

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**  
**УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**Н.Н. Скворцова**

**ОСНОВЫ**  
**ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ**  
**Учебно-методическое пособие**

 **УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**Санкт-Петербург**

**2015**

УДК 577.21

**Скворцова Н.Н.** Основы генетической инженерии. Учеб.-метод. пособие. – СПб.: Университет ИТМО; ИХиБТ, 2015. – 58 с.

Приведены содержание дисциплины «Основы генетической инженерии», указания для самостоятельной работы и варианты контрольных работ. Даны рекомендации по изучению разделов дисциплины, список рекомендованной литературы, электронных ресурсов и кодов доступа к ресурсам сети Интернет для углубленного изучения дисциплины. Приложения содержат иллюстрации к некоторым понятиям разделов, схемы матричных синтезов, лежащих в основе поддержания жизни, а также краткое описание отдельных методов.

Предназначено для бакалавров направления 19.03.01 Биотехнология всех форм обучения и магистрантов направлений 19.04.02 и 19.04.03.

**Рецензент: доктор техн. наук, проф. Л.А. Забодалова**

**Рекомендовано к печати редакционно-издательским советом Института холода и биотехнологий**

 **УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**Университет ИТМО** – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 – 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 2015

© Скворцова Н.Н., 2015

## ВВЕДЕНИЕ

*Генетическая инженерия* возникла на стыке многих биологических дисциплин: молекулярной биологии, генетики, энзимологии, химической инженерии, клеточной биологии, микробиологии и др. Формально 1972 г. следует считать датой рождения генетической инженерии: в лаборатории П. Берга была получена первая рекомбинантная ДНК.

Генетическая инженерия – ветвь молекулярной генетики, исследующая возможности и способы создания лабораторным путем (*in vitro*) генетических структур и наследственно измененных организмов, т. е. создания искусственных генетических программ (рекомбинантные ДНК), с помощью которых направленно конструируются молекулярные генетические системы вне организма с последующим их введением в живой организм. Технология рекомбинантной ДНК является важной составной частью биотехнологии, поэтому ее часто называют молекулярной биотехнологией.

*Рекомбинантные ДНК* – молекулы ДНК, полученные вне живой клетки путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами, способными реплицироваться в клетке.

История собственно генетической инженерии насчитывает уже более 30 лет. Ее дальняя предыстория уходит корнями в развитие методов классической генетики. Основную роль в начальный период сыграл количественный анализ, введенный Менделем в 60-е годы прошлого столетия в работы по изучению законов поведения наследственных признаков. Он помог выявить главные генетические закономерности и сформулировать понятие о единице наследственности – гене. Тем не менее вплоть до середины XX столетия генетические методы оставались формальными, так как молекулярная база законов наследственности и материальная природа генов оставались неизвестными.

Предыстория генетической инженерии началась более полувека назад с открытия генетической роли ДНК. Было выяснено строение молекул ДНК и белка. Это привело к формированию *молекулярной генетики*, достижением которой явилось установление того факта, что *гены не только кодируют структуру определенных продуктов (как правило, белков), но и регулируют процесс их синтеза.*

Впоследствии был расшифрован генетический код (1961–1966) и выяснено строение элементов, управляющих действием прокариотических генов и синтезом белков. Эти элементы носят название *промоторов, операторов, сайтов связывания* рибосом, *терминаторов транскрипции и трансляции* и др. и будут рассмотрены при изучении строения генов.

Методы генетической инженерии успешно применяются для решения *фундаментальных проблем*. Решающее значение они имеют для исследования молекулярной структуры *геномов* и *генов*, а также молекулярных механизмов регулирования их экспрессии.

Уже на начальных этапах их применения удалось достичь существенного прогресса при изучении эукариотических организмов. Был установлен факт прерывного строения генов, выявлены мобильные генетические элементы, поняты основные механизмы переключения генов при дифференцировке клеток, определена структура многих *регуляторных элементов* на уровне ДНК, в отдельных случаях выяснены генетические причины злокачественного перерождения клеток и т. д. Генетическая инженерия способствовала становлению новых научных направлений, составляющих базу молекулярной медицины: молекулярной вирусологии, молекулярной онкологии, молекулярной нейрофизиологии и т. д.

Существенных успехов генетическая инженерия достигла и при решении прикладных задач, дав толчок зарождению молекулярной биотехнологии. Уже в конце 70-х годов в клетках кишечной палочки был осуществлен синтез ряда животных и человеческих белков и гормонов — соматостатина, гормона роста. В 1978 г. исследователи из компании "Genentec" впервые получили в специально сконструированном штамме кишечной палочки гормон – инсулин, а с 1984 г. было начато промышленное производство этого необходимого медицинского препарата и в СССР.

При производстве интерферона используют как *E. coli*, *S. cerevisiae* (дрожжи), так и культуру фибробластов или трансформированных лейкоцитов. Аналогичными методами получают также безопасные и дешевые вакцины. В настоящее время список генно-инженерных продуктов включает в себя сотни наименований лекарственных и других полезных препаратов.

Развитию генетической инженерии способствовало постоянное совершенствование биофизической аппаратуры: ультра- и микро-

центрифуг, спектрофотометров, жидкостных сцинтилляционных счетчиков, аминокислотных анализаторов, секвенаторов и синтезаторов пептидов и олигонуклеотидов, различных устройств для хроматографии, гель-электрофореза, полимеразной цепной реакции, радиоиммунного анализа, сканирования гелей и т. д.

Дисциплина **«Основы генетической инженерии»** является частью естественно-научного цикла дисциплин подготовки бакалавров по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология. Необходимыми условиями для освоения дисциплины являются: знание строения и функций генетического аппарата прокариот и эукариот, молекулярно-генетических основ природной и генно-инженерной рекомбинации генома, основных этапов биосинтеза белка в про- и эукариотических клетках, путей получения и путей использования генетически модифицированных организмов (ГМО); умение пользоваться справочной и научно-технической литературой (в том числе на иностранных языках) по биотехнологии и генетической инженерии для мотивированной оценки социальной значимости достижений генетической инженерии микроорганизмов, растений и животных; владение информационными технологиями для работы с базами данных по молекулярной биологии и генетической инженерии.

Содержание дисциплины является логическим продолжением содержания дисциплин Биохимия, Аналитическая химия и ФХМА, Органическая химия, Общая биология и микробиология. Дисциплина реализуется на факультете пищевых технологий НИУ ИТМО кафедрой ОФБХиМ.

Содержание дисциплины охватывает круг вопросов, связанных с изучением комплекса молекулярно-генетических методов, с помощью которых можно создавать искусственные генетические программы (рекомбинантные ДНК), что позволяет сформировать представление о направленном конструировании генетически модифицированных организмов.

Применение методов генетической инженерии опосредованно связано с задачами пищевой промышленности. Генетическая инженерия позволяет улучшать аминокислотный состав белков растений, повышать их устойчивость к фитопатогенам, гербицидам, насекомым, повышать эффективность процесса фотосинтеза. Благодаря трансгенным растениям преодолена одна из глобальных проблем человечества – проблема голода. В животноводстве созданы транс-

генные линии, производящие с молоком необходимые для медицины белки человека в значительных количествах. Генетически модифицированные микроорганизмы обеспечили доступность десятков белковых веществ, лежащих в основе медицинских препаратов для лечения заболеваний человека. Стремительными темпами создаются микроорганизмы с селективными характеристиками для нужд различных направлений биотехнологии биотехнологии. Генетическая инженерия позволяет ускорить темпы исследований в научных областях биологии и медицины.

Преподавание дисциплины предусматривает следующие формы организации учебного процесса: лекции, виртуальные лабораторные работы, домашние задания, самостоятельную работу студента, консультации; для студентов заочного отделения – написание контрольных работ и составление реферата по предлагаемой теме.

Учебно-методическое пособие содержит перечень ключевых понятий по темам. Развитию понятий способствуют источники информации, список которых содержит литературу по дисциплине и коды доступа к Интернет-источникам.

В Приложения вынесены рисунки, отображающие строение нуклеиновых кислот, иллюстрации и схемы матричных синтезов, лежащих в основе поддержания жизни, а также краткое описание некоторых методов, формирующих представления об экспериментальных особенностях работы с нуклеиновыми кислотами.

# 1. СОДЕРЖАНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ И МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

## 1.1. Молекулярные основы наследственности

### 1.1.1. Репликация, сохранение и модификация генома

Молекулы генетического аппарата (приложение 1, рис. 1–5). Репликация ДНК (приложение 1, рис. 6, 7). Репликация РНК с образованием ДНК: обратная транскрипция. Репарация ДНК. Рекомбинация ДНК.

Подвижные генетические элементы (транспозоны). Принципиальное строение бактериального транспозона. Эукариотические транспозоны. Биологическая роль транспозонов: индукция геномных перестроек (делеции и инверсии) и мутаций, перенос генов, клеточная реакция на стресс.

Внехромосомные генетические элементы. Плазмиды. Типы плазмид (кольцевые и линейные плазмиды). Общие свойства и биологическая роль бактериальных плазмид (автономная репликация, интеграция, конъюгация). Способы обеспечения стабильности. Природная генная инженерия плазмид.

Бактериофаги. Генетическая карта и молекулярные аспекты литического цикла развития фаговой частицы. «Липкие» концы (*Cos*-сайты) (приложение 1, рис. 12).

### Основные понятия темы

**Аденин (А)** – пуриновое основание, комплементарное тимину и урацилу. Азотистое основание, входящее в состав ДНК и РНК.

**Антипараллельная ориентация** – противоположная направленность ( $5' \rightarrow 3'$  и  $3' \rightarrow 5'$ ) цепей в двухцепочечных молекулах нуклеиновых кислот.

**ДНК** – полимер дезоксирибонуклеотидов.

**Бактериофаги** (фаги) (от греч. *φάγος* – пожирать) – вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки.

**Гетероциклические основания** – компоненты нуклеиновых кислот. Пуриновые: аденин, гуанин; пиримидиновые: цитозин, урацил, тимин.

**Гуанин (Г, G)** – пуриновое основание, комплементарное цитозину. Одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК и РНК.

**Интроны** – некодирующие последовательности генов эукариот (не представлены в мРНК).

**Комплементарные нуклеотидные последовательности** – полинуклеотидные последовательности, которые взаимодействуют между собой в соответствии с правилами комплементарности оснований: аденин (А) образует пару с тимином (Т) или урацилом (U) в РНК, гуанин (G) – с цитозином (С).

**Лидерная последовательность** – нетранслируемая последовательность мРНК, расположенная между 5'-концом и иницирующим кодоном AUG.

**Лизогенная** – интеграция генома бактериофага в геном клетки-хозяина. В результате индукции фаговая ДНК может выщепляться с образованием зрелых фаговых частиц.

**Литический цикл** – размножение вируса в клетке-хозяине, оканчивающееся лизисом клетки.

**Нуклеотид** – нуклеозид, к которому присоединена одна или более фосфатных групп; присоединение происходит по 5'-углеродному атому сахарного кольца.

**Пиримидины** – один из двух типов азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот. К пиримидинам относятся тимин, цитозин и урацил.

**Пурины** – один из двух типов азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот; к пуринам относятся аденин и гуанин. Второй тип оснований – пиримидины; к ним относятся тимин, урацил и цитозин.

**Структурный ген (Structural gene)** – ген, кодирующий какой-либо белок.

**Ориджин** (англ. *origin* – начало, *сайт ori*) – сайт начала репликации в молекуле ДНК.

**Оказки фрагменты** – относительно короткие фрагменты ДНК (с РНК-праймером на 5'-конце), которые образуются на отстающей цепи в процессе репликации отстающей цепи ДНК.

**Праймер (затравка)** – короткие последовательности РНК (олигорибонуклеотид), образуемые в процессе репликации при участии фермента РНК-праймазы и спаренные с матричной ДНК.

**Плазмиды** – стабильно наследуемые внехромосомные генетические элементы (ДНК), являющиеся обычным компонентом бактериальных клеток. Встречаются также и у низших эукариот.

**Полинуклеотид** – линейный полимер, состоящий из 20 и более нуклеотидов, соединенных друг с другом фосфодиэфирными связями. Полинуклеотидами являются, например, молекулы ДНК и РНК.

**Прокариоты** – одноклеточные организмы, клетки которых не содержат ядра. К прокариотам относятся все бактерии.

**Промотор** – участок молекулы ДНК, с которым связывается РНК-полимераза, что сопровождается инициацией транскрипции соответствующих генов. Обычно находится перед 5'-концом регулируемого гена.

**Репликация** (от лат. *replicatio* – повторение) – это самовоспроизведение нуклеиновых кислот, обеспечивающее точное копирование генетической информации и передачу ее от поколения к поколению.

**Репликационная вилка** – участок ДНК, в которых дуплекс расплетается и одноцепочечные участки связываются дестабилизирующими ДНК-связывающими белками.

**Репликон** – функциональная единица репликации – сегмент (участок) ДНК, ограниченный точкой инициации репликации (сайт *ori*) и точкой окончания, в которой репликация останавливается.

**Репарация** (от лат. *reparatio* – восстановление) – особая функция клеток всех живых организмов, заключающаяся в способности исправлять химические повреждения и разрывы в молекулах ДНК, поврежденной при нормальном биосинтезе ДНК в клетке или в результате воздействия физических (УФ-облучение, радиация) либо химических агентов.

**Ренатурация** – воссоединение цепей двухцепочечной ДНК, разошедшихся при денатурации; восстановление третичной структуры белка.

