

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

**Б1.В.05 Генетические маркеры и ДНК-технологии в селекции, мониторинге
макроэволюции популяций и пород животных**

Направление подготовки (специальность) 36.04.02 «Зоотехния»

**Профиль образовательной программы «Разведение, селекция, генетика и
воспроизводство сельскохозяйственных животных»**

Форма обучения магистр

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	4
1.1 Лекция № Л 1 Введение. Понятие о генетических маркерах и ДНК-технологиях. (2 ч.) (в инт. форме)	
1.2 Лекция № Л 2 Воспроизводство материала наследственности. Полуконсервативный синтез ДНК. (2 ч.) (в инт. форме)	
1.3 Лекция № Л 3 Молекулярно-генетические маркеры на основе полиморфизма ДНК. Полимеразная цепная реакция. (2 ч.)	
1.4 Лекция № Л 4 Организация и картирование геномов сельскохозяйственных животных. (2 ч.)	
2. Методические указания по выполнению лабораторных работ	12
2.1 Лабораторная работа № ЛР 1 Строение и репликация нуклеиновых кислот. (2 ч.) (в инт. форме)	
2.2 Лабораторная работа № ЛР 2 Моделирование генных мутаций. (2 ч.)	
2.3 Лабораторная работа № ЛР 3 Определение частот фенотипов, генотипов и аллелей. (2 ч.)	
2.4 Лабораторная работа № ЛР 4 Полимеразная цепная реакция. Методы и техника проведения. (2 ч.)	
3. Методические указания по проведению практических занятий	15
3.1 Практическое занятие № ПЗ 1 Значение ДНК-технологий в животноводстве. (2 ч.) (в инт. форме)	
3.2 Практическое занятие № ПЗ 2 Организация молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты. Генетический код. Гены. (2 ч.) (в инт. форме)	
3.3 Практическое занятие № ПЗ 3 Моделирование синтеза белка. (2 ч.) (в инт. форме)	
3.4 Практическое занятие № ПЗ 4 Реализация генетической информации. Транскрипция и трансляция. (2 ч.) (в инт. форме)	
3.5 Практическое занятие № ПЗ 5 Изменчивость материала наследственности (трандукция, прыгающие генетические элементы, природная генная инженерия плазмид). (2 ч.)	
3.6 Практическое занятие № ПЗ 6 Особенности наследования полиморфных систем белков. (2 ч.)	

3.7 Практическое занятие № ПЗ 7 Выявление генетических вариантов белков молока путем электрофореза. (2 ч.) (в инт. форме)

3.8 Практическое занятие № ПЗ 8 Методы определения групп крови. (2 ч.)

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1 Лекция № 1 (2 часа)

Тема: Введение. Понятие о генетических маркерах и ДНК-технологиях. (2 ч.) (в инт. форме)

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Понятие о маркерных генах (сигнальных генах). Основные требования к маркерным генам.
2. Классификация маркерных генов

1.1.2 Краткое содержание вопросов

1. Понятие о маркерных генах (сигнальных генах). Основные требования к маркерным генам.

Селекция (от латинского *selectio* – выбор, отбор) – наука, изучающая основанные на генетических закономерностях методы воздействия на животных для создания, поддержания и совершенствования путем улучшения наследственных качеств специализированных групп (пород, отродий, линий и семейств). Сам термин, пришедший из английского языка (*selection*), не вполне удачен, так как отражает лишь одну сторону процесса генетического улучшения животных – отбор. Второй термин – разведение (*breeding*), закрепившийся в качестве названия родственной селекции науки, также не отражает всей полноты явления.

Более того, обе эти научные дисциплины являются составными частями одной, а именно прикладной генетики животных. В условиях современности, когда в практику животноводства внедряются методы не только классической, но и молекулярной генетики, термин прикладная генетика был бы наиболее уместен. Однако, отдавая дань традиции, мы будем придерживаться термина селекция и его производных, не забывая о генетической основе селекционных процессов.

Каждый признак развивается под влиянием многих генов, взаимодействующих на уровне организма. Отсюда возникают различные изменения в соотношении фенотипов во втором поколении, и даже появляется проявление нового признака в первом. Впервые возможность такого явления была отмечена Г. Менделем, наблюдавшим отклонение от расщепления 3:1 при скрещивании сортов фасоли с белыми и пурпурными цветами. Г. Мендель объяснил это тем, что окраска цветков складывается из двух или нескольких совершенно самостоятельных красок, которые в отдельности подчиняются тем же правилам, что и любой контрастный признак у растений.

