

Документ подписан простой электронной подписью  
Информация о владельце:  
ФИО: Локтионова Оксана Геннадьевна  
Должность: проректор по учебной работе  
Дата подписания: 02.10.2023 16:35:04  
Уникальный программный ключ:  
0b817ca911e6668abb13a5d426d39e5f1c11eabbf75e945d14a4851fda56d089

## МИНОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Юго-Западный государственный университет»  
(ЮЗГУ)

Кафедра биомедицинской инженерии

УТВЕРЖДАЮ  
Проректор по учебной работе  
О.Г. Локтионова  
« 21 » 09 2023 г.



## МЕДИЦИНСКАЯ БИОЛОГИЯ И ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

Методические указания по выполнению практических работ  
для студентов направления  
30.05.03 «Медицинская кибернетика»

Курск 2023

УДК 576.3:575

Составитель: Н.М. Агарков

Рецензент

Доктор медицинских наук, профессор *В.А. Иванов*

**Медицинская биология и общая генетика:** методические указания по выполнению практических работ для студентов направления 30.05.03 «Медицинская кибернетика» / Юго-Зап. гос. ун-т; сост.: Н.М. Агарков. – Курск, 2023. – 34 с.

Содержат методические указания к выполнению практических работ по дисциплине «Медицинская биология и общая генетика». Приведена краткая теоретическая информация.

Методические указания соответствуют требованиям федеральных государственных образовательных стандартов.

Предназначены для студентов направления 30.05.03 «Медицинская кибернетика», а также других специальностей, изучающих «Медицинская биология и общая генетика».

Текст печатается в авторской редакции

Подписано в печать . Формат 60x84 1/16.  
Усл.печ. л. \_\_. Уч.-изд. л. \_\_. Тираж 30 экз. Заказ *610*. Бесплатно.  
Юго-Западный государственный университет.  
305040, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.

**СОДЕРЖАНИЕ**

Практическая работа №1. Цитоморфология клеток.....	4
Практическая работа №2. Структурно-функциональная организация про- и эукариотических клеток.....	7
Практическая работа №3. Типы клеточной организации.....	11
Практическая работа №4. Введение в культуру клеток и тканей.....	13
Практическая работа №5. Современная теория гена. Закономерности наследования признаков.....	14
Практическая работа №6. Цитогенетический, близнецовый, генеалогический, популяционно-статистический и биохимический методы изучения генетики человека.....	22
Практическая работа №7. Строение, свойства и обмен нуклеиновых кислот. Синтез белков и его регуляция.....	23
Практическая работа №8. Геномные технологии и ДНК-диагностика.....	28

## Практическая работа №1. Цитоморфология клеток

Клетка – элементарная живая система, обладающая способностью к обмену с окружающей средой, лежит в основе строения, развития и жизнедеятельности животных и растительных организмов. Наука о клетке называется цитологией (греч. *cytos* - клетка, *logos* - наука). Впервые название "клетка" в 1665 г. применил в Англии Роберт Гук, который, рассматривая тонкий срез пробки с помощью сконструированного им микроскопа, увидел, что пробка состоит из ячеек. Клетки существуют как самостоятельные организмы (например, простейшие, бактерии), так и в составе многоклеточных организмов, в которых имеются половые клетки, служащие для размножения, и клетки тела (соматические), различные по строению и функциям (например, нервные, костные, секреторные и др.).

Размеры клеток человека находятся в диапазоне от 7 мкм (лимфоциты) до 200-500 мкм (женская яйцеклетка, гладкие миоциты). В теле человека имеется большое количество клеток: от  $2 \times 10^{12}$  до  $10^{14}$ .

Основными частями клетки являются: ядро, цитоплазма, клеточная оболочка (цитолемма).

В процессе эволюции многоклеточных организмов сформировались различные типы клеток (эпителиальные, соединительные, мышечные, нервные и др.). Каждая клетка состоит из ядра и цитоплазмы, отделённых друг от друга и от окружающей среды оболочками. Размеры: от 5-10 до 200 и более мкм.

Ядро является носителем генетической информации. Состоит из ядерной оболочки, кариоплазмы и одного или нескольких ядрышек. В ядре сосредоточена основная масса дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

- Ядерная оболочка образована наружной и внутренней липопротеидными мембранами, между которыми расположено перинуклеарное пространство, сообщающееся с канальцами эндоплазматической сети. Наружная ядерная мембрана связана с рибосомами к внутренней прилегает периферический хроматин кариоплазмы. Ядерная оболочка является основной структурой, регулирующей обмен между ядром и цитоплазмой.

- Кариоплазма. Основная часть ядерного содержимого состоит из хроматина, взвешенного в ядерном соке. В основе хромосом лежат элементарные нити, образованные двойной спиралью ДНК и связанными с ней белками гистонами.

- Ядрышко. Состоит из 3 компонентов: фибрилл, гранул и аморфного матрикса. Соотношение между этими компонентами зависит от функционального состояния ядрышка: при интенсивном синтезе РНК преобладает гранулярная часть.

Ядро выполняет генетическую и метаболическую функции.

Генетическая функция ядра заключается в передаче наследственной информации вновь образующимся клеткам. Это происходит во время деления клетки путём распределения ядерного материала (хромосом) между дочерними клетками.

Метаболические функции, связанные главным образом с транскрипцией, осуществляются хромосомальными микрофибриллами (синтез мРНК) и ядрышком (синтез рибосомальной РНК и сборка предшественников рибосом). В ядерной оболочке происходят процессы образования макроэргических фосфатов и реакции промежуточного метаболизма. Через ядерную оболочку осуществляется ядерно-цитоплазматические взаимодействия.

Цитоплазма характеризуется наличием специализированных структур выполняющих специфические функции. В цитоплазме клетки происходит синтез белков, липидов, углеводов, витаминов, осуществляются процессы дыхания и обмена веществ.

Плазматическая мембрана (клеточная оболочка) образует поверхность клетки, через неё осуществляется обмен веществ между клеткой и окружающей средой, а также взаимодействие с другими клетками (агрегация, контакты и т.п.). Обладая избирательной проницаемостью для некоторых веществ, она обеспечивает постоянство внутренней среды клетки. Клеточная оболочка образована белками, фосфолипидами и полисахаридами. Структурно она представляет трёхслойное образование толщиной около 6-10 нм, наружный и внутренний слой которого состоит из белков, а промежуточный из фосфолипидов.