**Ретровирусы** – группа РНК-содержащих вирусов, содержащих обратную транскриптазу. Синтезированная на РНК-матрице двухцепочечная ДНК может встраиваться в хромосому, инфицированной этим вирусом клетки.

**Рибоза** – пятиуглеродный моносахарид. Входит в состав РНК.

**Сайт “cos”** (*cos*-сайт) – нуклеотидные последовательности (одноцепочечные) на концах генома фага  $\lambda$ , необходимые для упаковки ДНК в фаговые частицы.

**Тимин (Т)** – пиримидиновое основание, одно из четырех оснований, входящих в состав ДНК.

**Транспозоны** – фрагменты ДНК, которые могут менять свое местоположение в геноме. Подвижные (мобильные) генетические элементы (ПГЭ, МГЭ).

**Трансдукция** – перенос ДНК из одной клетки (донор) в другую (реципиент) с помощью бактериофагов.

**Урацил** (У, U) – пиримидиновое основание; одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав РНК.

**Цитозин** (Ц, C) – одно из четырех азотистых оснований, входящее в состав ДНК и РНК.

**Эзоны** – кодирующие последовательности генов эукариот (представлены в мРНК).

**Эукариоты** – одноклеточные или многоклеточные организмы, клетки которых содержат ядро.

### 1.1.2. Структурно-функциональная организация передачи генетической информации

Центральная догма молекулярной биологии. Транскрипция и процессинг РНК у прокариот. ДНК, РНК и синтез белка. Гены прокариот. Строение (опероны, промоторы). Транскрипция (промоторы и терминаторы). Регуляция экспрессии генов прокариот.

Гены эукариот. Строение (экзоны и интроны). Транскрипция: особые модификации мРНК эукариот. Биосинтез белка на рибосомах: трансляция (приложение 1, рис. 8–10). Генетический код (приложение 2). Регуляция экспрессии генов эукариот (энхансеры). Сплайсинг, альтернативный сплайсинг.

### Основные понятия темы

**Ген** – участок ДНК, кодирующий одну полипептидную цепь или одну молекулу тРНК или рРНК. Гены тРНК, рРНК белки не кодируют.

**Гены домашнего хозяйства** – определенный набор генов организма, которые экспрессируются в любых типах клеток и обеспечивают энергетику, дыхание и другие процессы, без которых клетки жить не могут.

**Гены тканеспецифические** – гены, которые работают только в определенных клетках организма и на определенных стадиях его развития (большинство генов).

**Генетический код** – система записи генетической информации в виде последовательности нуклеотидов, в которой каждые три нуклеотида, составляющие кодон, кодируют одну аминокислоту или являются сигналом останова процесса синтеза полипептида. Состоит из 64 кодонов, кодирующих все 20 аминокислот и три терминирующих кодона.

**Генотип** – набор генов организма, которые он получает от своих родителей.

**Геном** – совокупность генов в гаплоидном (одинарном) наборе хромосом.

**Индуктор** – низкомолекулярное вещество, которое приводит к инициации транскрипции.

**Иницирующий кодон** – кодон AUG в составе мРНК, кодирующий метионин (N-формилметионин у прокариот), с которого начинается (иницируется) синтез полипептидных цепей. Другое название – сигнал инициации трансляции.

**Кодон (триплет)** – последовательность из трех нуклеотидов, кодирующая одну аминокислоту. Всего существует 64 сочетания нуклеотидов в кодонах; 61 из них кодирует 20 аминокислот, 3 являются стоп-кодонами

**Коллинеарность** гена и продукта: линейное соответствие последовательности кодонов гена и последовательности аминокислот в белковом продукте (обнаружено в клетках прокариот).

**«Кэп»** – метилированный гуанозин на 5'-конце многих мРНК эукариот.

**Лактозный оперон** – единица транскрипции хромосомной ДНК *E.coli*, состоящая из промотора, оператора, терминатора и последовательностей, кодирующих структуру трех ферментов, участвующих в утилизации дисахарида лактозы. Последовательности промотора, оператора и части структурных последовательностей, кодирующих фермент  $\beta$ -галактозидазу, используют в генетических векторах клонирования и экспрессии для клеток *E.coli*.

**Матричная РНК (мРНК)** – синтезируется на матрице ДНК в процессе транскрипции, после чего, в свою очередь, используется в процессе трансляции как матрица для синтеза белков. Матричная РНК играет важную роль в экспрессии генов.

**Оперон** – совокупность совместно транскрибируемых генов, обычно контролирующая родственные функции в клетках прокариот;

участок ДНК, содержащий несколько структурных генов, транскрибируемых с образованием одной полицистронной мРНК.

**Оператор** – участок ДНК, непосредственно примыкающий к структурному гену и регулирующий его транскрипцию при участии репрессора или активатора.

**Промотор** – сигнал инициации транскрипции, располагается перед кодирующей последовательностью (5'-фланкирующая последовательность). Имеет две консервативные последовательности: для узнавания и для тесного связывания с РНК-полимеразой. Регуляторный участок гена (оперона), к которому присоединяется РНК-полимераза с тем, чтобы начать транскрипцию.

**Процессинг белка** – сворачивание полипептидной цепи белка (фолдинг) и ковалентная химическая модификация белка (посттрансляционная модификация) после его синтеза белка на рибосоме.

**Первичный транскрипт** – молекула РНК, транскрибированная с эукариотического структурного гена и не подвергшаяся процессингу (т.е. содержащая все копии экзонов и интронов).

**Полиаденилирование** – ферментативное присоединение остатков аденина к 3'-концу молекулы эукариотической мРНК. Этот богатый аденином 3'-конец называется поли(А)-хвостом мРНК.

**Процессинг** – совокупность процессов образования зрелых молекул РНК и белков в клетке. Включает ряд последовательных расщеплений молекулы-предшественника эндонуклеазой или протеиназами, а также модификацией в специфических участках полимерной цепи.

**Рамка считывания** – один из трех возможных способов считывания нуклеотидной последовательности в виде триплетов. Открытая рамка считывания не содержит терминирующих кодонов и может транслироваться в белок.

**Регуляторный белок** – белок, «включающий» или «выключающий» транскрипцию.

**Репрессия** – один из двух альтернативных (наряду с индукцией) механизмов регуляции генов. Состоит в подавлении транскрипции или трансляции путем связывания белка-репрессора с оператором.

**Репарация ДНК** – исправление химических повреждений и разрывов в молекуле ДНК, поврежденной при нормальном биосинтезе ДНК в клетке или в результате воздействия физическими или химическими агентами. Осуществляется специальными ферментными системами клетки.

**Репрессор** – белок, связывающийся с оператором или промото-ром данного гена и блокирующий связывание с этими элементами РНК-полимеразы.

**Рибосома** – немембранная клеточная органелла, рибонуклео-протеидная структура, при участии которой осуществляется синтез белка (трансляция). Состоит из двух частиц: большой и малой.

**Реализация генетической информации** – на молекулярном уровне проявляется синтезом определенного белка; на клеточном уровне – функциями данного белка в клетке, образованием определен-ной клеточной структуры; на уровне организма – наличием опреде-ленного фенотипического признака.

**Сплайсинг** – процесс формирования зрелой мРНК путем уда-ления интронов из молекулы пре-мРНК и сшивания экзонов в клетках эукариот.

**Трансляция** – это процесс биосинтеза белка, в результате кото-рого информация с языка последовательности нуклеотидов в мРНК переводится (транслируется) на язык последовательности аминокис-лота в полипептидной молекуле. Трансляция мРНК осуществляется в направлении  $5' \rightarrow 3'$ .

**Транскрипция** (лат. *transcriptio* – переписывание) – это перенос генетической информации с ДНК на РНК, т. е. процесс синтеза РНК с использованием ДНК в качестве матрицы, происходящий во всех живых клетках.

**Транскриптон** – единица транскрипции, участок ДНК ограни-ченный со стороны 3'-конца *промотором*, со стороны 5'-конца – *тер-минаторной последовательностью*.

**Транскрипция обратная** – синтез ДНК на РНК матрице.

**Терминирующий кодон** – кодон, определяющий окончание (тер-минацию) синтеза полинуклеотидной цепи. Обычно это кодоны UAA, UAG и UGA.

**Центральная догма молекулярной биологии** – обобщающее наблюдаемое в природе правило реализации генетической информа-ции: информация передаётся от нуклеиновых кислот к белку, но не в обратном направлении. Переход генетической информации от ДНК к РНК и от РНК к белку является универсальным для всех без ис-ключения клеточных организмов, лежит в основе биосинтеза макро-молекул.

**Эксон** – участок гена, входящий в состав первичного транскрипта, который остается в нем после процессинга (вырезания интронов). Вместе с другими экзонами образует зрелую мРНК

**Экспрессия генов** – процесс, в ходе которого наследственная информация от гена преобразуется в функциональный продукт – РНК или белок.

**Энхансер** – регуляторный участок ДНК эукариотических клеток, усиливающий транскрипцию ближайшего гена в десятки и сотни раз; используется для повышения эффективности транскрипции и регуляции активности гена.

**Элонгация** – последовательное присоединение мономеров к полимерной цепи.

## **2.1. Основы технологии рекомбинантных ДНК**

### **2.1.1. История и перспективы развития генетической инженерии**

Этапы развития основных направлений генетической инженерии: генетическая инженерия микроорганизмов; генетическая инженерия растений; генетическая инженерия животных.

Цели и возможности генетической инженерии как стратегического направления молекулярной биотехнологии. Связь генетической инженерии с другими науками.

Прокариоты и эукариоты. Биологические системы, используемые в генетической инженерии: *Escherichia coli*, *Sacharomyces cerevisiae*, культуры эукариотических клеток. Микроорганизмы как источники специфических генов.

### **2.1.2. Ферменты генетической инженерии**

Конструирование рекомбинантных ДНК (приложение 1, рис.13). Ферменты рестрикции и модификации (рестриктазы, ДНК-лигазы, ДНК- и РНК-полимеразы, нуклеазы). Рестриктирующие эндонуклеазы типа II, принцип действия.

## Основные понятия темы

**ДНК-лигаза** – фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между 3'-гидроксильной группой и 5'-фосфатом соседних нуклеотидов в месте одноцепочечного разрыва молекулы ДНК.

**ДНК-полимераза** – фермент, катализирующий синтез полинуклеотидной цепи из отдельных нуклеотидов с использованием другой цепи в качестве матрицы и ДНК-затравки со свободной 3'-ОН-группой.

**ДНК-полимераза Taq** – термостабильная ДНК полимераза бактерии *Thermus aquafiscus* (сохраняет активность при 95 °С). Часто применяется в методе ПЦР.

**Лигирование** – соединение двух молекул ДНК с помощью фосфодиэфирных связей. Этот процесс *in vitro* катализируется ферментом ДНК-лигазой фага Т4.

**Лизис** – разрушение клеточных стенок под действием ферментов, содержащихся в лизосомах, или других агентов.

**Липкие концы** – взаимно комплементарные одноцепочечные участки ДНК, выступающие по концам двухцепочечной молекулы; образуются в результате ступенчатых разрезов двухцепочечных ДНК эндонуклеазами рестрикции.

**Обратная транскриптаза** (ревертаза) – РНК-зависимая ДНК-полимераза, использующая молекулу РНК в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК.

**Палиндром** – участок двухцепочечной молекулы ДНК, обе цепи которого обладают одинаковой нуклеотидной последовательностью при прочитывании от 5'- к 3'- концу. Такие участки часто распознаются рестрицирующими эндонуклеазами типа II.

**Праймер** – короткий олигонуклеотид, который после отжига с матрицей служит первичным донором 3'-ОН (затравкой) для ДНК-полимеразы.

**Рестрицирующие эндонуклеазы (эндонуклеаза рестрикции, рестриктаза)** – бактериальный фермент, расщепляющий двухцепочечную молекулу ДНК в специфических сайтах.

**РНК-полимераза** – фермент, осуществляющий синтез РНК из рибонуклеозидтрифосфатов. Матрицей может служить ДНК или РНК, соответствующие РНК-полимеразы называют ДНК- или РНК-зависимыми.

**Сайт рестрикции** – нуклеотидная последовательность в молекуле ДНК, узнаваемая эндонуклеазой рестрикции. Обычно представляет собой короткий палиндром.

**Терминальная трансфераза** – фермент, катализирующий присоединение к 3'-концу молекулы ДНК дезоксинуклеозидмонофосфатов. Используется для клонирования кДНК при участии комплементарных гомополимерных “хвостов” поли(А) – поли(Т).

**Фрагмент Кленова** – более крупный из двух фрагментов ДНК-полимеразы I *E.coli*, образующийся при ее протеолитическом расщеплении. Сохраняет полимеразную активность в направлении 5'→3' и экзонуклеазную – в направлении 3'→5'. Используется, в частности, при секвенировании ДНК.

**Эндонуклеаза** – фермент, гидролизующий внутренние фосфодиэфирные связи и расщепляющий молекулы ДНК и РНК. Эндонуклеазы участвуют в рекомбинации, репарации и рестрикции; в последнем случае называются рестриктазами (рестрицирующими эндонуклеазами).

**Эндонуклеазы рестрикции** – ферменты (класс гидролаз), узнающие на молекуле двухцепочечной ДНК специфические последовательности нуклеотидов (сайты узнавания ДНК) и катализирующие реакцию гидролиза обеих цепей ДНК внутри или вне участка узнавания.