2. Классификация маркерных генов

Можно выделить 2 группы маркерных генов, позволяющие отличить трансформированные клетки:

1. Селективные гены, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.), гербицидам (у растений). Это могут быть гены ауксотрофности по какому-либо субстрату и т.д. Основной принцип работы такого маркера – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток.

2. Репортерные гены, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано.

Чаще всего в качестве репортерных используются гены β -глюкуронидазы (GUS), зеленого флюоресцентного белка (GFP), люциферазы (LUC), хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT). К настоящему времени из этого арсенала наиболее часто используют гены GUS и GFP и, в меньшей степени, LUC и CAT. Используемый в настоящее время как репортерный ген GUS является модифицированным геном из *Escherichia coli*, кодирующим β -глюкуронидазу с молекулярной массой 68 кД. GUS активен в широком диапазоне условий среды с оптимумом при pH 5-8 и 37°C. Он может гидролизовать обширный спектр природных и синтетических глюкуронидов, что позволяет подбирать соответствующие субстраты для спектрофотометрического или флуориметрического определения активности фермента, а также для гистохимического окрашивания тканей *in situ* (например, в синий цвет). Фермент достаточно стабилен: он устойчив к нагреванию (время полужизни при 55°C составляет около 2 ч) и к действию детергентов. В процессе замораживания-оттаивания потери активности GUS не происходит. В составе химерных белков, созданных генно-инженерными методами, GUS обычно сохраняет свою функциональную активность. В живых клетках белок GUS также весьма стабилен и активен от нескольких часов до нескольких суток.

GFP (green fluorescent protein - зеленый флюоресцентный белок, или белок зеленой флюоресценции) был обнаружен Shimomura с соавт. в 1962 г. у люминесцирующей медузы *Aequorea victoria*. Ген GFP был клонирован в 1992 г. Prasher и соавт., и уже через несколько лет началось активное использование этого гена как репортерного в работах с самыми разными про- и эукариотическими организмами. В настоящее время ген GFP применяется в сотнях работ во всем мире, и число их стремительно нарастает. Столь быстрый рост вызван особыми свойствами белка GFP, а именно его способностью флюоресцировать в видимой (зеленой) области спектра при облучении длинноволновым УФ. Эта флюоресценция обусловлена непосредственно белком, для ее проявления не требуется субстратов или кофакторов. Благодаря этому свойству ген GFP является очень перспективным репортерным геном, позволяющим проводить разнообразные прижизненные (недеструктивные) исследования с трансгенными организмами.

1.2 Лекция № 2 (2 часа)

Тема: Воспроизводство материала наследственности. Полуконсервативный синтез ДНК. (2 ч.) (в инт. форме)

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Клеточный цикл. Биосинтез ДНК – репликация генов.
2. Доказательство способности ДНК-полимеразы синтезировать копии.
3. Энзимология репликации.

1.2.2 Краткое содержание вопросов

1. Клеточный цикл. Биосинтез ДНК - репликация генов.

Реплика́ция (от лат. *replicatio* - возобновление) - процесс синтеза дочерней молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты на матрице родительской молекулы ДНК. В ходе последующего деления материнской клетки каждая дочерняя клетка получает по одной копии молекулы ДНК, которая является идентичной ДНК исходной материнской клетки. Этот процесс обеспечивает точную передачу генетической информации из поколения в поколение. Репликацию ДНК осуществляет сложный ферментный комплекс, состоящий из 15-20 различных белков, называемый реписомой.

2. Доказательство способности ДНК-полимеразы синтезировать копии.

Репликация ДНК - ключевое событие в ходе деления клетки. Принципиально, чтобы к моменту деления ДНК была реплицирована полностью и при этом только один раз. Это обеспечивается определёнными механизмами регуляции репликации ДНК. Репликация проходит в три этапа:

- инициация репликации
- элонгация
- терминация репликации.