Гиалоплазма (основное вещество цитоплазмы, матрикс) является внутренней средой клетки, в которой осуществляются процессы обмена и поддерживается клеточный гомеостаз. В гиалоплазме расположены различные внутриклеточные структуры. В состав гиалоплазмы входят вода, белки, липиды, нуклеиновые кислоты, промежуточные продукты их обмена, а также ферменты и неорганические вещества.

В гиалоплазме расположены 3 группы внутриклеточных структур: органоиды, метаплазматические образования и включения.

К постоянным структурам гиалоплазмы относят митохондрии

эндоплазматическую сеть, рибосомы, комплекс Гольджи, лизосомы, клеточный центр, цитоплазматические микротрубочки, микрофибриллы, а также микротельца или пироксисомы.

Митохондрии. В световом микроскопе имеют вид небольших гранул размером 0,2 – 2,0 мкм. Основой ультраструктуры являются трехслойные липопротеидные мембраны. Митохондрии ограничены оболочкой состоящей из наружной и внутренней мембраны. Складки (кристы) внутренней мембраны вдаются в гомогенный матрикс, заполняющий внутреннюю камеру митохондрии. Митохондрии – самовоспроизводящиеся структуры с собственной ДНК и рибосомной, белоксинтезирующей системой. Митохондрии, осуществляют процессы окисления и накопления энергии, служат «энергетической станцией» клетки.

Эндоплазматический ретикулум, или эндоплазматическая сеть, представляет собой систему внутриклеточных канальцев, вакуолей и цистерн, ограниченных цитоплазматическими мембранами. Благодаря такому разделению внутреннего пространства достигается возможность одновременного осуществления различных процессов в разных зонах клеток. Эндоплазматическая сеть связана с плазмолеммой, перинуклеарным пространством ядерной оболочки, а также комплексом Гольджи.

Рибосомы, или гранулы Пеллеяда, РНП-гранулы – плотные сферические частицы (диаметр 15 – 30 нм). Содержат почти равные количества белка и РНК. Рибосомы являются местом синтеза клеточных белков. Во время синтеза белка они объединяются в полисомы.

Комплекс Гольджи имеет вид сложных сетевидных структур, расположенных около ядра или клеточного центра. Ультраструктура образована: системой уплощенных цистерн, мелкими везикулами и крупными вакуолями. В нем накапливаются параплазматические образования (гранулы секрета, желтка, липидов, акросомы спермиев и др.), синтезируются полисахариды и гликопротеиды.

Лизосомы – небольшие тельца, ограниченные однослойной мембраной. К ним относят первичные и вторичные лизосомы, остаточные тельца. Происхождение лизосом связывают с богатой ферментами гидролизами специализированной областью агранулярной эндоплазматической сети, которая лежит между клеточным ядром и наиболее глубокими цистернами комплекса Гольджи. С лизосомами связаны процессы внутриклеточного пищеварения и защитные реакции.

Клеточный центр состоит из хромофильных телец-центриолей,

окружённых центросферой. Участвует в локомоторных функциях клетки.

Цитоплазматические микротрубочки играют роль скелета клетки, участвуют в различных формах движения клетки, во внутриклеточном транспорте некоторых веществ.

Микрофибриллы пронизывают цитоплазму в различных направлениях. Их рассматривают как опорные или сократительные элементы.

Микротельца – это цитоплазматические образования, которые ограничены одинарной мембраной, содержат в мелкозернистом матриксе плотную сердцевину (нуклеоид), либо лишены её. Для всех микротельца характерно наличие каталазы (расщепление перекиси водорода) и некоторых окислительных ферментов (уратооксидаза, оксидаза – Д-аминокислот).

### **Контрольные вопросы**

- 1 Что такое клетка?
- 2 Каково строение и функции ядра?
- 3 Что такое плазматическая мембрана?
- 4 Что такое гиалоплазма?
- 5 Каково строение и функции митохондрии?
- 6 Каково строение и функции рибосомы?
- 7 Каково строение и функции Комплекса Гольджи?
- 8 Что такое микротельца?
- 9 Каково строение и функции ЭПС?
- 10 Каково строение и функции клеточного центра?

### **Практическая работа №2. Структурно-функциональная организация про- и эукариотических клеток**

В составе эукариотической клетки различают три основных структурных компонента: поверхностный аппарат, цитоплазма и ядро.

#### **I. Поверхностный аппарат клетки.**

Взаимодействие клетки с внешней средой и окружающими клетками осуществляется посредством поверхностного аппарата. Его основные функции определяются пограничным положением и включают:

- барьерную (разграничительную) функцию, обеспечивая селективный, регулируемый, пассивный и активный обмен веществ;

- функцию распознавания других клеток и компонентов межклеточного вещества;
- рецепторную функцию, включая взаимодействие с сигнальными молекулами (гормоны, медиаторы и т.п.);
- транспортную функцию;
- двигательную функцию посредством образования псевдо-, фило- и ламеллоподий);
- матричную, определяя взаимное расположение и ориентацию мембранных белков, что обеспечивает их оптимальное взаимодействие (например, оптимальное взаимодействие мембранных ферментов);
- формообразующую (для мембранных органоидов);
- механическую, обеспечивая прочность и автономность клеточных структур;
- энергетическую (синтез АТФ на внутренних мембранах митохондрий);
- функцию генерации и проведения биопотенциалов; и многие другие функции.

Поверхностный аппарат клетки состоит из плазмалеммы (плазматической мембраны), надмембранного и подмембранного комплексов.

Плазмалемма (плазматическая мембрана) образована в основном белками и липидами в количественном соотношении примерно 1:1 (у прокариот в плазматической мембране преобладают белки). Первая, так называемая, «бутербродная» модель организации плазмалеммы, была предложена в 1935 г. Дж. Даниэли и Г. Дэвсоном.