### 2.1.3. Векторы генетической инженерии для клонирования ДНК

Векторы для клонирования. Общая характеристика векторов (плазмидные векторы, фаговые векторы, гибридные векторы). Вектор pBR322 (приложение 1, рис. 11). Векторы на основе бактериофага λ (приложение 1, рис. 12). Векторы для клонирования крупных фрагментов ДНК.

Генетическая трансформация прокариот. Идентификация клеток, содержащих рекДНК (отбор).

#### Основные понятия темы

**Вектор (генетический)** – самореплицирующаяся молекула ДНК (например, бактериальная плазида), используемая в генной инженерии для переноса генов от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей.

**Вставка ДНК** – сегмент ДНК, встроенный в клонирующий вектор.

**Ген-мишень (ДНК-мишень, ДНК-интереса)** – 1. Клонированный ген. 2. Ген, подвергаемый специфическому воздействию. 3. Ген, интересующий исследователя.

**Геномная библиотека** (банк или библиотека генов) – набор клонированных фрагментов ДНК, в совокупности составляющих индивидуальный (групповой, видовой) геном.

**Емкость вектора** – максимальный размер участка ДНК, который может быть клонирован в данном векторе.

**Интегрирующий вектор** – вектор, специально сконструированный для того, чтобы с его помощью можно было встраивать (интегрировать) клонированную ДНК в геном клетки-хозяина.

**Искусственная бактериальная хромосома** (ВАС – Bacterial artificial chromosome) – векторная система на основе F-плазмиды *E.coli*, используемая для клонирования длинных (100–300 т.п.н.) последовательностей нуклеотидов.

**Искусственная дрожжевая хромосома** (УАС – Yeast artificial chromosome) – рекомбинантная ДНК, состоящая из дрожжевой плазмиды и интегрированных в нее центромерных и теломерных областей хромосом дрожжей, а также маркерных генов и содержащая несколько сайтов инициации репликации.

**Искусственная хромосома PI** (PI artificial chromosome) – векторная система на основе фага P<sub>i</sub>, используемая для введения в клетки *E.coli* методом электропорации очень крупных фрагментов ДНК (100–300 т.п.н.).

**Клонирующий вектор** – молекула ДНК (плазмидная или вирусная ДНК), предназначенная для клонирования ДНК-мишени.

**Космида** – вектор, объединяющий свойства плазмидного вектора и вектора на основе фага λ. Имеет *cos*-сайты.

**Линкер** – синтетический олигонуклеотид, содержащий сайт рестрикции. Используется для соединения векторной и клонируемой ДНК, к концам которой по методу сшивания тупых концов присоединены линкеры.

**Рекомбинантная ДНК** – молекула ДНК, полученная объединением *in vitro* разнородных, вместе нигде в природе не существующих, фрагментов ДНК.

**Рекомбинантная плазмида** – плазмида, измененная методами генной инженерии. Состоит из участков разных плазмид либо содержит сегменты ДНК других организмов.

**Челночный вектор** – плазмидная ДНК, способная реплицироваться в клетках двух разных типов (например, в *E. coli* и клетках дрожжей).

**Экспрессионный вектор** – вектор, содержащий промоторную и другие регуляторные последовательности, обеспечивающие эффективную транскрипцию рекомбинантного гена с последующей трансляцией мРНК и образованием рекомбинантного белка.

#### 2.1.4. Вспомогательные методы технологии рекомбинантной ДНК

Определение нуклеотидной последовательности ДНК: метод секвенирования ДНК по Сенгеру (приложение 3). Электрофорез ДНК. Блоттинг (приложение 1, рис. 14).

Метод ПЦР и его использование в пищевой промышленности (приложение 4). Обратная транскрипция: синтез кДНК. Гибридизация нуклеиновых кислот. Создание и скрининг геномных библиотек.

#### Основные понятия темы

**Ампликон** – специфический продукт ПЦР, накапливающийся в реакционной смеси начиная со второго цикла. «Ампликоны» ограничены по длине двумя «праймерами».

**Амплификатор** – прибор для проведения полимеразной цепной реакции.

**Амплификация** – увеличение числа копий участка ДНК в полимеразной цепной реакции.

**Блоттин**  $\varepsilon$  – перенос разделенных молекул из одной среды (например, геля) на твердый носитель (бумагу, нитроцеллюлозный фильтр).

**Бромистый этидий** – 3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид, EtBr, Ethidium bromide – интеркалирующий агент, широко применяемый для выявления нуклеиновых в молекулярной биологии, в частности, в случае ДНК-электрофореза в агарозном геле.

**Гибридизация нуклеиновых кислот** – отжиг двух полинуклеотидных цепей, часто из разных источников, с образованием ДНК-РНК-или ДНК-ДНК-гибридов, стабилизируемых водородными связями.

**Дидезоксинуклеотид (ddNTP, ddНТФ)** – полученный искусственным путем нуклеозидтрифосфат, лишенный 2'- и 3'-гидроксильных групп при углеродных атомах сахарного кольца.

**ДНК-зонд** – фрагмент ДНК, меченный тем или иным образом и использующийся для гибридизации со специфическим участком в молекуле ДНК. Позволяет идентифицировать комплементарные ему нуклеотидные последовательности.

**Зонд** – 1. Соединение, меченное тем или иным способом и использующееся для выявления родственных биохимических молекул в сложном образце. 2. Олигонуклеотид, использующийся для выявления комплементарных последовательностей с помощью гибридизации.

**Комплементарная ДНК (кДНК)** – молекула ДНК, синтезированная на РНК-матрице с участием РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы).

**Нозерн-блоттинг (nothern blotting)** – перенос молекул РНК, фракционированных методом гельэлектрофореза, из геля на твердую подложку (нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр) с последующей ДНК-РНК гибридизацией.

**Обратная транскрипция** – способ получения в большом количестве кДНК, состоящий из двух этапов. Вначале *in vitro* синтезируют кДНК, используя обратную транскриптазу, мРНК в качестве матрицы и олиго(dT) в качестве праймера. Затем кДНК амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции, используя два специфических праймера: один комплементарен участку первой цепи кДНК, а второй – другой цепи, комплементарной первой.

**Олигонуклеотид** (олигомер) – короткий (6–10 нуклеотидов) сегмент одноцепочечной ДНК. Обычно получают химическим путем.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** – метод амплификации специфического сегмента ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы с использованием олигонуклеотидных ДНК – зондов, комплементарных последовательностям противоположных цепей ДНК, фланкирующим амплифицируемый сегмент. Процесс состоит из серии циклически повторяющихся реакций: денатурации ДНК, отжига зондов, синтеза ДНК.

**Саузерн-блоттинг (Southern blotting)** – обнаружение специфических нуклеотидных последовательностей путем переноса денатурированных молекул ДНК, подвергнутых электрофорезу, из агарозного геля на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр за счет капил-

лярного эффекта и гибридизации с меченым зондом, комплементарным искомой последовательности.

**Секвенатор** – прибор, на котором производится автоматическое секвенирование, т. е. определение первичной последовательности ДНК.

**Секвенирование ДНК** – определение первичной последовательности, т. е. порядка расположения нуклеотидов цепи ДНК.

**Скрининг** – метод (или комплекс методов) идентификации единичного объекта (особи в популяции, клетки с искомыми свойствами, участка нуклеотидной последовательности и т. д.) путем перебора большого числа объектов.

**Электрофорез** – метод разделения заряженных молекул (ДНК, РНК или белков), основанный на разной скорости их перемещении в электрическом поле.

### 2.1.5. Системы экспрессии рекомбинантной ДНК

Экспрессия бактериальных генов в клетках прокариот. Особенности экспрессии генов эукариот в бактериальных клетках. Использование рекомбинантных микроорганизмов для получения белковых продуктов. Экспрессия рекомбинантных генов в эукариотических системах.

Генная инженерия растений (приложение 1, рис. 14). Методы получения трансгенных растений: трансформация растительных клеток.

Методы получения трансгенных растений. Векторы на основе ДНК-содержащих вирусов растений. Трансформация растительных клеток. Метод биобаллистической трансформации (биобаллистика, биолистика). Экспрессия чужеродной ДНК. Применение генной инженерии растений для изменения пищевой ценности растений.

Генетическая модификация животных. Генетическая модификация при помощи трансгеноза (технологии рекомбинантных ДНК), использование вирусных и плазмидных векторов. Введение генов в зародышевые клетки: метод микроинъекций ДНК; практическое применение трансгенных животных: трансгенные животные как продуценты ценных биологически активных белков.

Использование ГМИ в пищевой промышленности.

## Основные понятия темы

**Ген-репортер** – ген, кодирующий легко выявляемый продукт. Такие гены используют, например, для того, чтобы убедиться, что данная генетическая конструкция успешно введена в клетку, орган или ткань.

**Гибридизация нуклеиновых кислот** – отжиг двух полинуклеотидных цепей, часто из разных источников, с образованием ДНК/РНК-или ДНК/ДНК-гибридов, стабилизируемых водородными связями.

**Гибридный белок (химерный белок, слитый белок)** – продукт клонированных совместно двух или более кодирующих последовательностей из разных генов. Представляет собой одну полипептидную цепь.

**Гибридный ген** – ген, состоящий из частей двух или нескольких генов и экспрессирующийся как единое целое с образованием гибридного (химерного) белка.

**Интеграция** – встраивание чужеродной ДНК (обычно с помощью гомологичной рекомбинации) в хромосому хозяйской клетки.

**Клонирование** – совокупность процедур, использующихся для получения клонов. Клонирование многоклеточных организмов, например, включает пересадку ядер соматических клеток в оплодотворенное яйцо с удаленным пронуклеусом.

**Клонирование генов** – система методов, использующаяся для получения клонированных ДНК: выделение нужного гена из какого-либо организма, встраивание его в плазмиду (вектор), введение в клетку организма-хозяина, многократная репликация.

**Маркерный ген** – ген с известной хромосомной локализацией, имеющий четкое фенотипическое проявление (устойчивость к антибиотикам, ферментативная активность и т. д.).

**Маркерный пептид** – участок гибридной белковой молекулы, облегчающий идентификацию или очистку белка.

**Матричная цепь** – цепь ДНК или другой полинуклеотид, использующийся ДНК-полимеразой в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи.

**Метаболическая перегрузка** – нарушение метаболизма организма-хозяина в результате введения в его геном и экспрессии чужеродной ДНК.

**Метка** – радиоактивный изотоп или идентифицируемый биохимическими либо иммунологическими методами лиганд (например, флуорофор), связывающийся с макромолекулой. Позволяет обнаружить меченое вещество в образце.

**Мутация** – спонтанное или индуцированное изменение структуры гена.

**Мутация со сдвигом рамки** – мутация, связанная с появлением лишнего или с потерей одного или нескольких (в том числе, не кратном трем), нуклеотидов. Приводит к нарушению триплетного кода и синтезу совершенно совершенно другого полипептида (если только синтез вообще не блокируется).

**Полипептид** – линейный полимер, состоящий из аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Полипептидом является, например, белковая молекула

**Посттрансляционная модификация полипептидов** – изменение структуры белковых молекул после завершения их синтеза на рибосомах. К таким модификациям относятся: фосфорилирование, гликозилирование, окисление цистеина, отщепление сигнальных последовательностей и т. д.

**Рекомбинантный белок** – белок, кодируемый клонированной рекомбинантной ДНК.

**Репортерный ген** – гены, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано.

**Реципиент** – организм (прокариотическая или эукариотическая клетка), в который вводят чужеродную генетическую информацию: например, в виде рекомбинантной ДНК.

**Сайт встраивания** (клонирования) – специфический участок веторной молекулы, в который встраивают фрагмент чужеродной ДНК. *Очень часто это уникальный сайт рестрикции.*

**Сайт-направленный мутагенез** – внесение *in vitro* в конкретный сайт клонированной последовательности. Позволяет идентифицировать функциональные участки в молекулах белков и получать белки с заранее заданными свойствами.

**Сигнальный пептид** (лидерный пептид) – N-концевой участок белковой молекулы длиной 15–30 аминокислот, обеспечивающий секрецию белка (перенос через мембрану). После секреции этот участок отщепляется от белковой молекулы.

**Трансдукция** – перенос генетического материала из одной бактериальной клетки в другую с помощью бактериофага.

**Трансфекция** – искусственное введение в эукариотические клетки изолированных молекул ДНК.

**Хромосомный сайт интеграции** – место в хромосоме, куда может встроиться чужеродная ДНК, часто без всяких последствий для организма-хозяина.

**Частота трансформации** – доля клеток в клеточной популяции, получивших чужеродную ДНК; выражается числом трансформантов к общему числу клеток.

**Электропорация** – образование пор в клеточных мембранах под действием электрического тока, через эти поры в клетки проникает чужеродная ДНК.

**Эффективность трансформации** – количество колоний, выросших на чашке Петри после добавления к клеткам 1 мкг суперскрученной плазмидной ДНК и посева клеток на питательную среду.

## 2.1.6. Лабораторный практикум (Виртуальные лабораторные работы)

### **Лабораторная работа 1. Методы выделения ДНК из растительного сырья**

**Цель работы** – ознакомление с методом гомогенизации растительного сырья, обработки гомогената лизирующими и осаждающими буферами для удаления сопутствующих компонентов с последующим центрифугированием, отделением супернатанта и высаживанием целевого продукта.

### **Лабораторная работа 2. Электрофорез ДНК в агарозном геле**

**Цель работы** – ознакомление с методикой проведения разделения смеси молекул ДНК по размеру на пластинке агарозного геля в буферном растворе под действием электрического поля.