Регуляция репликации осуществляется в основном на этапе инициации. Это достаточно легко осуществимо, потому что репликация может начинаться не с любого участка ДНК, а со строго определённого, называемого сайтом инициации репликации. В геноме таких сайтов может быть как всего один, так и много. С понятием сайта инициации репликации тесно связано понятие репликон. Репликон - это участок ДНК, который содержит сайт инициации репликации и реплицируется после начала синтеза ДНК с этого сайта. Геномы бактерий, как правило, представляют собой один репликон, это значит, что репликация всего генома является следствием всего одного акта инициации репликации. Геномы эукариот (а также их отдельные хромосомы) состоят из большого числа самостоятельных репликонов, это значительно сокращает суммарное время репликации отдельной хромосомы. Молекулярные механизмы, которые контролируют количество актов инициации репликации в каждом сайте за один цикл деления клетки, называются контролем копийности. В бактериальных клетках помимо хромосомной ДНК часто содержатся плазмиды, которые представляют собой отдельные репликоны. У плазмид существуют свои механизмы контроля копийности: они могут обеспечивать синтез как всего одной копии плазмиды за клеточный цикл, так и тысяч копий.

Репликация начинается в сайте инициации репликации с расплетания двойной спирали ДНК, при этом формируется репликационная вилка - место непосредственной репликации ДНК. В каждом сайте может формироваться одна или две репликационные вилки в зависимости от того, является ли репликация одно- или двунаправленной. Более распространена двунаправленная репликация. Через некоторое время после начала

репликации в электронный микроскоп можно наблюдать репликационный глазок — участок хромосомы, где ДНК уже реплицирована, окружённый более протяжёнными участками нереплицированной ДНК[1].

В репликационной вилке ДНК копирует крупный белковый комплекс (реписома), ключевым ферментом которого является ДНК-полимераза. Репликационная вилка движется со скоростью порядка 100 000 пар нуклеотидов в минуту у прокариот и 500—5000 - у эукариот

3. Энзимология репликации.

Модель Уотсона-Крика даёт общее молекулярное описание структуры и функции генов, предполагает принцип репликации генетического материала. Доказательство полуконсервативного механизма репликации ДНК заставило по-новому взглянуть на основные характеристики двойной спирали Уотсона—Крика. Для того чтобы понять, как работает полуконсервативный механизм репликации, необходимо ответить на ряд вопросов: как разделяются комплементарные нити ДНК, закрученные одна вокруг другой? Какая ферментативная система воспроизводит ДНК с учётом антипараллельности ее цепей и др.

Первый обнадеживающий результат на пути к пониманию ферментативного механизма репликации ДНК был получен А. Корнбергом (отцом) в 1956 г., когда он выделил из клеток бактерии *E. coli* фермент ДНК-полимеразу. Этот фермент осуществлял синтез ДНК при наличии в реакционной смеси всех четырёх дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.

В такой реакции количество ДНК увеличивалось в 20 раз по сравнению с внесённым изначально. По своему нуклеотидному составу вновь синтезированная ДНК неотличима от исходной. Реакция полностью зависела от присутствия всех четырёх дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Казалось бы, осуществлена репликация ДНК *in vitro*. Однако если в реакции А. Корнберга использовали трансформирующую ДНК, то ее трансформирующая активность в результате реакции не возрастала.

1.3 Лекция № 3 (2 часа)

Тема: Молекулярно-генетические маркеры на основе полиморфизма ДНК. Полимеразная цепная реакция. (2 ч.)

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Молекулярно-генетические маркеры на основе полиморфизма ДНК.
2. История открытия ПЦР.
3. Полимеразная цепная реакция.

1.3.2 Краткое содержание вопросов

1. Молекулярно-генетические маркеры на основе полиморфизма ДНК.

Развитие методов биохимии, молекулярной биологии и генетической инженерии позволяет подходить к оценке таких явлений как пострадиационный мутационный процесс и радиационно-индуцированная нестабильность генома с точки зрения оценки изменения молекулярно-генетических показателей. В последние годы постоянно увеличивается количество работ, посвященных оценке изменения варибельности маркеров полиморфизма ДНК у потомства облученных родителей. Маркеры полиморфизма ДНК, такие как микро- (МКС) и минисателлитные локусы (МНС), ДНК Y-хромосомы, митохондриальная ДНК имеют ряд характеристик, которые делают их более удобными для изучения радиационно-генетических эффектов [Алтухов, Салменкова, Курбатова и др., 2004]. Наибольший интерес исследователей в области изучения генетических эффектов радиации привлекают мини- и микросателлитные локусы. Помимо радиационного фактора, была показана индукция мутационного процесса в МКС и МНС при воздействии химических мутагенов, а так же вследствие оксидативного стресса, вызываемого действием перекиси водорода [Yauk, Quinn, 1996; Jackson, Loeb, 2000]. Появление относительно простых и быстрых методов работы с ДНК позволило выявить в начале 90-х годов взаимосвязь повышенной варибельности микросателлитных локусов и онкологических заболеваний. Следствием изучения корреляции онкологических заболеваний и индуцированной изменчивости микросателлитных локусов стало введение в научную практику нового термина - микросателлитная нестабильность [Peltomaki, Lothe et al., 1993; Loeb, 1994; Безлепкин, Газиев, 2001].

