**Лабораторно-практична робота № 5**

***Організація геномів біоти. Реплікація та репарація ДНК.***

***Реалізація генетичної інформації.***

***Електрофорез і побудова рестрикційних карт.***

***Технологія клонування генів. Полімеразна ланцюгова реакція і секвенування***

# Тема 5.1: ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ БІОТИ

***Мета:*** Вивчити хімічну і просторову будову нуклеїнових кислот. Розглянути різновиди РНК і означити функції, які вони виконують. Структуруйте дані з організації геному вірусів, про- і еукаріот.

***Віруси*** є особливими біологічними структурами. Перш за все виникає питання, чи можна їх вважати живими? Істина залежить від прийнятого визначення життя. Зазвичай віруси вважаються живими за «функціональним» визначенням життя, проте не за «структурним».

***Геном прокаріот*** побудований дуже компактно. Кількість некодуючих послідовностей нуклеотидів мінімальна, інтрони рідкісні. Більше того, у прокаріот для кодування білків часто використовуються дві або всі три рамки зчитування одного і того ж гену. Це підвищує кодуючий потенціал геному без збільшення його розміру. Більшість механізмів регуляції експресії генів, що використовується еукаріотами, ніколи не зустрічаються у прокаріот. Таким чином, простота будови геному прокаріот пояснюється, перш за все, їх спрощеним життєвим циклом, протягом якого прокаріотичні клітини, як правило, не зазнають складних диференціювань, пов’язаних з глобальним перемиканням експресії одних груп генів на інші, або тонкою зміною рівнів їх експресії, що має місце в онтогенетичному розвитку еукаріот.

На відміну від прокаріот основна частина ***геному еукаріот*** знаходиться в спеціальній клітинній органелі (компартменті), який називається *ядро*, а значно менша частина – в *мітохондріях, пластидах і центріолях*. Так само, як і у прокаріот, інформаційною макромолекулою геному еукаріот є ДНК, яка нерівномірно розподілена в декількох хромосомах у вигляді комплексів з численними білками. Ці *ДНК-білкові комплекси* еукаріот отримали назву *хроматину*. Упродовж клітинного циклу хроматин зазнає високовпорядкованих структурних перетворень у вигляді послідовних конденсацій-деконденсацій. У соматичних клітинах при максимальній конденсації в метафазі мітозу ці перетворення супроводжуються формуванням видимих у мікроскопі метафазних хромосом. Як морфологія метафазних хромосом, так і їх число є унікальними характеристиками виду. Сукупність зовнішніх ознак хромосомного набору еукаріот отримала назву *каріотипу*. Геном еукаріот складають унікальні нуклеотидні послідовності (*гени*), а також послідовності різного ступеня повторюваності.

***Завдання 1.*** Опануйте хімічний склад нуклеїнових кислот. Запишіть хімічні формули азотистих основ (пуринових та піримідинових) та замалюйте структурну схему нуклеотида. Надайте означення наступним термінам: *нуклеїнові кислоти, нуклеозид, нуклеотид, ефірний зв’язок, N-глікозидний зв’язок, водневий зв’язок*.

ДНК

# Структура нуклеїнових кислот

РНК

*Таблиця 1*

( ) ( )