### **Лабораторная работа 3. Блотинг ДНК и белков Радиоавтография**

**Цель работы** – ознакомление с методом переноса продуктов электрофоретического разделения смеси ДНК с пластинки агарозного геля на нитроцеллюлозную мембрану и последующей гибридизации с радиоактивным зондом для поиска искомой последовательности ДНК (приложение 1, рис. 15).

## **Лабораторная работа 4. Метод ПЦР и его использование в пищевой промышленности**

*Цель работы* – ознакомление с методикой подготовки пробы пищевого сырья для определения наличия в ДНК вставки, подтверждающей генетическую модификацию. Выбор праймеров, условий плавления ДНК, условий матричного синтеза ДНК и поиска искомой последовательности с применением микрочипа (приложение 4).

### **2. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ КОНТРОЛЬНОЙ РАБОТЫ**

При изучении дисциплины «Основы генетической инженерии» предусмотрено выполнение одной контрольной работы. Контрольная работа включает вопросы о строении и свойствах нуклеиновых кислот, процессах матричного синтеза с их участием в клетках прокариот и эукариот. Для выполнения работы необходимо иметь представление о строении генов прокариот и эукариот, знать этапы биосинтеза белка и принципы, которые лежат в их основе.

Работа включает вопросы изменчивости генома, изучение которой привело к разработке технологий генетической инженерии. Представление о создании рекомбинантных ДНК – векторных системах на основе плазмид и бактериофагов – позволяет разобраться в технологиях клонирования ДНК и получения рекомбинантных белков. Рекомбинантные белки являются одной из основных целей биотехнологических процессов на основе генетической инженерии.

Следует детально разобраться в сущности полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время это наиболее распространенный способ для установления наличия ГМО в пищевом сырье или продуктах питания. При решении задачи обратите внимание на необходимость иллюстрировать ответ схемой умножения копий ДНК в процессе ПЦР.

Для решения задач по матричному синтезу нуклеиновых кислот и биосинтезу белка рекомендуется запомнить несколько простых правил:

1. Репликация ДНК: Комплементарная цепь ДНК всегда синтезируется в направлении  $5' \rightarrow 3'$ . В начале репликации фермент праймаза синтезирует короткую РНК-последовательность, комплементар-

ную к матричной ДНК, которая автоматически удаляется, благодаря экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы.

2. Транскрипция: РНК синтезируется на матричной цепи ДНК в направлении  $5' \rightarrow 3'$ . В РНК тимин (Т) заменяется на урацил (U).

3. Трансляция: Рибосомы двигаются вдоль мРНК в направлении  $5' \rightarrow 3'$ .

Контрольная работа выполняется по одному из нижеприведенных вариантов, выбор которого определяется последней цифрой номера зачетной книжки (шифра).

Ответы на поставленные вопросы должны быть краткими, ясными и исчерпывающими и содержать обоснования излагаемых положений.

Обязательным условием является написание необходимых химических формул, схем и рисунков. Не рекомендуется вклеивать ксерокопии рисунков и таблиц из учебников или сети Интернет.

В конце контрольной работы приводятся ссылки на источники информации, которые использовались при ее выполнении. Работа подписывается студентом.

Выполненная контрольная работа дает право допуска к экзаменационной сессии. При сдаче экзамена студент должен иметь ее при себе.

### **3. ВАРИАНТЫ КОНТРОЛЬНЫХ РАБОТ**

#### **Вариант 0**

1. В молекуле ДНК на долю цитозиновых нуклеотидов приходится 18 %. Определить процентное содержание других нуклеотидов, входящих в молекулу ДНК.

2. Внесите в таблицу необходимую информацию о механизме репликации ДНК эукариот в соответствующие колонки таблицы, содержащей перечень некоторых белков и ферментов, участвующих в процессе репликации.

3. Что такое эндонуклеазы рестрикции II и почему они так важны для технологии рекомбинантных ДНК?

4. Перечислите наиболее важные свойства систем экспрессии клонированных генов.

5. Сколько копий ДНК можно иметь после 4-х циклов ПЦР, если сначала имелись три копии фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

**Компоненты репликативной системы**

Белки	Функции в вилке репликации	Этап репликации
Хеликаза		
Дестабилизирующие белки (SSB-белки)		
ДНК-полимераза I		
ДНК-полимераза III		
Лигаза		
РНК-праймаза		

**Вариант 1**

1. В препаратах ДНК, выделенной из клеток туберкулезных бактерий, содержание аденина составило 15,1 % от общего количества оснований. Определите примерное количество гуанина, тимина и цитозина в этой ДНК.

2. Определите возможное число информационных триплетов в участке молекулы ДНК, состоящем из 360 пар нуклеотидов, если молекула м-РНК содержит 300 нуклеотидов.

3. Опишите применение бактериофага  $\lambda$  в качестве вектора. Какими особенностями он обладает?

4. Какими способами можно влиять на экспрессию генов, клонированных в прокариотических организмах?

5. Сколько копий ДНК можно иметь после 5-ти циклов ПЦР, если сначала имелись две копии фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

**Вариант 2**

1. Исследования показали, что 34 % от общего числа нуклетидов и-РНК приходится на гуанин, 18 % – на урацил, 28 % – на цитозин, 20 % – на аденин. Определить процентный состав азотистых оснований двухцепочечной ДНК, слепком с которой является указанная и-РНК.

2. Определите характер возможных нарушений в функционировании лактозного оперона в случае мутации в операторе, что делает невозможным прикрепление к нему активного белка-репрессора, но при этом не нарушены функции РНК-полимеразы.

3. Что такое клонирование ДНК? Что необходимо для клонирования ДНК?

4. В чем состоят проблемы клонирования эукариотических генов в системе клеток прокариот. Опишите стратегию преодоления этих проблем.

5. Сколько копий ДНК можно иметь после 5-ти циклов ПЦР, если сначала имелись три копии фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

### Вариант 3

1. Участок молекулы белка имеет строение: про-лиз-гис-вал-тир. Сколько возможных вариантов строения фрагмента молекулы ДНК кодирует эту часть молекулы белка?

2. Используя таблицу генетического кода, составьте схему, демонстрирующую принцип коллинеарности полинуклеотида (участка матричной РНК) и кодируемого им полипептида. На основе этой схемы проиллюстрируйте некоторые из принципов генетического кода (триплетность, неперекрываемость, непрерывность).

3. Каким образом осуществляют отбор колоний, содержащих рекомбинантную плазмиду? Приведите пример с применением плазмиды pBR322.

4. В чем состоят преимущества эукариотической системы экспрессии в сравнении с бактериальной?

5. Сколько копий ДНК можно иметь после 4-х циклов ПЦР, если сначала имелись две копии фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

### Вариант 4

1. Большая из двух цепей белка инсулина (цепь В) начинается со следующих аминокислот: фен-вал-асп-глу-гис-лей. Напишите последовательность нуклеотидов молекулы ДНК, хранящих информацию об этом участке белка.

2. Определите характер возможных нарушений в функционировании лактозного оперона в случае мутации в нуклеотидной последовательности промотора, узнаваемой РНК-полимеразой (исключает возможность специфического прикрепления этого фермента).

3. Что такое трансформация? Что означают понятия *частота* и *эффективность* трансформации?

4. Опишите основные общие и различные черты векторов для клонирования и экспрессии генов.

5. Сколько копий ДНК можно иметь после 4-х циклов ПЦР, если сначала имелись четыре копии фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

### Вариант 5

1. Участок гена имеет следующее строение: ЦГГ ЦГЦ ТЦА ААА ТЦГ... Укажите строение соответствующего участка того белка, информация о котором содержится в данном гене. Как отразится на строении белка удаление из гена 4-го нуклеотида?

2. Определите характер возможных нарушений в функционировании лактозного оперона в случае мутации в гене-регуляторе, которая привела к стабильной инактивации белка-репрессора.

3. Опишите применение плазмиды pBR322 в качестве вектора. Какими особенностями она обладает?

4. Что означает понятие — регулируемый промотор? Продемонстрируйте на примере.

5. Сколько копий ДНК можно иметь после 5-ти циклов ПЦР, если сначала имелись четыре копии фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

### Вариант 6

1. Объясните причину ситуации, при которой ген эукариотической клетки, занимающий участок ДНК размером в 2400 пар нуклеотидов, кодирует полипептид, состоящий из 180 аминокислотных остатков.

2. Антикодоны молекул т-РНК содержат следующие нуклеотиды: АГУ ГЦА ЦГУ УАГ ААА УУА... Определите последовательность аминокислот, доставляемых в рибосому данными молекулами т-РНК.

3. Какие существуют способы введения чужеродной ДНК в клетки *E.coli*?

4. Опишите условия встраивания гена интереса в хромосомную ДНК клетки-хозяина.

5. Сколько копий ДНК можно иметь после 6-ти циклов ПЦР, если сначала имелись три копии фрагмента ДНК?

## Вариант 7

1. Сложный белок состоит из четырех полипептидных цепей, количество аминокислот в каждой из них: 116, 134, 162, 148. Какова длина оперона, кодирующего данный белок, если его регуляторная часть содержит 372 нуклеотида? Размер одного нуклеотида 0,34 нм. Составьте схему прерывистой структуры гипотетического гена, состоящего из 5 экзонов и 4 интронов и кодирующего полипептид, включающий 300 аминокислотных остатков (относительные размеры отдельных экзонов и интронов можно выбрать произвольные).

2. В чем заключаются особенности клонирования больших фрагментов ДНК и какие векторы для этого применяют?

3. Какая стратегия используется при разработке получения рекомбинантных белков, чтобы сделать белки секретиремыми?

4. Сколько копий ДНК можно иметь после 6-ти циклов ПЦР, если сначала имелись две копии фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

5. Сколько копий ДНК можно иметь после 10-ти циклов ПЦР, если сначала имелись две копии фрагмента ДНК?

## Вариант 8

1. Содержание нуклеотидов в цепи м-РНК составляет: цитозин – 20 %, аденин – 25 %, урацил – 23 %, гуанин – 32 %. Определите процентный состав нуклеотидов участка молекулы ДНК, являющейся матрицей для этой м-РНК.

2. Определите нуклеотидную последовательность и ориентацию концов фрагмента одной из нитей молекулы ДНК, если известна последовательность и ориентация комплементарного участка другой нити этой молекулы: 3'-А-Т-С-Г-Т-Т-С-Г-А-5'.

3. Какие факторы являются определяющими при выборе клонирующего вектора?

4. В биотехнологическом процессе получения рекомбинантного белка возможна метаболическая перегрузка. Что такое метаболические перегрузки и что является их причиной?

5. Сколько копий ДНК можно иметь после 4-х циклов ПЦР, если сначала имелось пять копий фрагмента ДНК?

## Вариант 9

1. Определить аминокислотный состав полипептида, который кодируется последовательностью и-РНК: ЦЦА ЦЦУ ГГУ УУУ ГГЦ.

2. Определите направление синтеза и нуклеотидную последовательность каждой из двух дочерних нитей, которые возникнут при репликации приведенного ниже двухцепочечного фрагмента ДНК:

3'-A-G-T-C-T-T-G-C-A-5'

5'-T-C-A-G-A-A-C-G-T-3'

3. Что такое *вектор* в генной инженерии? Приведите пример векторной конструкции. Ответ иллюстрируйте схемой.

4. Иногда стратегия синтеза белка включает получение этого белка в составе химерного продукта. В чем преимущества такого подхода?

5. Сколько копий ДНК можно иметь после 6-ти циклов ПЦР, если сначала имелись десять копий фрагмента ДНК?

#### 4. ТЕМЫ РЕФЕРАТОВ

1. Генноинженерные методы улучшения аминокислотного состава запасных белков растений, изменения вкуса и внешнего вида плодов.

2. Выведение растений, устойчивых к насекомым-вредителям.

3. Генноинженерные методы повышения устойчивости растений к вирусам, бактериям, фитопатогенам и гербицидам.

4. Генноинженерные методы получения растений, противостоящих неблагоприятному воздействию.

5. Растения как биореакторы.

6. Практическое применение трансгенных животных.

7. Трансгенный крупный рогатый скот. Цели трансгеноза.

8. Трансгенные животные как продуценты ценных биологически активных белков.

9. Промышленный синтез белков с помощью рекомбинантных микроорганизмов.

10. Пищевая продукция из генетически модифицированных источников.

#### 5. ВОПРОСЫ К ЗАЧЕТУ

1. История развития генетической инженерии. Этапы развития.

2. Гены прокариот. Строение (опероны, промоторы).

3. Строение и экспрессия лактозного оперона.

4. Транскрипция генов прокариот (промоторы и терминаторы).