Использование МКС и МНС для изучения генетических последствий облучения дает целый ряд преимуществ перед традиционными методами. К

7 примеру, за счет повышенной частоты спонтанных мутаций, для исследований не требуется значительного числа животных в экспериментальных группах. Большая часть исследований в этой области посвящена изучению генетических последствий малых доз облучения, то есть до 0,2 Гр [UNSCEAR, 1999]. Целый ряд работ Dubrova и соавторов показывает передающееся по наследству увеличение варибельности минисателлитных локусов в результате воздействия ионизирующих излучений в различных дозах, как на модельные объекты, так и на человека [Dubrova et al., 1996, 1998, 2000, 2002].

Диапазон доз от 0,5 до 1 Гр и выше охвачен молекулярно-генетическими исследованиями в значительно меньшей степени. Вопрос о закономерностях радиационной индукции полиморфизма ДНК при воздействиях средних и больших доз ИИ и связи такой индукции с нестабильностью генома остается открытым. Boyd и соавторы, изучая зависимость «доза-эффект» для частоты мутаций в мини- и микросателлитных локусах в клетках линии UVW, показали, что при воздействии у - радиации в дозах 1 - 3 Гр наблюдается достоверное увеличение частоты мутаций с увеличением дозы облучения [Boyd, Livingstone, Wilson et al., 2000].

2. История открытия ПЦР.

В начале 1970-х годов норвежскому ученому Хьеллю Клеппе (Kjell Kleppe) из лаборатории нобелевского лауреата Хара Гобинды Хораны (Har Gobind Khorana) пришла в голову мысль, что можно амплифицировать ДНК с помощью пары коротких одноцепочечных молекул ДНК — синтетических праймеров. Однако в то время эта идея осталась невостребованной. Полимеразная цепная реакция была вновь открыта в 1983 году Кэри Маллисом (Kary Mullis). Его целью было создание метода, который бы позволил амплифицировать ДНК в ходе многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы. Через 7 лет после опубликования этой идеи, в 1993 г., Маллис получил за неё Нобелевскую премию.

В начале использования метода после каждого цикла нагревания — охлаждения приходилось добавлять в реакционную смесь ДНК-полимеразу, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спирали ДНК. Процедура была очень неэффективной, требовала много времени и фермента. В 1986 г. она была существенно улучшена. Было предложено использовать ДНК-полимеразы из термофильных бактерий. Эти ферменты оказались термостабильными и были способны выдерживать множество циклов реакции. Их использование позволило упростить и автоматизировать проведение ПЦР. Одна из первых термостабильных ДНК-полимераз была выделена из бактерий *Thermus aquaticus* и названа Таq-полимеразой. Недостаток этой полимеразы заключается в том, что вероятность внесения ошибочного нуклеотида у неё достаточно высока, так как у этого фермента отсутствуют механизмы исправления ошибок (3'→5' экзонуклеазная активность). Полимеразы Pfu и Pwo, выделенные из архей, обладают таким механизмом, что, их использование значительно уменьшает число мутаций в ДНК, но скорость их работы (процессивность) ниже, чем у Таq. Сейчас применяют смеси Таq и Pfu, чтобы добиться одновременно высокой скорости полимеризации и высокой точности копирования.

3. Полимеразная цепная реакция.

Полимеразная цепная реакция — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты в биологическом материале. Такой процесс увеличения числа копий ДНК называется амплификацией. Копирование ДНК при ПЦР осуществляется специальным ферментом — полимеразой. ДНК-полимераза (Рис. 3) — фермент, участвующий в репликации (амплификации ДНК в живых организмах) ДНК. Ферменты этого класса катализируют полимеризацию дезоксирибонуклеотидов вдоль цепочки нуклеотидов ДНК, которую фермент «читает» и использует в качестве шаблона. Тип нового нуклеотида определяется по принципу комплементарности с шаблоном, с которого ведется считывание.

Рисунок 3. ДНК-полимераза.