Согласно этой модели, мембрана трехслойная, ее основу составляет двойной слой липидных молекул (билипидный слой). Липиды обращены друг к другу гидрофобными участками (хвостами), а внутрь и наружу – гидрофильными головками молекул. Эти внутренняя и наружная поверхности билипидного слоя покрыты слоями белковых молекул; образуется нечто вроде бутерброда: масло – липиды, между двумя «ломтями булки» – белками. В последующем ультраструктурные исследования с помощью электронного микроскопа в середине 50-х гг. подтвердили модель Даниэли и Дэвсона: в клетках была выявлена трехслойная мембрана толщиной 7,5–11 нм, состоящая из среднего светлого слоя и двух периферических темных (электронно-плотных) слоев. Светлый слой соответствовал гидрофобной части билипидного слоя, а темный слой – сплошным поверхностным слоям белка и гидрофильным головкам липидных молекул.



К концу 60-х гг. накопилось достаточное количество фактов, необъяснимых с позиций «бутербродной» модели, что повлекло разработку новых моделей мембран, в том числе таких, которые основывались на существовании гидрофобно-гидрофильных взаимодействий между липидными и белковыми молекулами. Среди них – модель «липопротеинового коврика» и жидкостно-мозаичная модель С. Зингера и Г. Николсона, которая была предложена в 1972 году.

К настоящему времени модель Зингера-Николсона получила многочисленные обоснования и стала наиболее распространенной. Согласно жидкостно-мозаичной модели С. Зингера и Г. Николсона, в состав мембраны входят белки, которые перемещаются в жидкой липидной фазе, обеспечивая динамичность и лабильность всей системы мембраны.

Основные физико-химические свойства мембраны обеспечивает билипидный слой, который представлен, главным образом, фосфолипидами. Фосфолипиды – амфифильные вещества. Они состоят из полярной (гидрофильной) «головки», в состав которой входит глицерин или другой многоатомный спирт, отрицательно заряженный остаток фосфорной кислоты и часто, несущая положительный заряд, группа атомов, и двух неполярных (гидрофобных) «хвостов» из остатков жирных кислот.

В водном растворе такие молекулы самопроизвольно собираются вместе так, что гидрофобные хвосты закрыты от воды, а полярные гидрофильные головки, наоборот выставлены наружу. Таким образом происходит образование сплошного бимолекулярного фосфолипидного слоя. В уже готовые фосфолипидные слои встраиваются белки.

В состав большинства мембран входит также стероидный липид холестерол (холестерин). Количество холестерола варьирует, и этим в значительной мере определяется жидкостность мембраны: чем больше холестерола, тем выше жидкостность. Степень жидкостности мембраны зависит также от соотношения насыщенных и ненасыщенных остатков жирных кислот в липидных молекулах: чем больше в мембране остатков ненасыщенных жирных кислот, тем выше степень ее жидкостности. Последняя оказывает влияние на активность мембранных ферментов.

Белки обеспечивают выполнение важнейших клеточных функций: регулируемого транспорта веществ, рецепции, структурной организации, регуляции метаболизма и др. Белковые молекулы мозаично распределены в липидном слое и могут перемещаться в его толще.

По расположению относительно билипидного слоя мембранные

белки разделяются на периферические, полуинтегральные и интегральные.

Периферические белки локализованы вне билипидного слоя и связаны электростатическими взаимодействиями с полярными головками липидных молекул, но никогда не образуют сплошного слоя.

Полуинтегральные белки – это глобулярные белки, которые погружены в мембрану частично. Они играют основную роль в организации мембраны. Интегральные белки прочно связаны с липидами и в отличие от легко экстрагируемых периферических белков не выделяются из мембраны без разрушения билипидного слоя.

Интегральные белки, погруженные в мембрану полностью, называются собственно интегральными белками. Те из них, которые пронизывают мембрану насквозь, получили название трансмембранных белков.

Взаимодействия между молекулами белков и липидов различной природы (ионные, гидрофобные, дипольные, дисперсионные и др.) обеспечивают устойчивость плазматической мембраны.

Молекулы олигосахаридов могут соединяться с липидами, образуя гликолипиды, либо с мембранными белками, образуя гликопротеиды. Углеводные части гликолипидов и гликопротеидов, придающие поверхности клетки отрицательный заряд, образуют гликокаликс, который представляет собой надмембранный комплекс поверхностного аппарата клетки.

Гликолипидам и гликопротеидам отводится важная роль в рецепторной функции плазмалеммы. Углеводные участки гликокаликса обеспечивают распознавание соседних клеток и межклеточного вещества, а также адгезивные взаимодействия с ними. Мембранные рецепторы могут регулировать поступление некоторых молекул в клетку, регулировать проницаемость плазмалеммы, превращать внешние сигналы во внутриклеточные, а также связывать молекулы межклеточного матрикса с цитоскелетом. В состав гликокаликса входят также ферменты, рецепторы гормонов и рецепторы гистосовместимости. Некоторые авторы относят к гликокаликсу также полуинтегральные белки, функциональные участки которых находятся в надмембранной зоне.

Подмембранный комплекс образован периферическим (кортикальным) слоем цитоплазмы и содержащимися в нем элементами цитоскелета клетки, включающего актиновые микрофиламенты, а также расположенные более глубоко промежуточные филаменты и

микротрубочки. Сокращения сети микрофиламентов, связанных с белками плазмалеммы, способствуют формированию псевдоподий, выростов цитоплазмы и перемещению клетки в пространстве.

### **Контрольные вопросы**

- 1 Что представляет собой поверхностный аппарат клетки?
- 2 Каково строение плазмолеммы?
- 3 В чем заключается модель организации плазмалеммы Даниэли и Дэвсона?
- 4 В чем заключается модель организации плазмалеммы Зингера и Николсона.
- 5 Перечислите мембранные липиды.
- 6 Перечислите виды мембранных белков.
- 7 Что такое гликокаликс?
- 8 Перечислите мембранные рецепторы.
- 9 Что такое подмембранный комплекс?
- 10 Перечислите функции поверхностного аппарата клетки.

### **Практическая работа №3. Типы клеточной организации**

Среди живых организмов только вирусы не имеют клеточного строения. Все остальные организмы представлены клеточными формами жизни. Различают два типа клеточной организации: прокариотический и эукариотический. К прокариотам относят бактерии и цианобактерии (синезеленые), к эукариотам — растения, грибы и животных.