***Завдання 2.*** Замалюйте фрагмент молекули ДНК згідно з моделлю, запропонованою Дж. Уотсоном і Ф. Кріком (1953 р.).

***Завдання 3.*** Доповніть інформацію щодо варіантів конформації подвійних спіралей нуклеїнових кислот.

*Таблиця 2*

# Характеристика конформацій подвійних спіралей нуклеїнових кислот

Тип подвійної спіралі

Параметр подвійної спіралі

A B C D Z

Напрям обертання вправо

Кут спірального обертання +35,9° Кут нахилу пари нуклеотидів

до вісі спіралі

-1,2°

Кількість пар основ на виток 10,5

Відстань між парами основ, Å 3,38 Довжина ланцюга напіввитка,

33,2 - -

Å

Діаметр спіралі, Å 23,7

***Завдання 3.*** Охарактеризуйте особливості вірусів і їх геномів.

*Таблиця 3*

Особливості вірусів і їх геномів

Параметр Характеристика

Будова

Геном

***Завдання 4.*** Охарактеризуйте особливості геномів клітинних форм життя.

*Таблиця 4*

Параметр

Стан (форма спадкового матеріалу) Локалізація й розміри

Організація генів

Система реплікації ДНК

Система експресії генів

Інше

Особливості геномів клітинних форм життя

Клітинна форма життя

еубактерії археї еукаріоти

***Питання для самоконтролю:***

1. *Яка будова та функції нуклеїнових кислот?*
2. *Умови існування та джерела різних типів спіралей нуклеїнових кислот.*
3. *Правила Е. Чаргаффа.*
4. *Особливості вірусів і їх геномів.*
5. *Поняття, будова і функції гену про- та еукаріот.*

# 5.2. Тема: РЕПЛІКАЦІЯ ТА РЕПАРАЦІЯ ДНК

***Мета:*** Опанувати особливості реплікації нуклеїнових кислот та визначити роль ферментів, залучених до неї. Окреслити причини виникнення мутацій та механізми захисту від них.

Для того щоб дочірні клітини за своєю структурою і функціями були точною копією батьківських клітин-попередників, вони повинні отримати від батьківських клітин повний набір генетичної інформації у вигляді геномної ДНК, яка організована в хромосомах, і позахромосомних генетичних елементах (плазмідах, мітохондріальній і пластидній ДНК тощо). У зв’язку з цим перед батьківськими клітинами постає завдання створення точної копії геному та її правильної передачі дочірнім клітинам. Створення такої копії геномної ДНК в батьківських клітинах стає можливим завдяки наявності в них спеціальних ферментних систем, що здійснюють ***подвоєння молекул ДНК***. У результаті ***реалізації*** послідовності ферментативних реакцій на матриці батьківських ДНК відбувається біосинтез дочірніх молекул, які є точною копією вихідних молекул. Цей процес подвоєння батьківських молекул геномної ДНК під час відтворення клітин живого організму отримав назву ***реплікації,*** або ***реплікативного синтезу ДНК.***

Реплікацію ДНК здійснює складний ферментний (реплікативний) комплекс, що складається з 15-20 різних білків і називається ***реплісомою***(англ. *replisome*). Головним ферментом при цьому виступає ***ДНК-залежні ДНК- полімерази***. За правилами комплементарності положення кожного наступного нуклеотиду споруджуваного ланцюга ДНК однозначно визначається положенням відповідного нуклеотиду матриці.

Велика група молекулярно-генетичних явищ, відома нині під загальною назвою **«репарація пошкоджень ДНК»,** була усвідомлена як окремий і дуже важливий біологічний феномен лише наприкінці 1950-х років. ***Репарація***(лат. *Reparatio* – відновлення) – особлива функція клітин, яка полягає в здатності виправляти хімічні пошкодження і розриви в молекулах ДНК, які виникають при нормальному біосинтезі ДНК у клітині або в результаті впливу фізичних чи хімічних агентів.

Систематизація наявних даних про репарацію дозволила всі відомі системи об’єднати в три групи: **пряма, ексцизійна та постреплікативна репарації.** Варто відмітити, що різні механізми репарації характеризуються здатністю корегувати однакові пошкодження ДНК.

***Завдання 1.*** Охарактеризуйте загальні принципи реплікації нуклеїнових кислот. Надайте означення наступним термінам: *реплікація, реплісома, реплікон, реплікатор, контроль реплікації, механізм реплікації, етапи реплікації.*

***Завдання 2.*** Опануйте принципи реплікації ДНК прокаріот. Надайте означення наступним термінам і характеристику ферментам, задіяним у реплікації: *реплікативні вила, лідируючий ланцюг, відстаючий ланцюг, фрагменти Оказакі, затравки (праймери), процесивність.*

***Рис. 1.* Схема реплікативних вил *E. coli***

*Таблиця 6*

# Особливості будови ферментів й виконувані ними функції

Назва ферменту Топоізомераза

Особливості будови й виконувані функції

ДНК-геліказа

ДНК-праймаза

ДНК-полімераза ІІІ

РНКаза Н

ДНК-полімераза І

ДНК-лігаза

***Завдання 3.*** Охарактеризуйте родину ДНК-полімераз еукаріот: *ДНК- полімераза α, ДНК-полімераза δ, ДНК-полімераза ε, ДНК-полімераза γ, теломераза.*

***Завдання 4.*** Охарактеризуйте мутагенні чинники та механізми превентивного захисту геному від них: *помилки реплікації, мутагенне випромінювання, хімічні мутагени, ендогенні мутагени, рівні превентивного захисту ДНК.*

***Питання для самоконтролю:***

***Завдання 5.*** Охарактеризуйте системи репарації ДНК: *репарація, пряма репарація, ексцизійна репарація, постреплікативна репарація*.