ДНК-полимераза добавляет свободные нуклеотиды к 3'-концу собираемой цепочки. Это приводит к удлинению цепочки в направлении 5'-3'. Ни одна из известных ДНК-полимераз не способна создать цепочку «с нуля»: они в состоянии лишь добавлять нуклеотиды к уже существующей 3'-гидроксильной группе. По этой причине ДНК-полимераза нуждается в праймере — короткой последовательности нуклеотидов (чаще 20-25), комплементарной концевым участкам изучаемого гена — к которому она могла бы добавить первый нуклеотид. Праймеры состоят всегда из оснований ДНК и РНК, при этом первые два основания всегда РНК-основания. Праймеры синтезируются другим ферментом — праймазой. Еще один фермент — геликаза — необходим для раскручивания двойной спирали ДНК с формированием одноцепочечной структуры, которая

обеспечивает репликацию обеих цепочек в соответствии с полуконсервативной моделью репликации ДНК.

Некоторые ДНК-полимеразы обладают также способностью исправлять ошибки во вновь собираемой цепочке ДНК. Если происходит обнаружение неправильной пары нуклеотидов, ДНК-полимераза откатывается на один шаг назад, исключает из неправильный нуклеотид из цепочки, затем вставляет на его место правильный, после чего репликация продолжается в обычном режиме.

1.4 Лекция № 4 (2 часа)

Тема: Организация и картирование геномов сельскохозяйственных животных. (2 ч.)

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Повторяющиеся последовательности ДНК.
2. Организация картирования.

1.4.2 Краткое содержание вопросов

1. Повторяющиеся последовательности ДНК.

Повторяющиеся последовательности ДНК - сателлитная ДНК. Обращенные повторы. Умеренные и низкокопийные повторы.

Сателлитная ДНК - это класс высокоповторяющихся последовательностей, составляющих около 10% всего генома человека [Као Ф.-Т., 1985]. При центрифугировании геномной ДНК в градиенте плотности хлористого цезия эти последовательности образуют четыре отдельных сателлитных пика с различными средними значениями плавучей плотности. Методом гибридизации *in situ* показано присутствие сателлитной ДНК преимущественно в центромерных, теломерных и гетерохроматиновых районах большинства хромосом, при этом характер гибридизации сходен для всех четырех групп и не зависит от принадлежности ДНК-зондов к семействам повторов, образующих различные сателлитные пики. В каждой из этих групп, однако, присутствует небольшое количество последовательностей, имеющих специфическую хромосомную локализацию. Так, например, около 40% длинного плеча Y-хромосомы составляет семейство последовательностей, tandemно повторяющихся более 3000 раз и не найденных в других хромосомах. Выделяют три основных типа сателлитной ДНК:

- короткие - от 2 до 20 п.о., стабильные tandemные повторы с кратностью в несколько десятков тысяч раз, которые иногда перемежаются с неповторяющимися последовательностями;

- кластеры более протяженных повторов, слегка различающихся по нуклеотидной последовательности;

- сложные, достигающие нескольких сотен пар нуклеотидов, повторяющиеся последовательности различной степени гомологии [Газарян К.Г., Тарантул В.З., 1983].

К последнему типу относятся альфа-сателлитные, или альфоидные, ДНК, среди которых найдено много хромосом-специфических последовательностей. Размеры повторяющихся «коровых» единиц альфоидной ДНК составляют около 170-200 п.о. В геноме человека и других приматов эти мономеры организованы в кластеры по 20 и более «Кировых» единиц. После расщепления рестриктазой BamHI в альфоидной ДНК выявляется серия фрагментов длиной около 2000 п.о., в составе которых обнаруживаются альфоидные последовательности, специфичные для гетерохроматиновых районов разных хромосом человека (1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 17, 19, X). В некоторых случаях эти повторы

гомологичны двум разным хромосомам (9 и 15, 13 и 21, 18 и X) [Willard H.F., Waye J.S., 1987]. Хромосом-специфические последовательности сателлитной альфоидной ДНК нашли широкое применение в молекулярной цитогенетике в качестве ДНК-зондов, удобных для маркирования индивидуальных хромосом в метафазных и интерфазных клетках человека [Юров Ю.Б., 1987]. Предполагается, что сателлитные ДНК играют важную роль в поддержании структур хромосом и, возможно, в их спаривании в процессе мейоза.

Если обратиться непосредственно к анализу первичной структуры генов, то оказывается, что в них встречаются так называемые несовершенные повторы нуклеотидных последовательностей. Несовершенные повторы — это сходные нуклеотидные последовательности в гене, встречающиеся достоверно чаще, чем можно ожидать на основе предположения о случайном совпадении. Повторы могут быть прямыми, инвертированными и комплементарными палиндромами (рис. 19.9). в. А. Ратнер с сотрудниками разработал программу для компьютерного поиска таких повторов и обнаружил их в ряде генов про- и эукариот.