Прокариотические клетки устроены сравнительно просто, они не имеют ядра. Область расположения ДНК в цитоплазме называется нуклеоид. Единственная молекула ДНК — кольцевая и не связана с белками; клетки меньше эукариотических, в состав клеточной стенки входит гликопептид — муреин; мембранные органоиды отсутствуют, их функции выполняют впячивания плазматической мембраны (мезосомы); рибосомы мелкие, микротрубочки отсутствуют, поэтому цитоплазма неподвижна, а реснички и жгутики имеют особую структуру.

Эукариотические клетки имеют ядро, в котором находятся хромосомы — линейные молекулы ДНК, связанные с белками, в цитоплазме расположены различные мембранные органоиды.

Растительные клетки отличаются наличием толстой целлюлозной клеточной стенки, пластида, крупной центральной вакуоли, смещающей ядро к периферии. Клеточный центр высших растений не содержит центриоли. Запасным углеводом является крахмал.

Клетки грибов имеют клеточную стенку, содержащую хитин; в цитоплазме имеется центральная вакуоль, отсутствуют пластиды. Только у некоторых грибов в клеточном центре встречается центриоль. Главным резервным углеводом является гликоген.

Животные клетки не имеют клеточной стенки, не содержат пластид и центральной вакуоли, для клеточного центра характерна центриоль. Запасным углеводом является гликоген.

В зависимости от количества клеток, из которых состоят организмы, их делят на одноклеточные и многоклеточные.

Одноклеточные организмы состоят из одной-единственной клетки, выполняющей функции целостного организма. Одноклеточными являются все прокариоты, а также простейшие, некоторые зеленые водоросли и грибы.

Тело многоклеточных организмов состоит из множества клеток, объединенных в ткани, органы и системы органов. Клетки многоклеточного организма специализированы для выполнения определенной функции и могут существовать вне организма лишь в микросреде, близкой к физиологической (например, в условиях культуры тканей).

Клетки в составе многоклеточного организма различаются по размерам, форме, структуре и выполняемым функциям. Несмотря на индивидуальные особенности все клетки построены по единому плану и имеют много общего.

### **Контрольные вопросы**

- 1 Что такое прокариотическая клетка?
- 2 Что такое эукариотическая клетка?
- 3 Перечислите особенности растительной клетки.
- 4 Перечислите особенности грибной клетки.
- 5 Перечислите особенности животной клетки.
- 6 Что относится к одноклеточным организмам?
- 7 Что относится к многоклеточным организмам?
- 8 Перечислите отличия растительной и животной клетки.
- 9 Перечислите отличия грибной и растительной клетки.
- 10 Перечислите особенности прокариотических клеток.

## **Практическая работа №4. Введение в культуру клеток и тканей**

Биотехнология растений основана на методах культуры клеток и тканей. Культурой клеток, тканей и органов растений называется выращивание отдельных клеток, а также тканей и органов на искусственной питательной среде в асептических условиях. Этот метод лежит в основе изучения биологии клетки, существующей вне организма. Культура клеток высших растений может рассматриваться с трех точек зрения – как уникальная биологическая система, как модель в физиологии, биохимии и генетике растений и как инструмент для разнообразных исследований и биотехнологии.

Популяциям растительных клеток, выращиваемым в искусственных условиях, присущи специфические особенности, благодаря которым культура клеток и тканей растений представляет новую экспериментально созданную биологическую систему. Отличия культивируемых клеток от клеток организма, часто специально усиленные путем создания биохимических мутантов, гибридных или трансформированных клеток, помогают глубже проникнуть в механизмы процессов, происходящих в растении. В качестве биологической модели клетки *in vitro* представляют интерес для многих физиологов и биохимиков растений, а также генетиков. Однако степень адекватности такой модели зависит от изучаемого процесса.

Культура клеток, как правило, является адекватной моделью для тех процессов, которые протекают в любой растительной клетке, независимо от существующих систем контроля. Для тех клеточных функций, где принципиальную роль играют механизмы организменного контроля развития, модель может быть неадекватной. Культура клеток растений широко используется в самых разнообразных фундаментальных и прикладных исследованиях. На основе культивируемых клеток и тканей высших растений в настоящее время созданы и активно развиваются перспективные, принципиально новые технологии для различных отраслей промышленности и сельского хозяйства.

### **Контрольные вопросы**

- 1 В чем заключается метод культуры клеток?
- 2 В чем заключается метод культуры тканей?
- 3 Отличие культивируемых клеток от клеток организма.
- 4 Какова адекватность модели культуры клеток?

## 5 Применение методов культуры клеток и тканей.

### **Практическая работа №5. Современная теория гена. Закономерности наследования признаков**

Признак - любая особенность организма, любое его качество или свойство, по которому можно отличить одну особь от другой.

Альтернативные признаки - взаимоисключающие варианты одного и того же признака (пример: желтая и зеленая окраска семян гороха).

Доминирование - преобладание у гибрида признака одного из его родителей.

Доминантный признак - преобладающий признак, появляющийся в первом поколении потомства у гетерозиготных особей и доминантных гомозигот.

Рецессивный признак - признак, который передается по наследству, но подавляется, не проявляясь у гетерозиготных потомков; проявляется в гомозиготном состоянии рецессивного гена.

Фенотип - совокупность всех внешних и внутренних признаков организма. Фенотип формируется при взаимодействии генотипа со средой обитания организма.

Аллель - одна из альтернативных форм существования гена, определяющего некоторый признак. Количество аллелей одного и того же гена может достигать нескольких десятков.

■ Каждая хромосома или хроматида может нести только один аллель данного гена.

■ В клетках одной особи присутствует только два аллеля каждого гена.

Локус — участок хромосомы, на котором расположен ген.

Аллельные гены - гены, расположенные в одних и тех же локусах гомологичных хромосом и отвечающие за альтернативные проявления одного и того же признака (пример: гены, отвечающие за цвет глаз человека). Аллельные гены обозначают одинаковыми буквами латинского алфавита: А, а; В, в.

Неаллельные гены - гены, расположенные в негомологичных хромосомах или в разных локусах гомологичных хромосом.

Доминантные гены - гены, соответствующие доминантным признакам; обозначаются прописными латинскими буквами (А, В).

Рецессивные гены - гены, соответствующие рецессивным признакам; обозначаются строчными латинскими буквами (а, в).

Генотип - совокупность всех генов данного организма.