1. *Як відбувається реплікація ДНК та за участю яких ферментів?*
2. *Принципи реплікації ДНК прокаріот.*
3. *Характеристика родини ДНК-полімераз еукаріот.*
4. *Мутагенні чинники та механізми превентивного захисту геному від них.*
5. *Системи репарації ДНК.*

# 5.3. Тема: РЕАЛІЗАЦІЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ.

***Мета:*** Описати й опанувати загальні особливості експресії генів та її етапів, визначивши роль ферментів у них. Охарактеризувати різновиди РНК. Здійснити моделювання синтезу білків.

Під час передачі генетичної інформації від генів до молекулярних об’єктів, яким вона адресована по існуючих каналах зв’язку, має місце її багаторазове декодування і перекодування аж до остаточного втілення у фенотипових ознаках. Тобто відбувається *експресія генів*. Спрощуючи наведене визначення можна тлумачити експресію генів як процес реалізації генетичної інформації. Для повноти розуміння цього явища необхідно знати що таке ген. Отже, *ген* – це найменша структурно-функціональна одиниця спадкового матеріалу, яка відповідає за формування певної елементарної ознаки.

Кінцевим результатом експресії генів має бути утворення повноцінних у функціональному відношенні макромолекул білків або нуклеїнових кислот, які формуватимуть певний фенотип організму.

На першому етапі експресії генів відбувається переписування генетичної інформації, закодованої в генах, на матричні (інформаційні) РНК (м(і)РНК), які є місцем проміжного зберігання цієї інформації при її реалізації. У деяких випадках вже самі РНК є кінцевим результатом експресії генів, і після низки ферментативних модифікації вони безпосередньо використовуються в клітинних процесах. Це стосується, перш за все, рибосомних і транспортних РНК (рРНК і тРНК), які разом складають основну частину сумарної РНК клітини. Окрім того, до таких РНК належать і малі ядерні РНК (мяРНК), які приймають участь у процесингу попередників мРНК еукаріот, а також РНК, які входять до складу ферментів, і природні антисенсові РНК. В цілому синтез РНК відбувається в результаті складної послідовності біохімічних реакцій, яка називається *транскрипція*. На другому етапі реалізації генетичної інформації – *трансляції* – послідовність нуклеотидів мРНК відповідно до генетичного коду однозначно визначає послідовність амінокислотних залишків синтезованих білків.

***Завдання 1.*** Надайте означення термінам: *ген, експресія генів, головна догма молекулярної біології.* Охарактеризуйте загальні особливості експресії генів.

*Таблиця 7*

Загальні

**Типи передачі спадкової інформації**

Особливі Невідомі

1.

2.

3.

1.

2.

3.

1.

2.

3.

***Завдання 2.*** Опануйте принципи та етапи транскрипції. Надайте означення термінам: *транскрипція, фактори транскрипції, промотор, термінатор, транскриптон, кодуючий (матричний) ланцюг, некодуючий (захисний) ланцюг, оперон, цистрон*.



*Рис. 2.* Цикл транскрипції

*Таблиця 8*

# Характеристика етапів транскрипції

Етап

Характеристика

Зв’язування (преініціація)

Ініціація

Елонгація

Термінація

***Завдання 3.*** Охарактеризуйте родину РНК-полімераз і промоторів відповідних ферментів еубактерій та еукаріот (Pol II): *РНК-полімераза*

*еубактерій, РНК-полімераза І еукаріот, РНК-полімераза ІІ еукаріот, РНК- полімераза ІІІ еукаріот, РНК-полімераза мітохондрій, РНК-полімерази пластид, РНК-полімераза архей.*



*Рис. 3.* **Структура промотору еубактерій**



# *Рис. 4.* Структура промотору еукаріот для РНК-полімерази ІІ

***Завдання 4.*** Охарактеризуйте загальні особливості РНК (*РНК, основні родини РНК*), їх типи (*матрична РНК, транспортні РНК, рибосомальні РНК, транспортно-матрична РНК*) та функції (*реплікативна, кодуюча, регуляторна, структуроутворююча, впізнання, каталітична*).