В понятие первичной структуры нуклеиновых кислот наряду с нуклеотидным составом входит нуклеотидная последовательность, т. е. порядок чередования нуклеотидных звеньев. Общий подход к установлению последовательности нуклеотидных звеньев заключается в использовании блочного метода сначала полинуклеотидную цепь направленно расщепляют на более мелкие блоки (олигомеры) и в них определяют нуклеотидную последовательность. Такой анализ повторяют, используя другие расщепляющие агенты, делящие цепь на фрагменты в иных местах по сравнению с предыдущими приемами. В целом полинуклеотидную цепь расщепляют каждый раз на довольно короткие фрагменты.

Обратная транскрипция и интеграция ДНК-копии ретровирусного генома в хромосому. А. Структура ретровирусного одноцепочечного РНК-генома. Как и в случае клеточных мРНК, на 5'-конце вирусной РНК находится кэп, 3'-конец полиаденилирован. Повторы нуклеотидной последовательности, расположенные на концах генома, отмечены символом К. Две уникальные нуклеотидные последовательности, расположенные у 5'- и 3'-конца РНК (115 и и3 соответственно), при образовании двухцепочечной ДНК-копии, которое направляется обратной транскриптазой, объединяются

Слово палиндром используется в биохимической генетике для обозначения участков эукариотической ДНК, в которых обнаруживаются обращенные повторы нуклеотидных последовательностей с осевой симметрией второго порядка, напоминающие короткие последовательности, узнаваемые рестриктирующими эндонуклеазами.

Итак, мы еще не доказали, что зависимость таких различных оперонов от белка БАК неизбежно отражает общий способ регуляции на уровне индивидуальных взаимодействий типа белок-белок или белок-ДНК. Однако такой тип регуляции достигает одной и той же цели выключения альтернативных метаболических путей, если они становятся необязательными при снабжении клетки нужными количествами глюкозы. Снова это свидетельствует о том, что координированный контроль положительного или отрицательного типов может распространяться на ряд локусов, локализованных в разных участках, благодаря наличию повторов нуклеотидных последовательностей в сайтах, связывающих регуляторный белок.

2. Организация картирования.

В 90-е годы метод гибридизации получил развитие в модификациях: FISH (гибридизация с использованием флюоресцентной метки) и PRINS (метод, сочетающий гибридизацию на метафазных хромосомах специфических праймеров с последующей ПЦР, включающей меченый биотином нуклеотид в продукт амплификации). Этот подход стал основным методом для построения цитогенетических карт.

Разрешение этого метода составляет от 1 до 3 млн.п.н., поэтому гибридизация является методом картирования с низким уровнем разрешения.

Среди цитогенетических методов большое распространение получил метод картирования геномов млекопитающих с помощью гибридов соматических клеток, с которым связан первый прорыв на пути построения карт генома человека и успехи клеточной биологии. В 70-ым годам была разработана техника экспериментального конструирования способных к размножению межвидовых клеточных гибридов. Гибридные клоны получают путем искусственного слияния культивируемых соматических клеток разных видов, в частности клеток человека и различных грызунов: китайского хомячка, мыши, крысы. Гибридные клетки, значительно превосходящие по своим размерам исходные родительские клетки, оказываются способны не только переживать в условиях культивирования, но и размножаться. Однако размножение этих тетраплоидных гибридов, как оказалось, сопровождается утратой хромосом, причем в первую очередь элиминируются хромосомы человека.

Так были получены панели гибридных клеточных клонов, содержащих всего одну или несколько хромосом человека и полный набор хромосом другого вида. Обнаружение белков человека, специфических мРНК или последовательностей ДНК в таких клонах позволяет определить хромосомную принадлежность соответствующих генов. Техника соматической гибридизации явилась одним из наиболее мощных инструментов для нахождения связей между группами сцепления и цитогенетически идентифицируемыми хромосомами и даже их отдельными сегментами. Таким способом удалось локализовать сотни аутосомных генов.