Скрещивание - получение потомства путем искусственного объединения генетического материала разных родителей (разных клеток) в одной клетке.

#### **Генетическая запись скрещивания:**

- первая строка: буква P (родители), генотип женского организма, знак скрещивания  $\times$ , генотип мужского организма; под обозначениями генотипов могут быть указаны признаки организмов;

- вторая строка: буква G (гаметы) и (под обозначениями генотипов, в кружочках) гаметы женской и мужской особей;

- третья строка: буква F<sub>k</sub> (потомки), генотипы потомков (под обозначениями генотипов могут быть указаны признаки организмов); k — номер поколения.

Гомозигота - зигота, содержащая одинаковые аллели одного гена — доминантные (AA, доминантная гомозигота) или рецессивные (aa, рецессивная гомозигота).

- Гомозиготная особь образует один тип гамет и не дает расщепления при скрещивании.

Гетерозигота - зигота, содержащая два разных аллеля одного гена (Aa).

- Гетерозиготная особь в потомстве дает расщепление по данному признаку. Образует несколько типов гамет.

**Правило (гипотеза) чистоты гамет.** Так как каждая хромосома или хроматида может нести только один аллель данного гена, то при расхождении хромосом (при первом делении мейоза) или хроматид (при втором делении мейоза) вместе с ними в гаплоидные клетки гамет отходит лишь по одному из аллелей каждой аллельной пары.

Поэтому: любая гамета организма несет только по одному аллелю каждого гена, т.е. аллели в гаметах не перемешиваются.

Следствия правила чистоты гамет:

- гомозиготный организм образует только один тип гамет: гетерозиготный по одной паре генов организм образует два типа гамет (из двух гомологичных хромосом зиготы в процессе мейоза одна хромосома — с геном A — попадает в одну гамету, другая — с геном a — в другую гамету).

Гибридизация - процесс скрещивания двух организмов одного вида (внутривидовая гибридизация) или разных видов или родов (отдаленная гибридизация).

Гибрид - организм, полученный путем скрещивания генетически

разных организмов.

Моногибридное скрещивание - скрещивание организмов, отличающихся друг от друга альтернативными вариантами только одного признака (одной парой аллелей).

Анализирующее скрещивание - скрещивание изучаемого организма с организмом, имеющим рецессивный гомозиготный генотип (и образующим только один тип гамет с рецессивными аллелями). Позволяет установить генотип изучаемого организма. Применяется в селекции растений и животных.

Дигибридное скрещивание - скрещивание организмов, отличающихся друг от друга альтернативными вариантами двух признаков (двумя парами аллелей).

Полигибридное скрещивание - скрещивание организмов, отличающихся друг от друга альтернативными вариантами трех и более признаков.

Сцепленное наследование - совместное наследование генов, локализованных в одной хромосоме; гены образуют группы сцепления.

Расщепление признаков - проявляющееся среди потомства второго и последующих поколений определенное соотношение между количествами особей, характеризующихся альтернативными признаками исходных родительских форм.

■ Конкретные количественные соотношения между числами особей, несущими признаки каждой из родительских форм, определяются тем, каковы родительские организмы по данным признакам — гомозиготные или гетерозиготные.

### Первый закон Менделя

Первый закон Менделя (закон единообразия гибридов первого поколения, или правило доминирования) описывает скрещивание гомозиготных особей: при скрещивании гомозиготных особей (взятых из чистых линий одного вида), отличающихся по одному из пары альтернативных признаков, получаемые гибриды первого поколения единообразны как по фенотипу, так и по генотипу.

Признак (цвет)	Ген	Генотип	Генетическая запись	
			P	AA x aa ж з
Доминантный (желтый)	A	AA, Aa	G	Ⓐ ⓐ
Рецессивный (зеленый)	a	aa	F <sub>1</sub>	Aa желтые 100%

**Следствие:** если первое поколение единообразно по одному из



альтернативных признаков родительских особей, то данный признак является доминантным, а родительские особи гомозиготны по альтернативным признакам.

### Второй закон Менделя

Второй закон Менделя (закон расщепления) описывает моногибридное скрещивание гетерозиготных особей: при скрещивании между собой гибридов первого поколения (т.е. гетерозиготных особей), отличающихся по одному из пары альтернативных признаков, во втором поколении наблюдается расщепление в соотношении 3 : 1 по фенотипу и 1 : 2 : 1 по генотипу.

Признак (цвет)	Ген	Генотип	Генетическая запись				
			P (F <sub>1</sub> )	Aa x Aa			
желтый	A	AA, Aa		ж	ж		
			G	Ⓐ	ⓐ	Ⓐ	ⓐ
зеленый	a	aa	F <sub>2</sub>	AA	Aa	Aa	aa
				ж	ж	ж	з

Расщепление по фенотипу: три части потомков второго поколения с доминантным признаком и одна часть — с рецессивным.

Расщепление по генотипу: одна часть потомков — доминантные гомозиготы (AA), две части потомков — гетерозиготы (Aa) и одна часть — рецессивные гомозиготы (aa).

### Следствия второго закона Менделя:

■ если потомство родительских особей дает расщепление по фенотипу, близкое к 3 : 1, то исходные родительские особи по данным аллелям гетерозиготны;

■ анализирующее скрещивание: если потомство родительских особей дает расщепление по фенотипу, близкое к 1 : 1, то одна из родительских особей была гетерозиготной, а другая - гомозиготной и несла пару рецессивных аллелей.

### Третий закон Менделя

Третий закон Менделя (закон независимого наследования признаков) описывает дигибридное скрещивание особей: при скрещивании гомозиготных организмов, отличающихся по двум или нескольким парам признаков, во втором поколении наблюдается

независимое наследование генов разных аллельных пар и соответствующих им признаков.

Т.е. каждая пара аллельных генов (и соответствующих им альтернативных признаков) наследуется независимо друг от друга (другая формулировка 3-го закона Менделя).

❖ Определение возможных генотипов и вероятностей их появления у особей второго поколения: сначала определяется генотип первого поколения и тип его гамет  $Gf_1$  после чего генотипы особей и вероятности их появления определяются с помощью решетки Пеннета.