5. Регуляция экспрессии генов прокариот.
6. Гены эукариот. Структура (экзоны и интроны).
7. Транскрипция генов эукариот. Понятие о сплайсинге, альтернативный сплайсинг.
8. Регуляция экспрессии генов эукариот (энхансеры).
9. Подвижные генетические элементы (транспозоны). Принципиальное строение бактериального транспозона. Биологическая роль транспозонов.
10. Внехромосомные генетические элементы.
11. Плазмиды. Типы плазмид.
12. Общие свойства и биологическая роль бактериальных плазмид.
13. Природная генная инженерия плазмид.
14. Бактериофаги. Генетическая карта и молекулярные аспекты литического цикла развития фаговой частицы.
15. Биологические системы, используемые в генетической инженерии: *Escherichia coli*, *Sacharomyces cerevisiae*.
16. Ферменты генетической инженерии. Ферменты рестрикции и модификации (рестриктазы, ДНК-лигазы, ДНК- и РНК-полимеразы, нуклеазы). Рестриктирующие эндонуклеазы типа II, принцип действия.
17. Векторы для клонирования. Общая характеристика векторов (плазмидные векторы, фаговые векторы). Вектор pBR322.
18. Генетическая трансформация прокариот.
19. Системы клонирования в клетках *E.coli*.
20. Трансформация бактериальных клеток и отбор трансформантов.
21. Клонирование структурных генов эукариот.
22. Понятие о кДНК. Этапы синтеза кДНК.
23. Определение нуклеотидной последовательности – первичной структуры ДНК (метод секвенирования ДНК по Сэнгеру).
24. Амплификация ДНК. Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Использование в пищевой промышленности.
25. Создание и скрининг геномных библиотек. Банк кДНК.
26. Методы генетической инженерии: электрофорез, радиоавтография, блоттинг.
27. Экспрессия бактериальных генов в клетках прокариот.
28. Использование рекомбинантных микроорганизмов для получения белковых продуктов.

29. Получения трансгенных растений. Векторы на основе ДНК-содержащих вирусов растений.

30. Применение генной инженерии растений для изменения пищевой ценности растений.

## 6. ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

### Основные источники

1. **Цимбаленко Н.В.** Технологии рекомбинантной ДНК: Учеб. пособие. – СПб.: Изд-во РГПУ им. А.И. Герцена, 2011.

2. **Кузьмина Н.А.** Основы биотехнологии: Электронный учебник 1995–2010, код доступа: <http://www.biotechnolog.ru>

3. **Комов В.П., Шведова В.Н.** Биохимия: Учеб. – М.: Дрофа, 2008. – 638 с.

4. **Клунова С.М., Егорова Т.А., Живухина Е.А.** Биотехнология: Учеб. пособие для высш. пед. проф. образования. – М.: Изд. центр «Академия», 2010. – 256 с.

5. **Глик Б., Пастернак Дж.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – 598 с.

### Дополнительные источники

1. **Санькова Т.П.** Введение в биологию для физиков: Учеб. пособие. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011. – 137 с.

2. **Рогов И.А., Антипова Л.В., Шуваева Г.П.** Пищевая биотехнология: В 4 кн. Кн 1: Основы пищевой биотехнологии. – М: КолосС, 2004. – 440 с.

3. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии. 2-е изд., перераб. и доп.: Учеб. для вузов. – СПб.: Изд-во СПбГТУ, 1999. – 522 с.

4. **Жимулев И.Ф.** Общая и молекулярная генетика. 2-е изд., испр. и доп.: Учеб. пособие. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003. – 479 с.

5. **Клаг У., Каммингс М.** Основы генетики. – М.: Техносфера, 2007.

6. **Рис Э., Стернберг М.** Введение в молекулярную биологию (от клеток к атомам). – М.: Мир, 2002.

7. **Щелкунов С.Н.** Нитевидные фаги *E. Coli* – молекулярные векторы генетической инженерии // СОЖ. 2001. № 8. С. 2–6.

8. **Шабарова З.А., Богданов А.А., Золотухин А.С.** Химические основы генетической инженерии. – М., 1994.

9. **Воробейников Г.А.** Трансгенные растения: достижения и проблемы биобезопасности. – СПб.: Изд-во «ТЕССА», 2004. – 80 с.

10. **Титов С.Е.** и др. Трансгенез как способ повышения устойчивости растений к абиотическим факторам // Успехи современной биологии. 2003. Т. 123. № 5. С. 487–494.

11. **Глеба Ю.Ю.** Биотехнология растений // СОЖ. 1998. № 6. С. 3–8.

12. Карликовые мутанты и их роль в «Зеленой революции» // СОЖ. 2000. № 8. С. 18–33.

13. **Лутова Л.А.** Генетическая инженерия растений: свершения и надежды // СОЖ. 2000. № 10. С. 10–17.

14. **Семенюк Е.Г.** Проблема оценки риска трансгенных растений // Агрехимия. 2002. № 10. С. 85–96.

15. Биотехнология и трансгенетика // Агро XXI. 2002. № 1. 23 с.

16. **Жученко А.А.** Роль генетической инженерии в адаптивной системе селекции растений // Сельскохозяйственная биология. 2003. № 1. С. 3–33.

17. **Тутельян В.А.** и др. Мониторинг оборота пищевой продукции из генетически модифицированных источников в Москве // Вопросы питания. 2003. № 3. С. 20–23.

18. **Корочкин Л.И.** Клонирование животных // СОЖ. 1999. № 4. С. 10–16.

19. **Волкова Н.А.** и др. Изучение факторов, влияющих на эффективность создания соматических трансгенных сельскохозяйственных животных – продуцентов рекомбинантных белков человека с молоком // Биотехнология. 2006. № 4. С. 36–44.

### Интернет-ресурсы

1. Электронный учебник «Наглядная биохимия» / [http://yanko.lib.ru/books/biolog/nagl\\_biochem/index.htm](http://yanko.lib.ru/books/biolog/nagl_biochem/index.htm)

2. Сайт «Классическая и молекулярная биология»: [www.molbiol.ru](http://www.molbiol.ru)

3. Образовательный видеопортал <http://univertv.ru/>, раздел Биология.

4. Библиотека. Единое окно доступа к образовательным ресурсам: <http://window.edu.ru>;
5. Российская электронная библиотека: <http://www.elbib.ru>;
6. Студенческая библиотека – онлайн: <http://www.referats.net.>;
7. Российское образование – Федеральный портал: <http://www.edu.ru> .
8. Научный информационный журнал Биофайл: <http://biofile.ru>
9. Сайт о химии <http://www.xumuk.ru/encyklopedia/>
10. Биосинтез белка: <http://kze.docdat.com/docs/206/index-469635.html>

# ПРИЛОЖЕНИЕ 1

## Схемы и рисунки

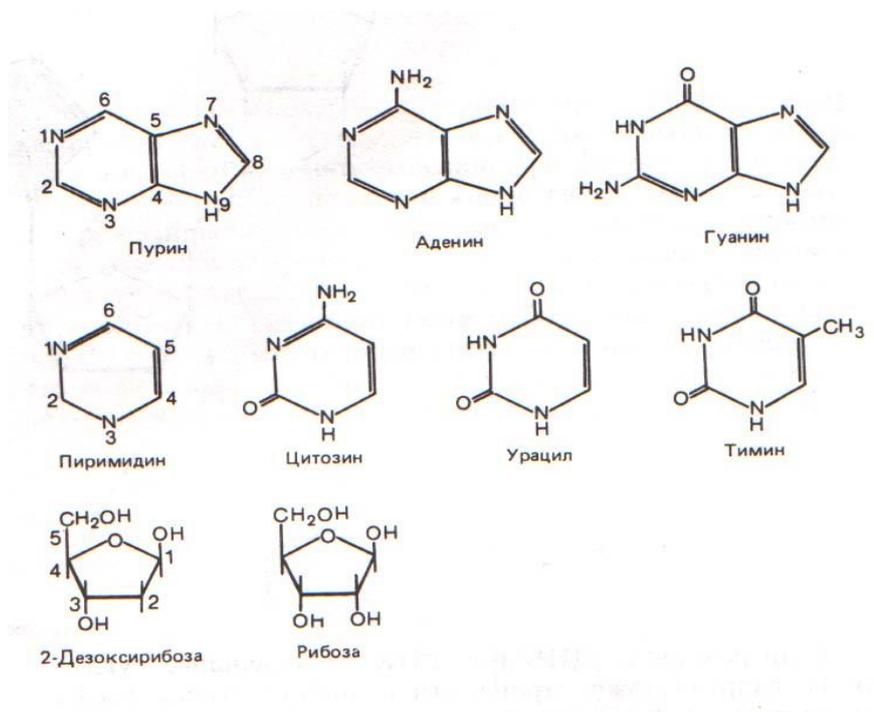


Рис. 1. Компоненты нуклеиновых кислот

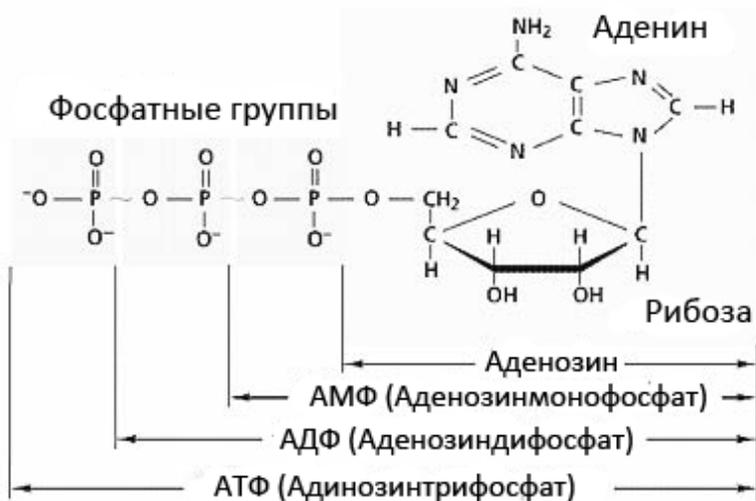


Рис. 2. Строение нуклеотидов: аденозинмонофосфата, -дифосфата и -трифосфата

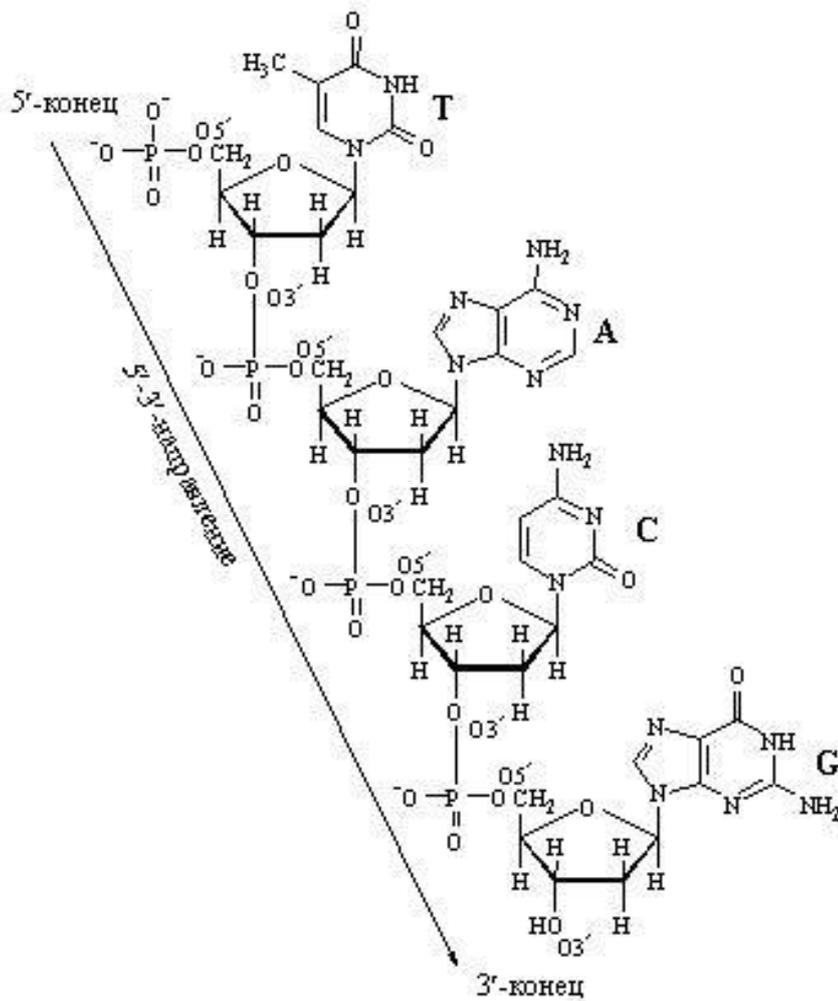


Рис. 3. Схема строения одинарной цепи ДНК  
(стрелкой показано направление, в котором происходит биосинтез цепи ДНК)

