариот?

2. Какой фермент расщепляет дуплексы?

3. Как происходит сплайсинг, его стадии?

4. Что такое интроны и экзоны?

5. Каким ферментом осуществляется полиаденилирование?

6. Объяснить понятие аутосплайсинга;

7. Что такое альтернативный сплайсинг?

2.12 Лабораторная работа №12 (2 часа).

Тема: «Течение процессинга в эукариотической клетке»

2.12.1 Цель работы: Течение процессинга в клетке эукариотических организмов. Модификации посттранскрипционных транскриптов. Особенности структуры и механизм сплайсинга. Особенности процессинга тРНК и рРНК у ядерных организмов.

2.12.2 Задачи работы:

1. Знать процессинг у эукариот;

2. Знать ферменты процессинга эукариот;

3. Спейсеры как вставочные последовательности для процессинга;

4. Знать процессинг тРНК, рРНК и мРНК у эукариот;

5. Знать особенности структуры и механизм сплайсинга;

2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица №15. Процессинг рРНК у эукариот.
2. Таблица №17. Процессинг тРНК.

2.12.4 Описание (ход) работы:

1. Каким ферментом осуществляется полиаденилирование у эукариот?
2. Какой фермент расщепляет дуплексы?
3. Как происходит сплайсинг, его стадии?
4. Что такое интроны и экзоны?
5. Каким ферментом осуществляется полиаденилирование?
6. Объяснить понятие аутосплайсинга; что такое альтернативный сплайсинг?

2.13 Лабораторная работа №13 (2 часа).

Тема: «Процессинг РНК и сборка субчастиц рибосом»

2.13.1 Цель работы: Структура рибосом. Функциональные центры рибосом. Аминоацильные и пептидилные участки. Образование пептидной связи на рибосомах; Пептидилтрансферазная реакция на рибосомах; Транслокация на рибосомах; Стадии инициации, факторы, участвующие в ней.

Рибосомные РНК, их виды, первичные и вторичные структуры. Структурные домены и компактная самоупкладка молекул РНК. Значение рибосомной РНК. Прокариотический и эукариотический типы рибосом. Последовательное считывание и РНК рибосомами, полирибосомы. Морфология рибосомы. Размеры, внешний вид, подразделение на две субъединицы. Детальная форма рибосомных субъединиц.

2.13.2 Задачи работы:

1. Изучить рибосомные РНК, их виды;
2. Дать сравнительную характеристику структур рРНК;
3. Знать, что означает третья субчастица рибосомы;
4. Уметь объяснить участие рРНК в процессе трансляции;
5. Знать структуру рибосом;
6. Знать локализацию рибосом в клетке;
7. Знать размеры, внешний вид, форма рибосомных субъединиц;
8. Знать коэффициенты седиментации про- и эукариот

2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица № 10. Синтез цепей ДНК в репликативной вилке.
2. Таблица №12. Гены, задействованные в SOS репарации повреждений ДНК
3. Таблица №20. Белки рибосомы.
4. Таблица №21. Схема строения рибосомы бактерий.
5. Таблица №24. Структуры рРНК.
6. Таблица №36. Структура рибосом

2.13.4 Описание (ход) работы:

1. Как происходит процессинг РНК?
2. Что является структурной основой для формирования рибонуклеопротеинового тьяжа?
3. Что формирует постоянные и переменные домены?
4. Какие изменения происходят во вторичной структуре рРНК?
5. Из скольких субчастиц состоит каждая рибосома у эукариот?
6. Какие выступы содержит большая субчастица рибосом?
7. Из каких долей состоит малая субчастица рибосом?

2.14 Лабораторная работа №14 (2 часа).

Тема: «Ошибки при синтезе ДНК. Репарация ДНК. Генетическая инженерия»

2.14.1 Цель работы: Причины ошибок при синтезе ДНК, их особенности. Репарация ДНК. Этапность. Ферменты репарации, их роль. Типы спонтанных и индуцируемых повреждений ДНК. Болезни, обусловленные дефектами репарации. Механизм репарации неспаренных нуклеотидов. SOS репарация. Индукция активности группы генов, задействованных в клеточных процессах, сопряженных с репарацией ДНК

2.14.2 Задачи работы:

1. Дать характеристику болезням, обусловленным дефектами репарации;
2. Уметь показать зависимость начала SOS репарации от количества повреждений в клетке;
3. Знать, как протекает SOS репарация;

2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица № 10. Синтез цепей ДНК в репликативной вилке.
2. Таблица №12. Гены, задействованные в SOS репарации повреждений ДНК.

2.14.4 Описание (ход) работы:

1. Когда происходит SOS репарация?
2. Каковы отличительные и сходные процессы при рекомбинантной и SOS репарациях?