P	AABB		x	aabb				
	ж. гл.			з. м.				
$G_p$	AB			ab				
$F_1$	AaBb							
	ж. гл. 100%							
$P(F_1)$	AaBb		x	AaBb				
	ж. гл.			ж. гл.				
$G_{F_1}$	AB	aB	Ab	ab	AB	aB	Ab	ab

Решетка Пеннета — таблица, с помощью которой изображают и анализируют расщепление независимо наследуемых признаков. По горизонтали в верхней строке этой решетки записываются женские гаметы, по вертикали в левом столбце — мужские гаметы, на пересечениях строк и столбцов — генотипы дочерних особей.

Пример: скрещивание гомозиготной особи гороха, характеризующейся двумя доминантными признаками — желтой окраской и гладкой формой семян, — с гомозиготной особью гороха, имеющей два альтернативных рецессивных признака — зеленую окраску и морщинистую форму семян.

Признаки и их генетическая запись			Решетка Пеннета				
Признак	Ген	Генотип	♂ \ ♀	AB	Ab	aB	ab
1-й доминантный (желтый)	A	AA, Aa	AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
1-й рецессивный (зеленый)	a	aa	Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
2-й доминантный (гладкие семена)	B	BB, Bb	aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
2-й рецессивный (морщин. семена)	b	bb	ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

Так как, согласно третьему закону Менделя, расщепление по каждому признаку идет независимо: по цвету (во втором поколении) в соотношении 3 : 1 (см. второй закон Менделя), по форме — также в соотношении 3 : 1, то расщепление по фенотипу, т.е. по комбинации признаков, наблюдается в соотношении  $(3 : 1)^2 = 9 : 3 : 3 : 1$  (девять частей из 16 составляют желтые гладкие семена, три части — желтые морщинистые, еще три части — зеленые гладкие и одну часть — зеленые морщинистые семена).

Из данных решетки Пеннета следует, что всего при дигибридном скрещивании гомозиготных особей (в частности, гороха) у особей второго поколения возможны девять различных генотипов (генотипических классов), которые распадаются на четыре фенотипических класса. Потомки, доминантные по двум признакам (желтые гладкие семена гороха) имеют один из следующих генотипов (в скобках указана вероятность появления данного генотипа): AABB (1/16), AABb (2/16), AaBB (2/16) или AaBb (4/16); доминантные по первому и рецессивные по второму признаку (желтые морщинистые семена) — AAbb (1/16) или Aabb (2/16); рецессивные по первому и доминантные по второму признаку (зеленые гладкие семена) — aaBB (1/16) или aaBb (2/16); рецессивные по обоим признакам — генотип aabb (1/16) (зеленые

морщинистые семена).

❖ Расщепление по генотипу имеет вид:

■ при дигибридном скрещивании:  $(1:2:1)^2$  ;

■ при полигибридном скрещивании  $(1:2:1)^n$ , где  $n$  — число расщепляющихся пар аллелей.

❖ Расщепление по фенотипу имеет вид:

■ при дигибридном скрещивании:  $(3 : 1)^2 = 9 : 3 : 3 : 1$ ;

■ при полигибридном скрещивании  $(3 : 1)^n$  .

**Следствия третьего закона Менделя:**

■ если анализ расщепления по двум признакам дает по фенотипу соотношение, близкое к  $9 : 3 : 3 : 1$ , то исходные родительские особи дигетерозиготны по этим признакам;

■ в общем случае каждый новый ген увеличивает число типов различных гамет в два раза, а число генотипов — в три раза. Следовательно, особь, гетерозиготная по  $n$  парам генов, может произвести  $2^n$  типов гамет и  $3^n$  различных генотипов;

■ число различающихся классов фенотипов равно числу различных типов гамет при наличии доминирования и числу различных генотипов в отсутствие доминирования.

**Замечания:**

■ третий закон Менделя, т.е. независимое комбинирование признаков, выполняется только при условии, что аллельные гены, определяющие эти признаки, находятся в разных парах гомологичных хромосом;

■ он не объясняет закономерности наследования генов, находящихся совместно в одной и той же хромосоме;

❖ Вычисление частоты определенного генотипа в потомстве родителей, отличающихся определенным числом независимо наследуемых генов: ■ сначала вычисляется вероятность появления соответствующего генотипа отдельно для каждой пары генов;

■ искомая частота равна произведению этих вероятностей. Пример: вычислить частоту генотипа  $AaBbCc$  в потомстве от скрещивания  $AaBbcc \times AaBbCc$ . Вероятность появления генотипа  $Aa$  в потомстве от скрещивания  $Aa \times Aa$  равна  $1/2$ ; вероятность появления генотипа  $bb$  в потомстве от скрещивания  $Bb \times Bb$  равна  $1/4$ ; вероятность появления генотипа  $Cc$  в потомстве от скрещивания  $Cc \times cc$  равна  $1/2$ . Следовательно, вероятность появления генотипа  $AabbCc$  составляет  $(1/2) \times (1/4) \times (1/2) = 1/16$ .

### **Условия выполнения и значение законов Менделя**

Законы Менделя выполняются лишь в среднем, при большом числе однотипных опытов. Они являются следствием случайного сочетания гамет, несущих разные гены, и статистического характера наследования, определяемого большим числом равновероятных встреч гамет.

❖ **Дополнительные условия, при которых выполняются законы Менделя:**

- один ген должен контролировать только один признак, и один признак должен быть результатом действия только одного гена;
- доминирование должно быть полным;
- сцепление между генами должно отсутствовать;
- равновероятное образование гамет и зигот разного типа;
- равная вероятность выживания потомков с разными генотипами;
- статистически большое количество скрещиваний.

### **❖ Значение законов Менделя:**

- эти законы носят универсальный характер и не зависят от систематического положения организма и сложности его строения;
- с их помощью можно рассчитать число типов образующихся гамет и установить возможные варианты сочетания доминантных и рецессивных признаков у гибридов.

### **Контрольные вопросы**

- 1 Что такое признак?
- 2 В чем заключается отличие доминантного от рецессивного признака?
- 3 Что такое аллель?
- 4 Что такое гибридизация?
- 5 В чем заключается отличие гомозиготы от гетерозиготы?
- 6 Назовите правило чистоты гамет.
- 7 Какие бывают виды скрещивания?
- 8 Перечислите законы Менделя
- 9 Перечислите следствия законов Менделя.
- 10 Что такое решетка Пеннета?