*Рис. 5.* **Будова тРНК (вторинна і третинна структури)**



# *Рис. 6.* Вміст рРНК в рибосомах про- та еукаріот



*Рис. 7.* **Третинна і вторинна структури тмРНК**

***Завдання 5.*** Поясніть суть і значення етапів процесингу РНК еукаріот. Надайте означення наступним термінам: *кепування, поліаденілювання, сплайсинг, екзони, інтрони, донор сплайсингу, акцептор сплайсингу, точка розгалудження інтрону, сплайсосома, аутосплайсинг, альтернативний сплайсинг, транс-сплайсинг, редагування мРНК*.



*Рис. 8.* **Механізм сплайсингу**

***Завдання 6.*** Охарактеризуйте генетичний код і його властивості. Надайте означення наступним термінам: *генетичний код, триплет, кодон, старт-кодон, стоп-кодони, ізоакцепторні кодони, властивості генетичного коду*.

***Завдання 7.*** Опишіть принципи будови і функціонування рибосом, зокрема і їх сайтів зв’язування з РНК.



# *Рис. 9.* Схема сайтів зв’язування з РНК на рибосомі

(А – аміноацил-тРНК-зв’язуюча (акцепторна) ділянка; Р – пептидил- тРНК-зв’язуюча (донорна) ділянка; Е – ділянка виходу тРНК (англ. exit).

***Завдання 8.*** Надайте загальні відомості механізму трансляції і її етапів: *трансляція, трансляція і транскрипція у прокаріот, трансляція і транскрипція у еукаріот, активація тРНК, ініціація, елонгація, термінація*.



*Рис. 10.* **Схема циклу трансляції**

***Питання для самоконтролю:***

1. *Що таке транскрипція РНК? Локалізація, ферменти, що задіяні, та етапи процесу.*
2. *Характеристика родини РНК-полімераз.*
3. *Загальні особливості РНК, їх типи та функції.*
4. *У чому полягає суть дозрівання мРНК еукаріот?*
5. *Що називається генетичним кодом та які властивості йому характерні?*
6. *Принципи будови і функціонування рибосом.*
7. *Охарактеризуйте етапи трансляції білка та які чинники залучені до цього процесу?*

# 5.4. Тема: ЕЛЕКТРОФОРЕЗ І ПОБУДОВА РЕСТРИКЦІЙНИХ КАРТ

***Мета:*** Вивчити принципи, особливості проведення, різновиди і значення електрофорезу. Навчитись складати карти сайтів рестрикції лінійних і кільцевих молекул ДНК.

*Електрофорез* – рух дисперсних твердих частинок, рідинних крапель або газових пухирців, йонів тощо завислих в рідинному або газоподібному середовищі в електричному полі постійного струму під дією електрокінетичних сил, що виникають завдяки утворенню подвійного електричного шару на межі розділу фаз. Розрізняють два різновиди електрофорезу: *катафорез* – випадок електрофорезу, при якому частинки дисперсної фази рухаються в напрямку катоду і *анафорез*, коли дисперсійні часточки рухаються до аноду.

Сили електричного поля, що прикладаються до зразків, змушують фрагменти ДНК мігрувати крізь гель. Для електрофоретичного аналізу ДНК зазвичай використовують агарозний (для відносно довгих молекул ДНК) і поліакриламідний (для високоточного розділення коротких молекул ДНК, наприклад, у випадку секвенування) гелі. Цукрофосфатний остов молекул ДНК заряджений негативно і тому ланцюги ДНК рухаються від катода, зарядженого негативно, до позитивного анода. Більш довгі молекули мігрують повільніше, оскільки затримуються в гелі, більш короткі молекули рухаються швидше. У рідкому розчині здійснити процедуру відокремлення фрагментів ДНК не можливо, тому в якості носія використовують гель-концентрований розчин полімеру.