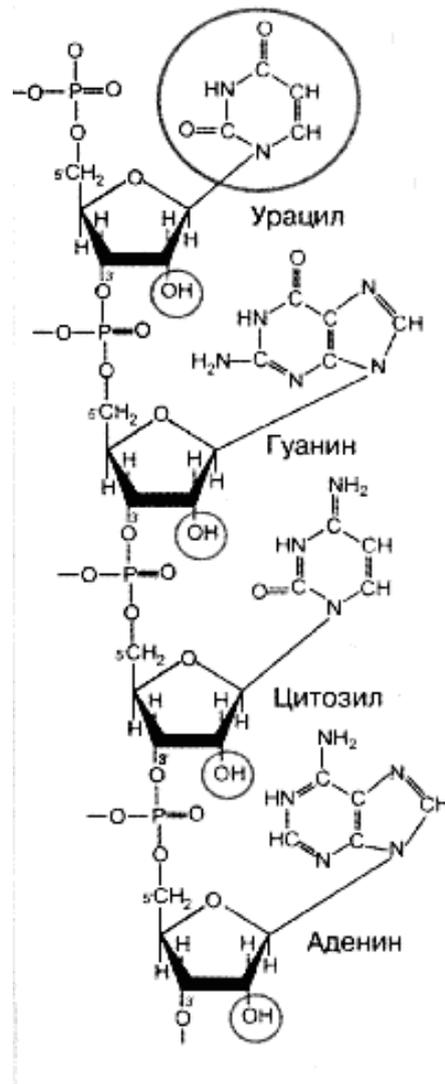
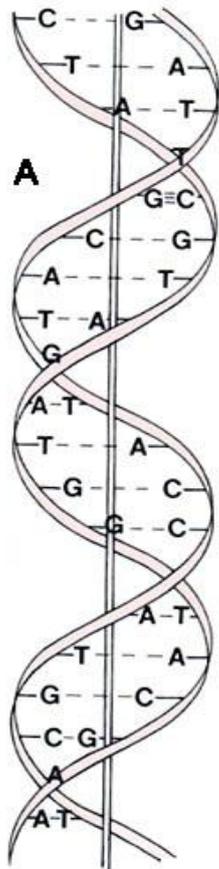
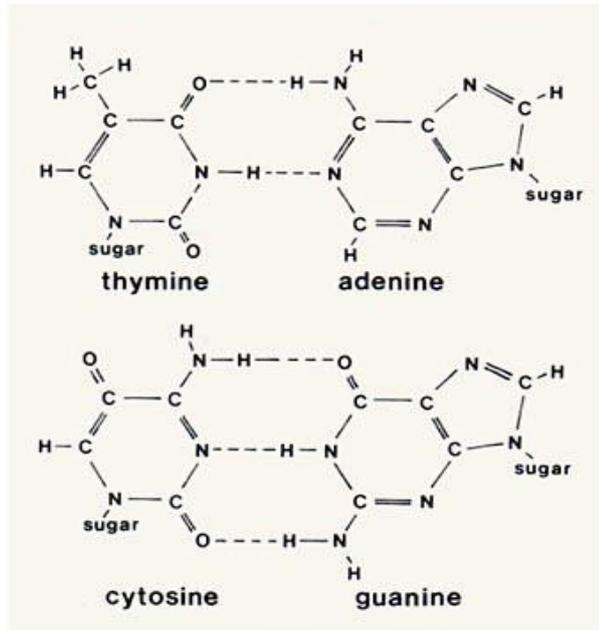


Рис. 4. Схема первичной структуры РНК и формулы гетероциклических оснований



**B**



**C**

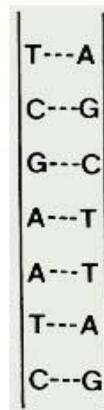


Рис. 5. Схематичное изображение двойной спирали ДНК(А) и комплементарности гетероциклических оснований (В, С)

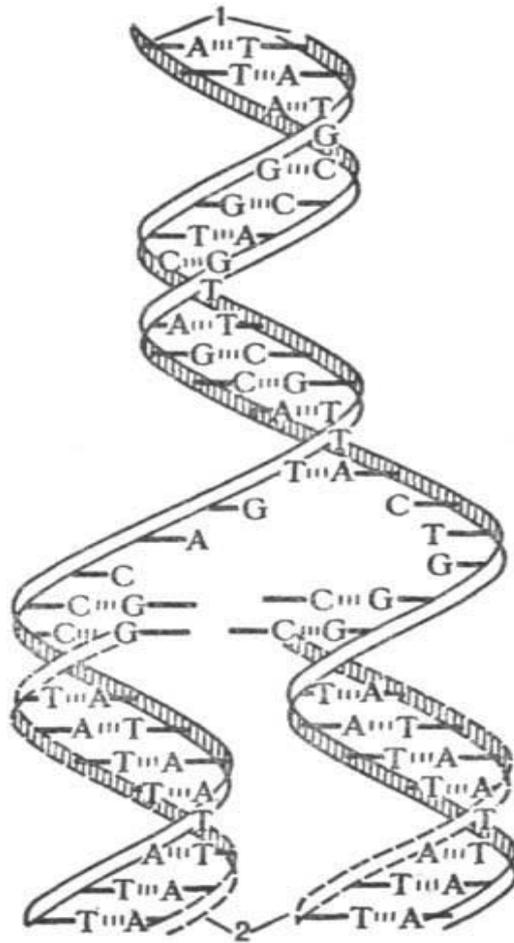


Рис. 6. Полуконсервативный механизм репликации двойной спирали ДНК:

А, Т, G и С-остатки пуриновых (аденина, гуанина) и пиримидиновых (тимина, цитозина) оснований;

1– исходная (материнская) цепь ДНК;

2 – новые (дочерние) цепи ДНК

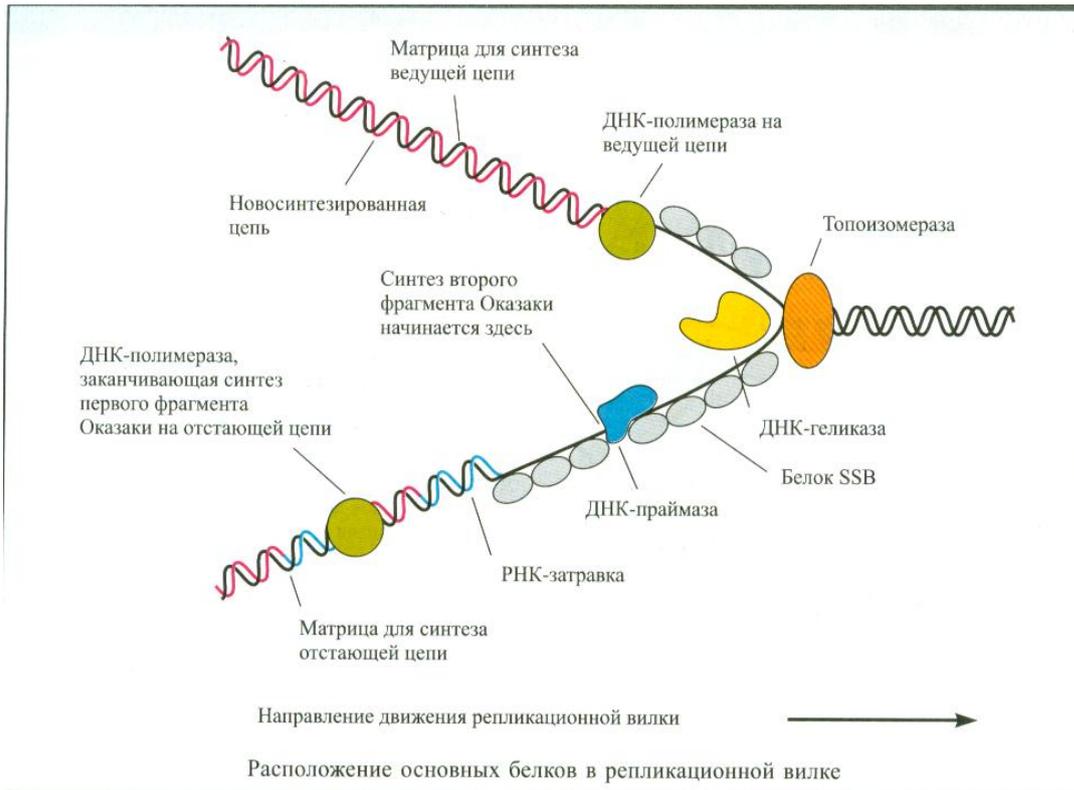


Рис. 7. Репликации ДНК (синтез ДНК на ДНК-матрице)

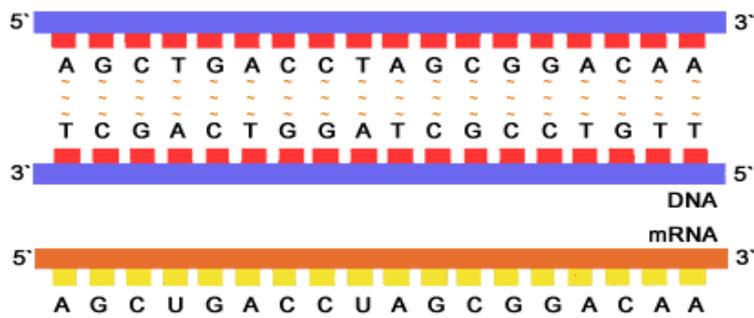


Рис. 8. Схема транскрипции (синтез мРНК на ДНК-матрице)

## Стадии транскрипции (к рис. 9)

1. Связывание РНК-полимеразы с промотором гена в цепи ДНК.
2. Начало синтеза цепи РНК (*инициация*).

Цепь РНК растёт в направлении  $5' \rightarrow 3'$  по мере продвижения РНК-полимеразы по цепи ДНК в направлении  $3' \rightarrow 5'$ .

3. Рост синтеза цепи РНК (*элонгация*);
4. Завершение синтеза цепи РНК (*терминация*).

## Стадии трансляции каждой молекулы мРНК рибосомой

1. *Инициация*: Start-кодон  $5'$ -AUG- $3'$
2. *Элонгация* пептидной цепи.

Цепь мРНК транслируется в направлении  $5' \rightarrow 3'$

3. Завершение синтеза пептидной цепи (*терминация*).

### 3. ТРАНЛЯЦИЯ

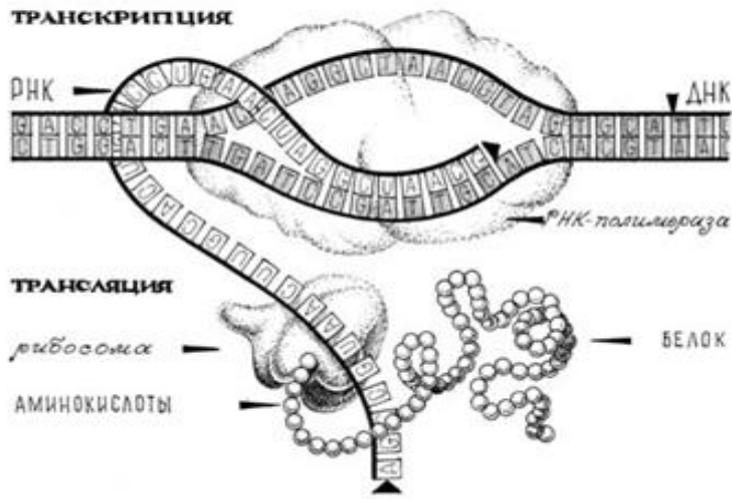


Рис. 9. Схема экспрессии гена (биосинтез белка)

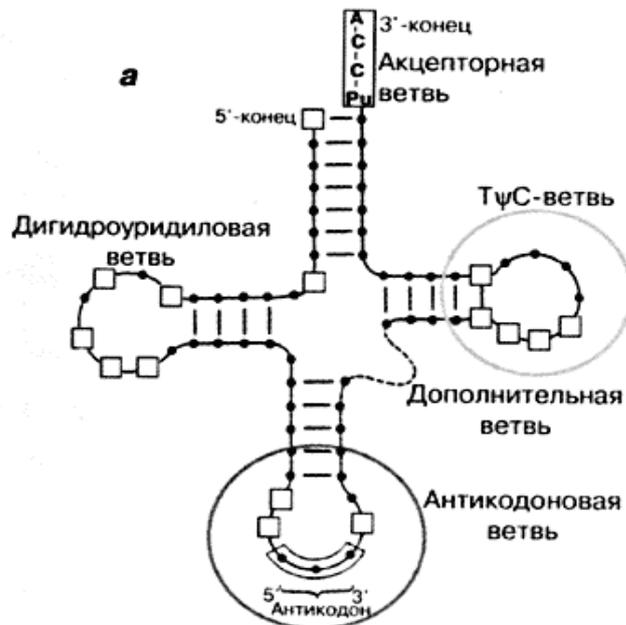


Рис. 10. Строение транспортной РНК (тРНК)

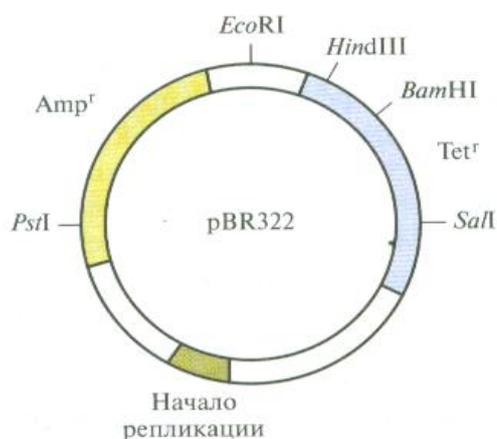


Рис. 11. Генетическая карта плазмидного вектора pBR322  
 Длина 4361 п.н.; Tet и Amp – гены устойчивости к тетрациклину и ампицилину. Плаزمида содержит сайты узнавания для рестриктаз (*PstI*, *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *Sall*)

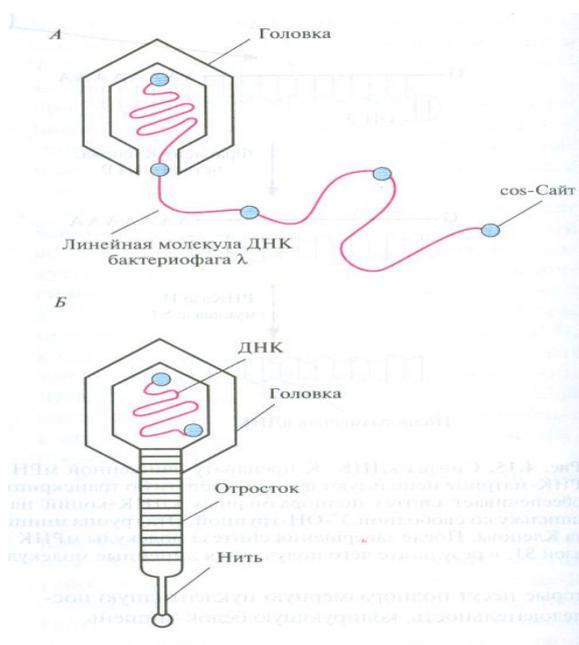


Рис.12. Схема строения бактериофага  $\lambda$ :  
 А – при репликации кольцевой ДНК образуется линейная молекула, состоящая из повторяющихся участков длиной около 50 т.п.н. (каждый – полноразмерная ДНК фага);  
 Б – упаковка ДНК в головку фага