Соматические гибриды спонтанного происхождения были получены в 1960 году, с тех пор развитие работ по гибридам соматических клеток шло по следующим направлениям: 1) поиск безопасных, удобных и эффективных агентов для слияния клеток; 2) создание селективных систем, позволяющих выделять гибриды соматических клеток; 3) изучение феномена сегрегации хромосом, направления и степени, а также возможности направленной сегрегации в соматических гибридах; 4) использование гибридов соматических клеток для создания хромосомных карт млекопитающих.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа № 1 (2 часа)

Тема: Строение и репликация нуклеиновых кислот. (2 ч.) (в инт. форме)

2.1.1 Цель работы: Изучить строение нуклеиновых кислот

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить строение нуклеиновых кислот
2. Основные достижения биохимии в изучении белков. Роль аминокислот в организме, их классификация по характеру углеводородного радикала и полярности. Структурные формулы основных аминокислот.

3. Белки – важнейшие компоненты организма, функции белков, классификация. Написание структурных формул пептидов: выделять регулярно повторяющиеся группы, образующие пептидный остов, и переменные группы, представленные радикалами аминокислот, обозначать N- и C- конец.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Персональный компьютер
2. Презентация

2.2 Лабораторная работа № 2 (2 часа)

Тема: Моделирование генных мутаций. (2 ч.)

2.2.1 Цель работы: Изучить основы моделирования генных мутаций

2.2.2 Задачи работы:

1. Мутации типа замены пар оснований, например, А-Т на Г-Ц,
2. Мутации типа выпадения или вставки оснований.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Персональный компьютер
2. Презентация.

2.3 Лабораторная работа № 3 (2 часа)

Тема: Определение частот фенотипов, генотипов и аллелей. (2 ч.)

2.3.1 Цель работы: Изучить методику определения частот фенотипов, генотипов и аллелей.

2.3.2 Задачи работы:

1. Изучить методику определения частот фенотипов, генотипов и аллелей.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Персональный компьютер
2. Презентация

2.4 Лабораторная работа № 4 (2 часа)

Тема: Полимеразная цепная реакция. Методы и техника проведения. (2 ч.)

2.4.1 Цель работы: Изучить полимеразную цепную реакцию. Методы и технику проведения

2.4.2 Задачи работы:

1. Ознакомиться с методикой ПЦР
2. Изучить этапы ПЦР
3. Сделать выводы по практическому использованию ПЦР
4. Изучить ПЦР в реальном времени
5. Детекция результатов ПЦР

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Персональный компьютер
2. Презентация

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

3.1 Практическое занятие № 1 (2 часа)

Тема: Значение ДНК-технологий в животноводстве. (2 ч.) (в инт. форме)

3.1.1 Задание для работы:

1. Изучить методы использования ДНК-технологий
2. Охарактеризовать сложности применения ДНК-технологий
3. Составление ДНК паспорта племенного скота

3.1.2 Краткое описание проводимого занятия:

Изучение направлений по использованию ДНК-технологий в животноводстве:

- диагностика генетических заболеваний;
- изучение генетических механизмов развития и предупреждения различных заболеваний;
- использование генетических маркеров в селекции;
- выявление инфицированности животных различными патогенами.

3.2 Практическое занятие № 2 (2 часа)

Тема: Организация молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты. Генетический код. Гены. (2 ч.) (в инт. форме)

3.2.1 Задание для работы:

1. Изучить организацию молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты.
2. Изучить генетический код и гены репрессирующие хозяйственно-полезные признаки.

3.2.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Изучить организацию молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты.
2. Изучить генетический код и гены репрессирующие хозяйственно-полезные признаки.

3.3 Практическое занятие № 3 (2 часа)

Тема: Моделирование синтеза белка. (2 ч.) (в инт. форме)

3.3.1 Задание для работы:

1. Изучить этапы транскрипции:

а. Инициация. Происходит активирование и кодирование аминокислот. Т-РНК имеет вид клеверного листа, в центральной петле которого располагается триплет – антикодон, соответствующий коду определенной аминокислоты и кодону на и-РНК. Каждая аминокислота соединяется с соответствующей т-РНК за счет энергии АТФ. Образуется комплекс т-РНК – аминокислота, который поступает на рибосомы.

б. Элонгация. И-РНК в цитоплазме соединяется с рибосомами на гранулярной ЭПС (эндоплазматическая сеть), образуется комплекс и-РНК – рибосома. Т-РНК с аминокислотами по принципу комплементарности антикодона с кодоном соединяются с и-РНК и входят в рибосому. В пептидном центре рибосомы между двумя аминокислотами образуется пептидная связь, а освободившаяся т-РНК покидает рибосому.