2.15 Лабораторная работа №15 (2 часа).

Тема: «Полимеразная цепная реакция, как метод генной инженерии. Хромосомные болезни»

2.15.1 Цель работы: Развитие науки - генной инженерии. Полимеразная цепная реакция, как метод генной инженерии. Теория возникновения хромосомных болезней. Индукция активности группы генов, задействованных в клеточных процессах, сопряженных с репарацией ДНК

2.15.2 Задачи работы:

1. Дать характеристику болезням, обусловленным дефектами репарации;
2. Уметь объяснить принцип ПЦР;
3. Знать для каких целей применяется полимеразная цепная реакция.

2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимедия-проектор, экран, ноутбук.
2. Презентация - Хромосомные болезни
3. Таблица № 10. Синтез цепей ДНК в репликативной вилке.
4. Таблица №12. Гены, задействованные в SOS репарации повреждений ДНК.

2.15.4 Описание (ход) работы:

1. Праймеры, используемые для ПЦР
2. Чем обусловлены хромосомные болезни?
3. Что такое «Болезнь Дауна»?
4. Диагностика перинатальных инфекций с помощью ПЦР?

2.16 Лабораторная работа №16 (2 часа).

Тема: «Представление об обратной транскрипции ее значение. Теории возникновения онкологических заболеваний»

2.16.1 Цель работы: Причины ошибок при синтезе ДНК. Аттенуация. Теории возникновения онкологических заболеваний. Канцерогенная теория рака. Генетическая теория рака. Вирусная теория рака. Онкологическая теория Л. Зильбера.

2.16.2 Задачи работы:

1. Рассказать об обратной транскрипции и ее значения.
2. Дать характеристику онкологических заболеваний, обусловленных дефектами репарации;

3. Уметь показать зависимость начала SOS репарации от количества повреждений в клетке;

4. Знать, как протекает SOS репарация;

2.16.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица №14. Белки, участвующие в регуляции транскрипции у эукариот.

2. Таблица №16. Присоединение белков, влияющих на транскрипцию к гену β -глобину.

3. Таблица № 23. Транскрипция у эукариот.

4. Таблица № 20. Стадии транскрипционного цикла.

5. Таблица №13. Гены, задействованные в SOS репарации повреждений ДНК.

2.16.4 Описание (ход) работы:

1. Значение обратной транскрипции

2. Молекулярные и генетические основы синдрома Дауна?

3. Молекулярные и генетические основы синдрома Терешевского-Тернера?

2.17 Лабораторная работа №17 (2 часа).

Тема: «Способы выделения ДНК из биологического материала. Понятие о вирусах»

2.17.1 Цель работы: Способы выделения ДНК из биологического материала. Представление о ретровирусах и провирусах, их строение. Устройство генома ретровирусов

2.17.2 Задачи работы:

1. Знать способы выделения ДНК;

2. Уметь объяснить рестрикции;

3. Знать для каких целей применяется полимеразная цепная реакция и методы амплификации нуклеиновых кислот.

2.17.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица №37 Строение вируса

2. Таблица №48 Особенности строения ретро- и провирусов.

2.17.4 Описание (ход) работы:

1. Праймеры, используемые для ПЦР

2. Инструменты генной инженерии?

3. Рестриктазы, их виды?

4. Биотинг, его виды?

5. Ретровирусы и провирусы, их строение и отличие.

2.18 Лабораторная работа №18 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие»

2.18.1 Цель работы: Подведение итогов изучения дисциплины «Молекулярная биология» Нуклеиновые кислоты. Стадии транскрипционного цикла. Рекомбинация у высших эукариот. Белки хроматина.

Тестирование.

2.18.2 Задачи работы:

1. Уметь объяснить строение и биосинтез белка;

2. Знать, строение нуклеиновых кислот;

3. Уметь объяснить структуру генома у прокариот и эукариот;

4. Знать белки и ферменты, участвующие в репликации;

5. Знать процессы транскрипции и ее регуляцию;

6. Иметь понятие о методах генетической инженерии, хромосомных болезнях.

7. Знать влияние техногенных факторов окружающей среды на организм человека и животных.

2.18.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица № 10. Синтез цепей ДНК в репликативной вилке.
 2. Таблица №14. Белки, участвующие в регуляции транскрипции у эукариот.
 3. Таблица №15. Процессинг рРНК у прокариот.
 4. Таблица №17. Процессинг тРНК
 5. Таблица №24. Структуры рРНК.
- Таблица №36. Структура рибосом

2.18.4 Описание (ход) работы:

Повторить основные вопросы молекулярной биологии.