Перед початком електрофорезу до зразків прийнято додавати два різних барвника з кислим значенням pH (часто для цих цілей використовують, ксіленовий блакитний і бромфеноловий синій), щоб візуалізувати хід електрофорезу. Барвник також необхідний для того, щоб визначити, коли варто зупинити процес.

Обробка зразка ДНК певною рестриктазою ІІ класу завжди дає один той самий набір фрагментів – за умовою, що розщеплення відбувається по всіх сайтах розпізнавання. Якщо використовувати декілька ферментів рестрикції і спочатку обробляти ДНК кожною з рестриктаз окремо, а потім їх комбінаціями, можна побудувати фізичну карту даної ДНК. Тобто встановити порядок розташування сайтів рестрикції уздовж молекули. Визначивши розмір отриманих фрагментів за допомогою гель-електорофезу можна знайти положення сайтів рестрикції (здійснити *картування*).

***Завдання 1.*** Охарактеризуйте принципи електрофорезу: *електрофорез, використання барвників, буферний розчин, визначення розмірів фрагментів*.



*Рис. 11.* **Принципова схема електрофорезу**

(А – чарунка, куди поміщають зразок ДНК; В – напрям руху фрагментів ДНК)

***Завдання 2.*** Опишіть особливості різновидів електрофорезу та у яких галузях суспільного життя вони використовується: *горизонтальний електрофорез, вертикальний електрофорез, електрофорез у медицині, електрофорез у наукових дослідженнях*.

***Завдання 3.*** Опишіть процедуру побудови рестрикційної карти та розберіть поданий приклад: *рестрикційна карта*.





***Завдання 4.*** Виконайте наступні задачі.

1. Віріонну (лінійну) ДНК бактеріофага *λ* обробили рестриктазою *Pvul*, рестриктазою *Ncol*, а також сумішшю обох рестриктаз. Продукти реакцій розділили в агарозному гелі і пофарбували бромистим етидієм. Цифри праворуч вказують приблизні розміри фрагментів у п.н. Визначте координати сайтів *Pvul* і *Ncol* в ДНК фага *X*.





1. Плазмідну ДНК обробили рестриктазами *ВсlІ*, *Нin1І* і їх сумішшю. Продукти реакцій розділили в агарозному гелі і пофарбували бромистим етидієм. Цифри праворуч вказують приблизні розміри фрагментів у п.н. Побудуйте рестрикційну карту плазміди.



1. Лінійний фрагмент ДНК обробили рестриктазою *EcoR1*, рестриктазою *Sal1* і їх сумішшю. Продукти реакцій розділили в

агарозному гелі і пофарбували бромистим етидієм. Цифри праворуч вказують приблизні розміри фрагментів у п.н. Побудуйте рестрикційну карту фрагменту.

***Питання для самоконтролю:***

1. *Характеристика принципів електрофорезу.*
2. *Особливості різновидів електрофорезу та у яких галузях суспільного життя вони використовується.*
3. *Опишіть процедуру побудови рестрикційної карти.*

# 5.5. Тема: ПОЛІМЕРАЗНО ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ І СЕКВЕНУВАННЯ

***Мета:*** Опанувати суть і послідовність проведення ПЛР та напрями її застосування. Засвоїти поняття і принципи проведення секвенування класичними й сучасними методами.

*Полімеразна ланцюгова реакція* (*ПЛР*) – експериментальний метод молекулярної біології, який дозволяє досягти значного збільшення малих концентрацій певних фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК) в біологічному матеріалі (пробі).

Окрім *ампліфікації* ДНК (збільшення копій), ПЛР дозволяє здійснювати безліч інших маніпуляцій з нуклеїновими кислотами (введення мутацій, зрощення фрагментів ДНК) і широко використовується в біологічній і медичній практиці, наприклад, для діагностики захворювань (спадкових, інфекційних), для встановлення батьківства, для клонування генів, виділення нових генів, тощо.