## **Практическая работа №6. Цитогенетический, близнецовый, генеалогический, популяционно-статистический и биохимический методы изучения генетики человека**

Рассмотрим основополагающие методы исследования генетики, известные в настоящее время.

**Генеалогические методы исследования** генетики человека представляют собой анализирование и определение типовых структур генов при наследовании в родословных. Полученные результаты и сведения используют для предотвращения, профилактики и выявления вероятности возникновения изученного признака в потомстве – наследственные заболевания. Тип наследования может быть аутосомный (проявление признака возможно с одинаковой долей вероятности у лиц обоих полов) и сцепленный с хромосомным половым рядом носителя.

Аутосомный метод в свою очередь подразделяется на аутосомнодоминантное наследование (доминантный аллель может реализоваться и в гомозиготном и в гетерозиготном состоянии) и аутосомно-рецессивное наследование (рецессивный аллель может реализоваться только в гомозиготном состоянии). При этом виде наследования заболевание проявляется через несколько поколений.

Сцепленная с полом наследственность характеризуется локализацией соответственного гена в гомологических и негомологических участках Y или X-хромосом. По генотипному фону, который локализован в половых хромосомах, определяют гетеро- или гомозиготную женщину, а вот мужчины, имеющие всего лишь один X-хромосомный ряд, могут быть только гемизиготными. Например, гетерозиготная женщина может передать заболевание по наследству как сыну, так и дочерям.

**Биохимический метод исследования** генетики обуславливается изучением наследственных заболеваний, передающимся в результате генных мутаций. Такие методы исследования генетики человека выявляют наследственные дефекты метаболизма посредством определения структур белка, ферментов, углеводов и других продуктов обмена веществ, которые остаются в внеклеточной жидкости организма (кровь, пот, моча, слюна и т.д.).

**Близнецовые методы исследования** генетики человека выясняют наследственную обусловленность исследуемых признаков заболевания. Однояйцовые близнецы (полноценный организм развивается из двух и более дробленных частей зиготы на ранней стадии ее развития) имеют

идентичный генотип, что позволяет выявлять различия в результате внешнего влияния среды на фенотип человека. Разнояйцовые близнецы (оплодотворение двух и более яйцеклеток) имеют генотип родственных друг другу людей, что позволяет оценить средовые и наследственные факторы развития генотипного фона человека.

**Цитогенетический метод исследования** генетики применяют при изучении морфологии хромосом и нормальности кариотипа, что позволяет при выявлении геномных и хромосомных мутаций диагностировать наследственные заболевания на хромосомном уровне, а также исследовать мутагенное действие химикатов, пестицидов, лекарств и т.д. Эта методика широко применяется при анализе и последующем выявлении наследственных аномалий организма еще до рождения ребенка. Пренатальная диагностика околоплодной жидкости ставит диагноз уже в первом триместре беременности, что делает возможным принятие решения о прерывании беременности.

### **Контрольные вопросы**

1 В чем заключается генеалогический метод исследования генетики человека?

2 В чем заключается биохимический метод исследования генетики человека?

3 В чем заключается близнецовый метод исследования генетики человека?

4 В чем заключается цитогенетический метод исследования генетики человека?

5 В чем заключается популяционно-статистический метод исследования генетики человека?

### **Практическая работа №7. Строение, свойства и обмен нуклеиновых кислот. Синтез белков и его регуляция**

Нуклеиновые кислоты играют очень важную роль в жизнедеятельности организмов и наряду с белками определяют главнейшие звенья обмена веществ, явления роста и размножения организмов, а также передачу наследственной информации. Содержание ДНК на одну клетку довольно постоянно. В органах и тканях, характеризующихся быстрым ростом, интенсивно идет клеточное деление, значит, с такой же интенсивностью идет новообразование, синтез новых молекул ДНК. С другой стороны, в старых органах и

тканях, характеризующихся интенсивным отмиранием клеток, преобладает распад молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты. Содержание РНК в среднем на 1 клетку не остается постоянным в течение всего жизненного цикла клетки. Сразу после клеточного деления оно невысоко, но быстро увеличивается и достигает максимума в период наиболее интенсивного роста клетки, когда напряженность обмена веществ, и прежде всего интенсивность синтеза белков, в клетке бывает самой высокой. В дальнейшем содержание РНК в клетке снижается, происходит ее распад. Таким образом, простые определения содержания ДНК и РНК в клетках и тканях показывают, что в организмах постоянно идут процессы синтеза и распада нуклеиновых кислот.

**Биосинтез нуклеиновых кислот.** Основными структурными элементами, из которых построены молекулы ДНК и РНК, являются нуклеотиды – соединения, состоящие из рибозы и дезоксирибозы, азотистого основания и фосфорной кислоты. Поэтому образованию нуклеиновых кислот в клетках должен, очевидно, предшествовать синтез нуклеотидов. На второй стадии биосинтеза происходит фосфорилирование нуклеотидов с образованием соответствующих ди- и трифосфатов, имеющих макроэргические фосфатные связи. На третьей, последней стадии синтеза нуклеиновых кислот соответствующие фосфорилированные нуклеотиды полимеризуются, и возникают молекулы ДНК и РНК. Все животные организмы способны синтезировать нуклеиновые кислоты из простых соединений и не нуждаются в доставке их с пищей. Хорошим примером этому служит рост молодых животных, которые питаются только молоком.

**Биосинтез пуриновых нуклеотидов.** В отличие от многих других синтетических процессов, биосинтез пуриновых нуклеотидов происходит чаще всего не при взаимодействии соответствующих веществ, входящих в состав этих нуклеотидов (пуриновых оснований, рибозы, дезоксирибозы и фосфорной кислоты), а в результате более сложных реакций. Оказалось, что исходным соединением при биосинтезе нуклеотидов является рибоза, или рибозо-5-фосфат. К рибозо-5-фосфату затем последовательно присоединяются отдельные атомы или группы атомов, из которых постепенно строится гетероциклический скелет пуринового основания. В образовании этого скелета принимают участие атомы азота и углерода ряда аминокислот, муравьиной кислоты и угольной кислоты. Процесс требует значительной затраты энергии. Донором формильных остатков (остатков муравьиного альдегида) является производное фолиевой кислоты –



ангидроформилтетрагидрофолиевая кислота (АФТГФК). Синтез АФТГФК происходит из тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФК) с участием АТФ по схеме:  $\text{НСООН} + \text{ТГФК} + \text{АТФ} \rightarrow \text{АФТГФК} + \text{АДФ} + \text{НЗРО}_4$ .