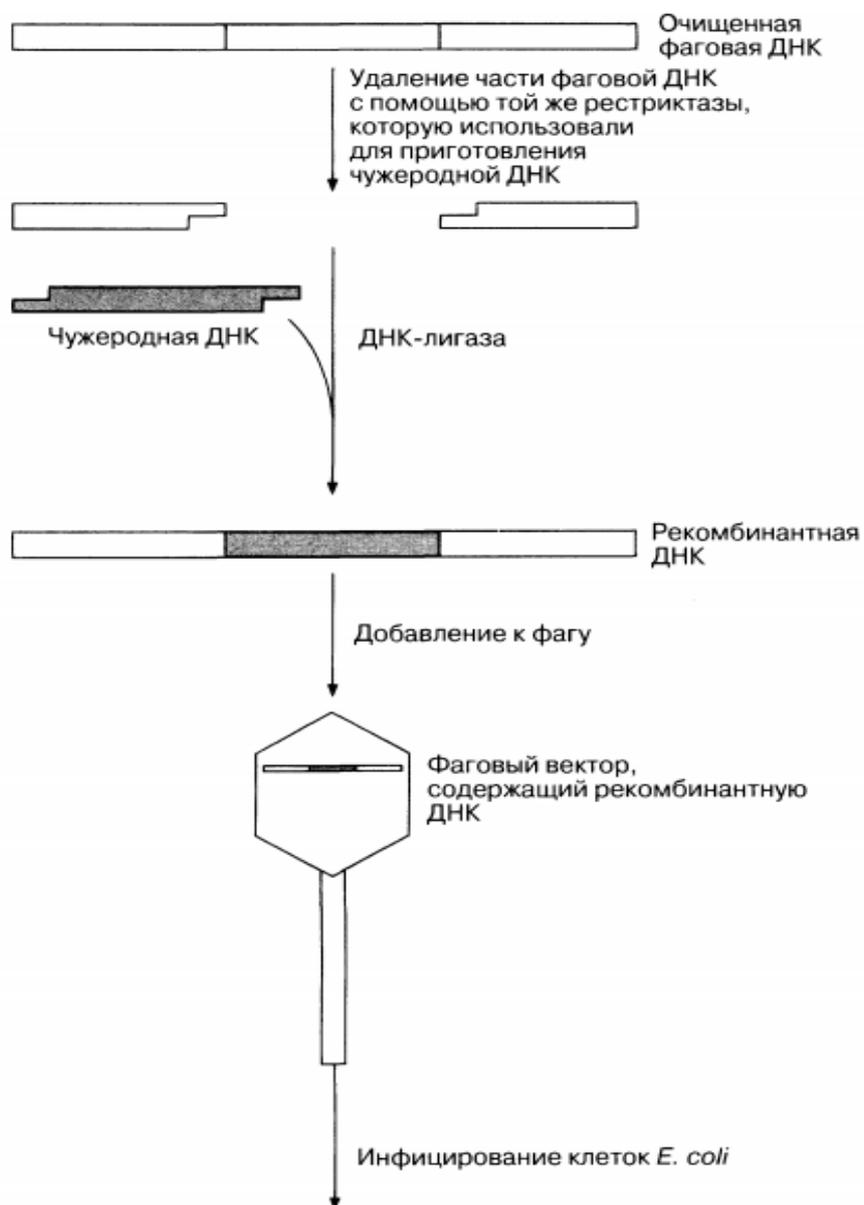


Рис.13. Схема клонирования рекомбинантной ДНК в векторе на основе бактериофага

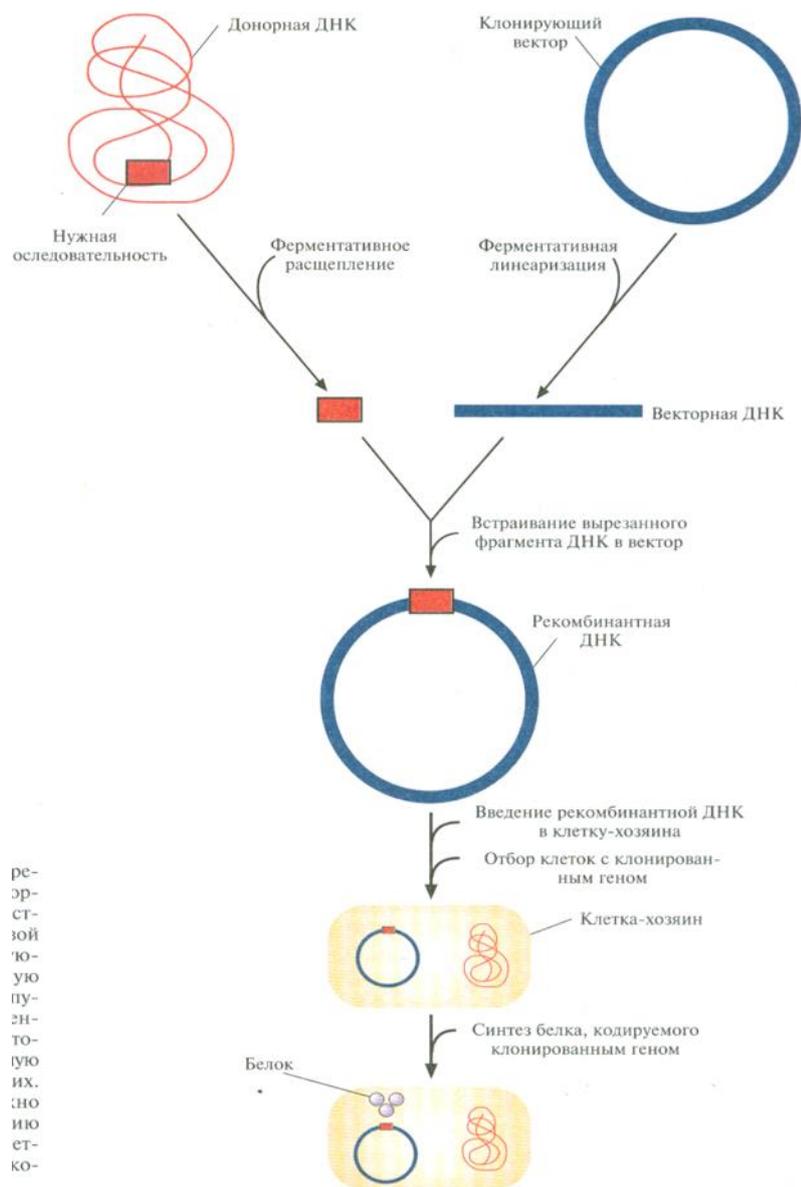


Рис.14. Схема клонирования рекомбинантной ДНК в плазмидном векторе

Донорную ДНК расщепляют рестрицирующей эндонуклеазой (рестриктазой) и встраивают в клонирующий вектор. Полученную конструкцию вводят в популяцию клеток-хозяев, идентифицируют трансформированные клетки и культивируют их. При необходимости индуцируют экспрессию клонированного гена в клетках-хозяевах и получают кодируемый им белок.

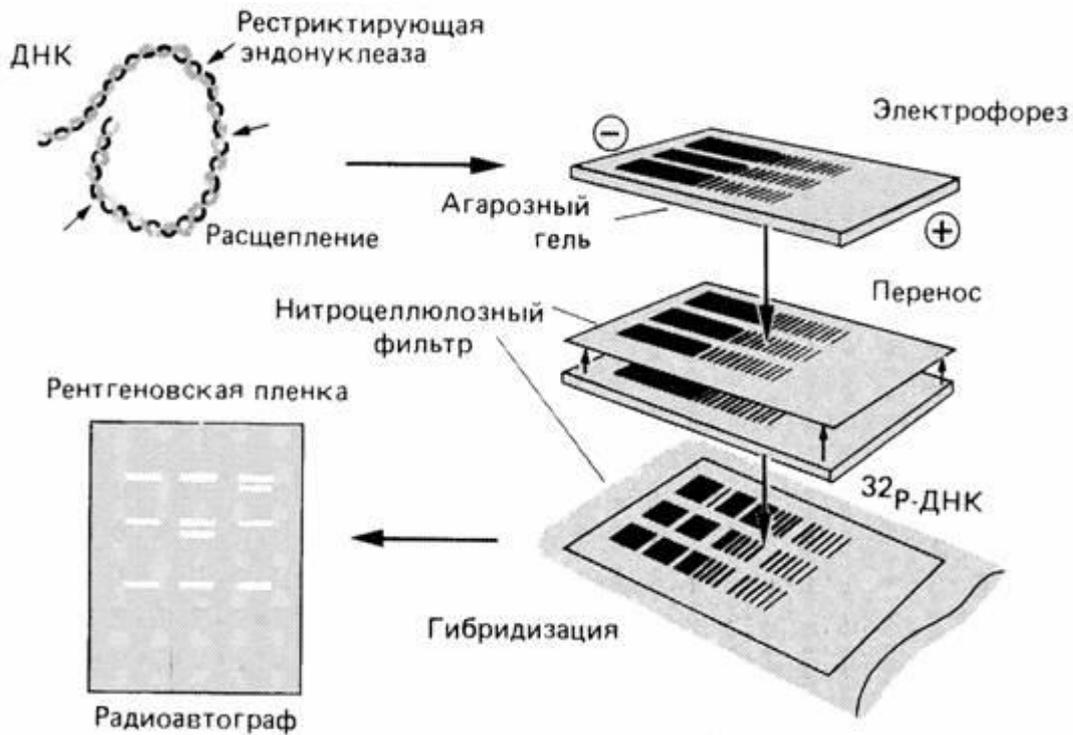


Рис. 15. Схема Саузерн-блот гибридизации (блотинг)



Рис. 16. Прогресс генетической инженерии растений

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Таблица генетического кода

	У	Ц	А	Г	
У	Фен	Сер	Тир	Цис	У
	Фен	Сер	Тир	Цис	Ц
	Лей	Сер	—	—	А
	Лей	Сер	—	Три	Г
Ц	Лей	Про	Гис	Арг	У
	Лей	Про	Гис	Арг	Ц
	Лей	Про	Гли	Арг	А
	Лей	Про	Гли	Арг	Г
А	Иле	Тре	Асп	Сер	У
	Иле	Тре	Асп	Сер	Ц
	Иле	Тре	Лиз	Арг	А
	Мет	Тре	Лиз	Арг	Г
Г	Вал	Ала	Асп	Гли	У
	Вал	Ала	Асп	Гли	Ц
	Вал	Ала	Глу	Гли	А
	Вал	Ала	Глу	Гли	Г

Генетический код имеет следующие свойства:

### 1. **Триплетность.**

Каждая аминокислота кодируется последовательностью из трех нуклеотидов (триплет). Каждый триплет называется *кодоном*.

### 2. **Неперекрываемость.**

Каждый нуклеотид входит в состав лишь одного кодона.

### 3. **Вырожденность.**

Все аминокислоты, за исключением метионина и триптофана, кодируются более чем одним триплетом.

### 4. **Однозначность.**

Каждый кодон кодирует лишь одну аминокислоту.

### 5. **Коллинеарность гена и продукта**

У прокариотов обнаружено линейное соответствие последовательности кодонов гена и последовательности аминокислот в белковом продукте, или, как говорят, существует *коллинеарность* гена и белка, который он кодирует.

### 6. **Универсальность.**

Генетический код един для всех живущих на Земле существ разного уровня сложности – от вирусов до человека.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

### Определение первичной структуры ДНК по Сенгеру (*F.Sanger*)

I. Фрагмент ДНК для определения первичной структуры клонируют в фаге M13, из которого легко выделяют однонитевую ДНК.

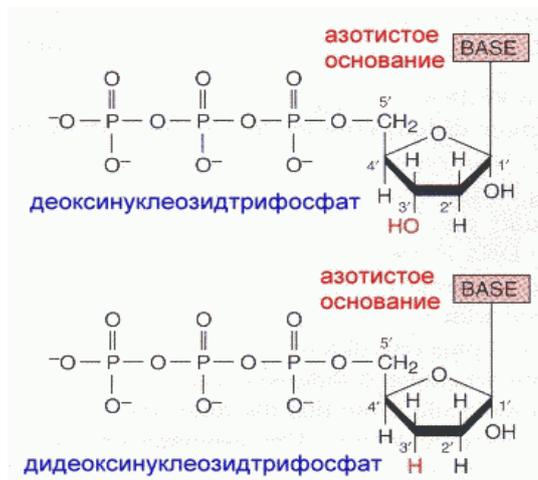
II. ДНК гибридизуют с коротким фрагментом ДНК, называемой праймером, которая связывается с 3'-концом однонитевой ДНК.

III. Затем к полученной матрице добавляют четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата - дНТФ (dNTP):

дАТФ (dATP), дГТФ (dGTP), дТТФ (dTTP), дЦТФ (dCTP).