в. Терминация. Синтез заканчивается, когда на и-РНК начинаются бессмысленные кодоны (стоп-коды). Рибосомы отделяются от и-РНК, с них снимаются полипептидные эндоплазматические сети. Так как весь процесс синтеза протекает на гранулярной эндоплазматической сети, то образовавшиеся полипептидные цепи поступают в канальца ЭПС, где приобретают окончательную структуру и превращаются в молекулу белка.

3.5.2 Краткое описание проводимого занятия:

Построение моделей синтеза белка и решение задач.

3.4 Практическое занятие № 4 (2 часа)

Тема: Реализация генетической информации. Транскрипция и трансляция. (2 ч.) (в инт. форме)

3.4.1 Задание для работы:

1. Изучить молекулярную структуру и свойства нуклеиновых кислот, хромосом, стадии биосинтеза белка, принципы регуляции генной активности.
2. Овладеть решением генетических задач с использованием генетического кода.
3. Усвоить закономерности репродукции клеток, размножения организмов и явлений наследственности и изменчивости.

3.4.2 Краткое описание проводимого занятия:

Записать в словарь генетические термины: Аминоациальный центр, антикодон, генетический код, геном, инициация, интрон, кодон, коллинеарность, комплементарность, лигаза, модификация, нуклеоид, пептитидильный центр, полимер, полимеразы, промотор, процессинг, ревертаза, репликация, репликон, рестриктаза, сайт, сплайсинг, терминация, трансдукция, транскрипция, трансляция, трансформация, ферменты Оказаки, хроматин, цистрон, экзон, элонгация.

3.5 Практическое занятие № 5 (2 часа)

Тема: Изменчивость материала наследственности (трансдукция, прыгающие генетические элементы, природная генная инженерия плазмид). (2 ч.)

3.5.1 Задание для работы:

1. Знать механизмы наследования генов, локализованных в одной хромосоме и образующих группу сцепления
2. Научиться моделировать механизмы для правильного прогнозирования проявления признаков в потомстве; распределять генотипов и фенотипов в потомстве при сцепленном наследовании и кроссинговере; решать задачи на сцепление генов и кроссинговер;

3.5.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Изучаются механизмы наследования генов, локализованных в одной хромосоме и образующих группу сцепления
2. Моделирование механизмов прогнозирования проявления признаков в потомстве; распределять генотипов и фенотипов в потомстве при сцепленном наследовании и кроссинговере; решение задачи на сцепление генов и кроссинговер;

3.6 Практическое занятие № 6 (2 часа)

Тема: Особенности наследования полиморфных систем белков. (2 ч.)

3.6.1 Задание для работы:

1. Изучить метод изучения полиморфизма белков и ферментов – электрофорез в крахмальном или полиакриламидном геле.

3.6.2 Краткое описание проводимого занятия:

У сельскохозяйственных животных изучено более 150 полиморфных локусов белков крови, молока, слюны и других веществ организма. Аллели, например гемоглобинового локуса, обозначают следующим образом: Hb^A, Hb^B, Hb^C и т.д., а генотипы $-Hb^A Hb^A, Hb^B Hb^B$ или $Hb^{A/A}, Hb^{B/B}$. В связи с кодоминантным наследованием большинства биохимических полиморфных систем фенотип животного соответствует его генотипу.

3.7 Практическое занятие № 7 (2 часа)

Тема: Выявление генетических вариантов белков молока путем электрофореза. (2 ч.)
(в инт. форме)

3.7.1 Задание для работы:

1. Изучить методику электрофореза
2. Изучить генетических вариантов белков молока

3.7.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Изучить методику электрофореза
2. Изучить генетических вариантов белков молока

3.8 Практическое занятие № 8 (2 часа)

Тема: Методы определения групп крови. (2 ч.)

3.8.1 Задание для работы:

1. Понятие о группах крови и резус-факторе.
2. Показания и противопоказания к переливанию крови.
3. Изучить методику определения групповой и резус - принадлежности крови. Ошибки при определении групп крови по системе АВ0 и Rh-фактору.
4. Проведение проб на индивидуальную совместимость крови донора и реципиента по АВ0-системе, по резус-фактору и на биологическую совместимость.

3.8.2 Краткое описание проводимого занятия:

Изучение групп крови и резус-фактор и практическое применение их.

Определение групповой и резус - принадлежности крови. Изучаются ошибки при определении групп крови по системе АВ0 и Rh-фактору. Проведение проб на индивидуальную совместимость крови донора и реципиента по АВ0-системе, по резус-фактору и на биологическую совместимость.

3.8.3 Результаты и выводы: По всем занятиям делаются письменные выводы.

Ключевые слова записываются в словарь терминов.