Ідея методу і її втілення дуже прості. Спочатку синтезуються два дезоксиолігонуклеотиди довжиною 20-30 основ, що є кінцевими послідовностями фрагменту ДНК, який вивчають. Полярність обрана так, щоб після відпалу їх напрями (5’→3’) були звернені один до одного. Надмірну кількість цих олігонуклеотидів змішують з ДНК геному, і суміш нагрівають для денатурації останньої. Зниження температури призводить до реасоціації олігонуклеотидів з гомологічними ділянками ДНК генома. У подальшому проводять нарощування ланцюга за участю ДНК-полімерази і дезоксирибонуклеотидтрифосфатів. Така послідовність реакцій денатурації, реасоціації і нарощування ланцюга повторюється 20-30 разів.

На практиці ефективність кожного циклу ампліфікації складає 20-50%, тобто при проведенні достатнього числа циклів можна досягти збільшення кількості специфічної послідовності до мільйону копій.

*Секвенування ДНК* – набір біохімічних методів встановлення послідовності нуклеотидних основ ДНК: аденіну, гуаніну, цитозину і тиміну.

Послідовність ДНК кодує спадкову генетичну інформацію живих клітин та деяких органел, що закладує основу програм розвитку всіх живих організмів. Таким чином, визначення послідовності ДНК корисне як для дослідження всіх фундаментальних біологічних процесів, так і для прикладних методів, таких як діагностика захворювань та судова медицина.

У біотехнології рекомбінантних ДНК зазвичай використовують два різних методи секвенування ДНК: хімічний та ферментативний. Обидва методи надзвичайно надійні, швидкі у виконанні і результативні. Результати секвенування дозволяють на основі генетичного коду визначити амінокислотну послідовність білка відповідно до нуклеотидної послідовності певного гена.

Схема *хімічного методу секвенування ДНК* передбачає, що вихідний фрагмент ДНК, мічений 32Р на 5’-кінці, піддається специфічному розщепленню за певним нуклеотидом (наприклад, А), в результаті чого утворюються

фрагменти різної довжини.

Першим методом прямого *ферментативного секвенування ДНК* став метод, запропонований Frederick Sanger (нар. 1918) і Alan R. Coulson у 1975 р.

У якості матриці в реакції полімеразного копіювання використовувався одноланцюговий фрагмент ДНК, у якості праймерів – синтетичні олігонуклеотиди або природні субфрагменти, що отримані при гідролізі рестрикційнимі ендонуклеазами, а в якості ферменту – фрагмент Кленова ДНК полімерази I (PolI) з E.coli.

***Завдання 1.*** Охарактеризуйте полімеразно ланцюгову реакцію (ПЛР): *полімеразно ланцюгова реакція, вихідні компоненти ПЛР, послідовність проведення ПЛР*.

*Рис. 12.* **Принципова схема ПЛР**

***Завдання 2***. Опишіть у яких галузях суспільного життя застосовується полімеразно ланцюгова реакція: *аналіз довжин рестрикційних фрагментів, криміналістика, встановлення батьківства, медична діагностика, клонування генів, секвенування ДНК, мутагенез*.

*Рис. 13.* Принципова схема методу ПДРФ

25

***Завдання 3.*** Опишіть принципи класичних методів секвенування:

*секвенування, хімічне секвенування, ферментативне секвенування*.



# *Рис. 14.* Схема хімічного методу секвенування ДНК



*Рис. 15.* **Схема ферментативного секвенування ДНК**

26

***Завдання 4.*** Опишіть на вибір один з методів секвенування нового покоління: *піросеквенування, метод Illumina, SOLiD, істинне одномолекулярне секвенування, одномолекулярне секвенування у реальному часі, іонне напівпровідникове секвенування, нанопорове секвенування*.

***Питання для самоконтролю:***

1. *Охарактеризуйте ПЛР.*
2. *У яких галузях суспільного життя застосовується ПЛР?*
3. *Напрями використання ПЛР у тваринництві.*
4. *Надайте визначення, опишіть різновиди і значення секвенування.*
5. *Методи секвенування нового покоління.*

**Зробіть висновки.**

***Джерело:* Генна інженерія у тваринництві**: ***Методичні вказівки*** до проведення практичних занять для здобувачів третього (освітньо-наукового) рівня вищої освіти ступеня доктора філософії (PhD) спеціальностей **204 «Технологія виробництва та переробки продукції тваринництва»** / Розробник: Сусол Р. Л. Одеса: ОДАУ, 2020. 49 с.