IV. Кроме дНТФ (dNTP) в реакционную смесь добавляют один из четырех дидеоксирибонуклеозид-трифосфатов (ддНТФ (ddNTP)).

ддНТФ (ddNTP) – это полученный искусственным путем нуклеотид, лишенный 2'- и 3'-гидроксильных групп при углеродных атомах рибозы:



V. Затем с помощью ДНК-полимеразы ведут синтез второй (комплементарной) цепи ДНК.

Остановка синтеза (обрыв цепи) будет происходить всякий раз, когда вместо dNTP в растущую цепь ДНК будет встраиваться соответствующий ему ddNTP.

VI. Для определения последовательности нуклеотидов необходимо поставить 4 отдельные реакции в присутствии каждого из четырех ddNTP.

Соотношение концентраций dNTP и ddNTP подбирают с таким расчетом, чтобы ddNTP оказался включенным по всем позициям в

смеси растущих цепей. В результате, если в пробирке содержится ddGTP, то к концу реакции в ней оказывается набор всех возможных полинуклеотидов, начинающихся с 5'-концевого нуклеотида-праймера и заканчивающихся дидезоксигуанозином (ddGTP).

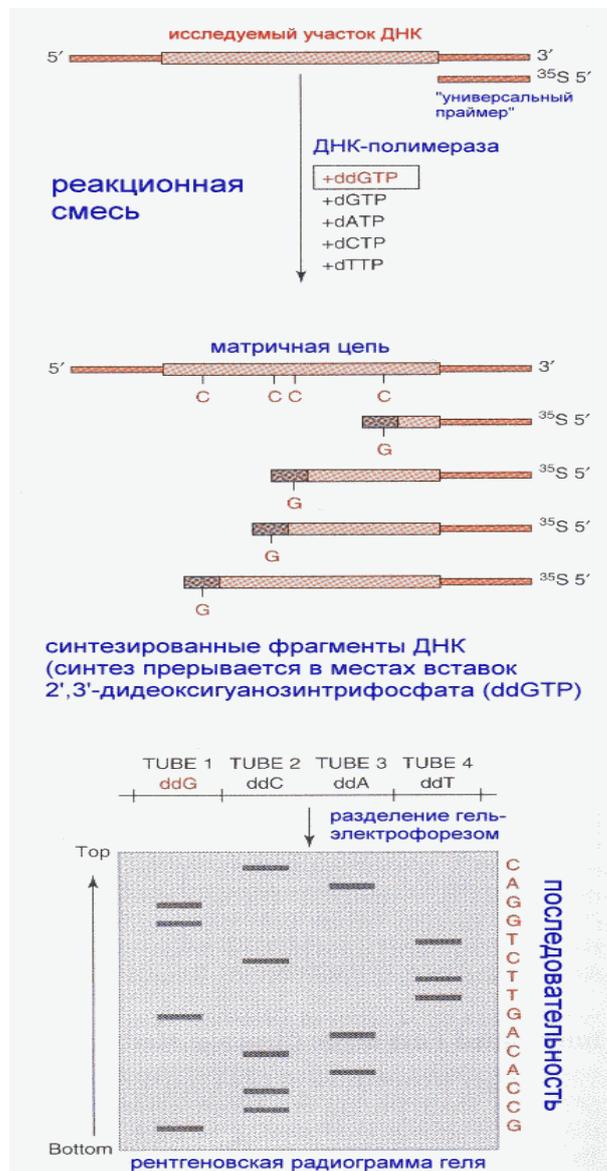


Рис. 17. Схема проведения секвенирования ДНК

VII. Затем четыре пробы вносят в соседние лунки пластины геля и проводят гель-электрофорез. Длина пробега каждого компонента обратно пропорциональна длине цепи.

VIII. Как только фрагменты ДНК визуализированы, нуклеотидную последовательность можно прочесть прямо в геле снизу по направлению к старту в соответствии с очередностью, в которой фрагменты располагаются на отдельных «дорожках».

## ПРИЛОЖЕНИЕ 4

### Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Метод ПЦР – это эффективный способ за небольшой промежуток времени увеличить количество специфической последовательности ДНК в миллионы раз

Что нужно для осуществления ПЦР?

1. Специфическая последовательность ДНК (ДНК-мишень) длиной от 100 п.н. до 35 т.п.н.

2. Два синтетических олигонуклеотидных праймера (затравки), фланкирующих ДНК-мишень и ориентированных в направлении 5'→3' в ее сторону. После отжига праймеры гибридизуются с противоположными нитями ДНК, причем их 3'-гидроксильные концы должны быть ориентированы навстречу друг другу.

3. Термостабильная ДНК-полимераза (Таg-полимераза).

Стандартная ПЦР осуществляется автоматически в термоциклере. Смена типа реакции (плавление ДНК, отжиг с праймерами, полимеризация ДНК) задается изменением температуры реакционной смеси:

- 95 (0,5 мин) – плавление (денатурация ДНК)
- 55 (1,5 мин) – отжиг с праймерами (ренатурация ДНК): при этом происходит связывание праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-мишени;
- 70 °С (1 мин) – полимеризация (синтез комплементарных цепей ДНК, инициируемый 3'-гидроксильными группами праймеров).

Полимеразная цепная реакция осуществляется в одной пробирке, содержащей:

- около 1 мкг ДНК;
- 20 пикомолей каждого праймера;
- по 50 мкмоль каждого dNTP;
- две единицы термостабильной *Taq* ДНК-полимеразы.

Путем многократного повторения трех последовательных реакций достигается эффект умножения специфической последовательности ДНК. В каждом последующем цикле их число удваивается, достигая теоретически к 22-му, а на практике к 30-му ЦИКЛУ БОЛЕЕ МИЛЛИОНА КОПИЙ.

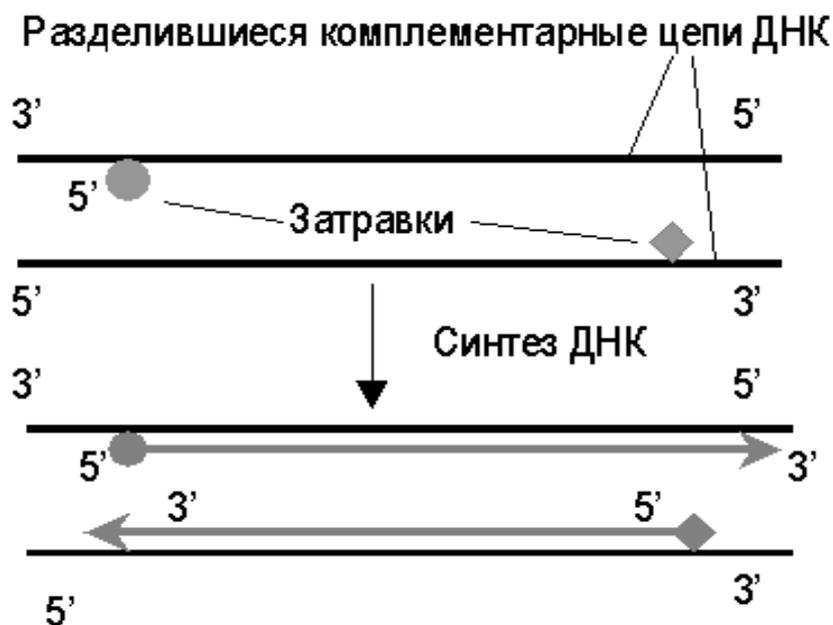


Рис. 18. Гибридизация цепей ДНК с затравками (праймерами) и первый раунд полимеразной реакции

### ПЦР в реальном времени (*PCR real time*)

Полимеразная цепная реакция в реальном времени использует *TaqMan систему*, контролирующую кинетику ПЦР непосредственно в ходе амплификации с использованием *резонансного тушения флуоресценции*.

Для детекции используется зонд, комплементарный средней части амплифицируемого фрагмента. Зонд несет флуорофор и тушитель флуоресценции.

Когда флуорофор и тушитель (гаситель) связаны с олигонуклеотидным зондом, наблюдается лишь незначительная флуоресцентная эмиссия. В ходе ПЦР во время стадии отжига праймеров происходит присоединение ДНК-зонда к комплементарной цепи ДНК (рис.19,1).

Во время стадии элонгации *Taq*-полимераза синтезирует комплементарную цепь ДНК и при достижении зонда начинает расщеплять зонд благодаря наличию 5'-экзонуклеазной активности. При этом происходит разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к увеличению детектируемого свечения (рис. 19,2). Оче-

видно, что чем больше ампликонов было наработано в ходе ПЦР на данный момент времени, тем интенсивнее будет свечение.

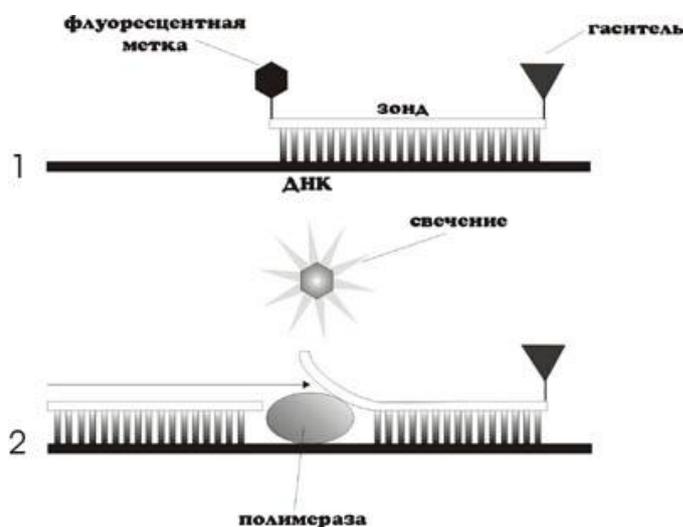


Рис. 19. Принцип аналитического сигнала в методе ПЦР в реальном времени (*PCR real time*)

В современных вариантах ПЦР в «реальном времени» используют одновременно несколько флуоресцентных зондов, меченных разными флуоресцентными красителями («multiplex Real-Time PCR»). Это позволяет детектировать в одной пробирке одновременно несколько продуктов ПЦР.

Во многих современных приборах для ПЦР в «реальном времени» предусмотрены варианты детекции нескольких *флуоресцентных красителей одновременно*. Детекция флуоресцентного сигнала от каждого красителя происходит в определенном для него диапазоне.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 5

### Клонирование структурных генов эукариот: комплементарная ДНК (кДНК)

Клонирование генов эукариот в клетках прокариот требует решения следующих проблем:

1. Прокариоты не способны удалять интроны из первичных транскриптов (пре-мРНК) генов эукариот.

2. Экспрессия ДНК может осуществляться только при наличии сигнальных последовательностей (кэп, поли-А-хвост), регулирующих транскрипцию и трансляцию в клетках эукариот.



Рис. 20. Схема синтеза *in vitro* кДНК – комплементарной ДНК-копии клеточных (функциональных) мРНК

Для клонирования генов эукариот разработаны и применяются другие подходы, включающие следующие этапы:

а) выделение мРНК на хроматографических колонках, заполненных олиго(дТ)-полимером (например, целлюлозой);

б) синтез одноцепочечной кДНК на матрице мРНК с помощью обратной транскриптазы, праймера олиго(дТ) и четырех дНТФ (рис. 20);

в) синтез двухцепочечной кДНК.

Далее кДНК, которая представляет собой гены без интронов, не содержащие регуляторных элементов, встраивают в вектор и осуществляют клонирование.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. СОДЕРЖАНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ И МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ.....	7
1.1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ.....	7
1.1.1. РЕПЛИКАЦИЯ, СОХРАНЕНИЕ И МОДИФИКАЦИЯ ГЕНОМА.....	7
1.1.2. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПЕРЕДАЧИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ.....	10
2.1. ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК.....	14
2.1.1. ИСТОРИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ.....	14
2.1.2. ФЕРМЕНТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ.....	14
2.1.3. ВЕКТОРЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ДНК.....	16
2.1.4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК.....	18
2.1.5. СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК ...	20
2.1.6. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ (ВИРТУАЛЬНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ).....	23
2. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ КОНТРОЛЬНОЙ РАБОТЫ.....	24
3. ВАРИАНТЫ КОНТРОЛЬНЫХ РАБОТ.....	25
4. ТЕМЫ РЕФЕРАТОВ.....	30
5. ВОПРОСЫ К ЗАЧЕТУ.....	30
6. ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ.....	32
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. СХЕМЫ И РИСУНКИ.....	35
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ТАБЛИЦА ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА.....	47
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК ПО СЕНГЕРУ (F.SANGER).....	48
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР).....	50
ПРИЛОЖЕНИЕ 5. КЛОНИРОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ГЕНОВ ЭУКАРИОТ: КОМПЛЕМЕНТАРНАЯ ДНК (КДНК).....	53

Скворцова Наталья Николаевна

# **ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

**Учебно-методическое пособие**

*Ответственный редактор*  
Т.Г. Смирнова

*Титульный редактор*  
Е.О. Трусова

*Компьютерная верстка*  
Н.В. Гуральник

*Дизайн обложки*  
Н.А. Потехина

*Печатается  
в авторской редакции*

---

Подписано в печать 26.03.2015. Формат 60×84 1/16  
Усл. печ. л. 3,49. Печ. л. 3,75. Уч.-изд. л. 3,5  
Тираж 50 экз. Заказ № С 29

---

Университет ИТМО. 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

Издательско-информационный комплекс  
191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