Промежуточным продуктом в синтезе пуриновых нуклеотидов является инозиновая кислота. Она состоит из пуринового основания – гипоксантина, рибозы и фосфорной кислоты. Пуриновые нуклеотиды – адениловая, дезоксиадениловая, гуаниловая и дезоксигуаниловая кислоты – образуются из инозиновой кислоты в результате довольно простых превращений. Рибозо-5-фосфат, необходимый для синтеза нуклеотидов, образуется в растениях в процессе фотосинтеза или при окислении углеводов через пентозофосфатный цикл. Процесс биосинтеза инозиновой кислоты довольно сложен и идет через несколько стадий.

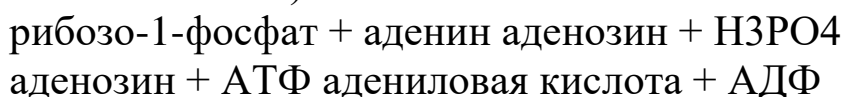
Суммарное уравнение биосинтеза инозиновой кислоты из простейших предшественников можно схематически представить следующим образом:  $3\text{NH}_4^+ + 2\text{НСОО}^- + \text{НСО}_3^- + \text{глицин} + \text{рибозо-5-фосфат} \rightarrow \text{инозиновая кислота} + 9\text{H}_2\text{O}$ .

При этом две молекулы аммиака отщепляются от глутамина и одна – от аспарагиновой кислоты, а остатки муравьиной кислоты переносятся от 2 молекул ангидроформилтетрагидрофолиевой кислоты. Всего для синтеза 1 молекулы инозиновой кислоты из рибозо-5-фосфата необходимо 5 молекул АТФ. Но при расчете общего количества энергии следует учитывать, что при образовании каждой молекулы инозиновой кислоты необходимо девять молекул АТФ. Синтез адениловой кислоты из инозиновой кислоты идет в две стадии через аденил-янтарную кислоту. Донором атома азота является аспарагиновая кислота. Эта реакция во многом напоминает реакцию синтеза инозиновой кислоты. Основное различие состоит в используемых макроэргических соединениях, которые дают энергию для синтеза С-N-связи. В реакции участвует АТФ, а в реакции синтеза адениловой кислоты – гуанозинтрифосфат (ГТФ). На 2-й стадии от аденилянтарной кислоты отщепляется фумаровая кислота, и образуется адениловая кислота. Обе реакции синтеза адениловой кислоты катализируются ферментом аденилосукцинатлиазой. Биосинтез гуаниловой кислоты из инозиновой кислоты также идет в две стадии и требует затрат энергии. На 1-й стадии инозиновая кислота окисляется до ксантиловой кислоты при помощи восстановленного никотинамидадениндинуклеотида. Эта реакция катализируется ферментом инозин-5-фосфатдегидрогеназой. На 2-й стадии происходит аминирование ксантиловой кислоты, которое требует

затрат энергии. Донором атома азота здесь является глутамин. В результате реакции образуется гуаниловая кислота, аденозинмонофосфат и пиродифосфорная кислота. Пуриновые дезоксирибонуклеотиды – дезоксиадениловая и дезоксигуаниловая кислоты, которые необходимы для биосинтеза ДНК, – образуются аналогично. Исходным продуктом для их синтеза также является рибоза, а превращение производных рибозы в производные дезоксирибозы осуществляется в результате их восстановления на уровне нуклеотидов при сохранении гликозидной связи между пентозой и основанием. Для восстановления необходим НАДФ\*Н<sub>2</sub>.

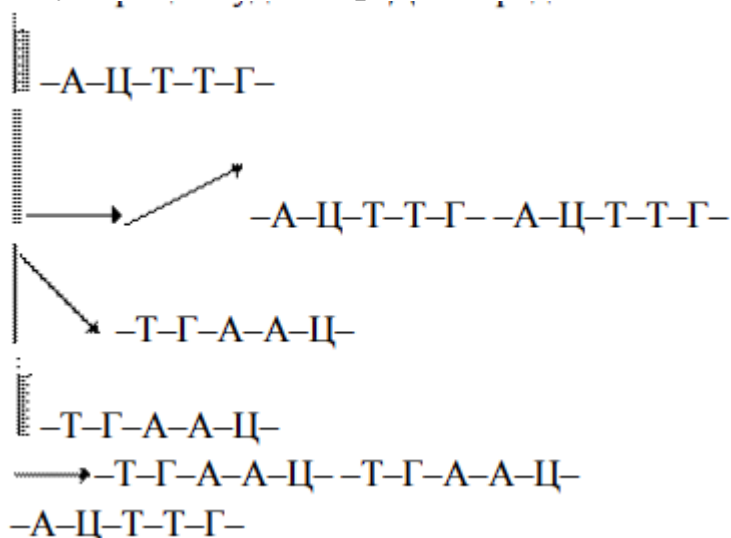
**Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов.** Механизм биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов, также как и пуриновых нуклеотидов, был выяснен в основном лишь в последние годы. Хотя по своей структуре пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды довольно близки между собой, тем не менее пути их биосинтеза резко различны. Если при биосинтезе пуриновых нуклеотидов исходным соединением является рибозо-5-фосфат, к которому постепенно присоединяются отдельные атомные группировки, то биосинтез пиримидиновых нуклеотидов начинается с самых простых соединений (аммиака и углекислоты), а рибозофосфат присоединяется лишь на заключительных стадиях синтеза. Промежуточным продуктом в синтезе производных пиримидина является оротовая кислота.

Но в результате этих реакций синтез нуклеотидов происходит не всегда. В тех случаях, когда в тканях и клетках растений имеются свободные пуриновые и пиримидиновые основания (которые возникают в результате распада нуклеиновых кислот), они могут непосредственно использоваться для синтеза нуклеотидов. При синтезе из свободных оснований вначале образуются нуклеозиды, которые затем фосфорилируются и превращаются в нуклеотиды. На первом этапе под действием фосфотрансфераз фосфатный остаток переносится от АТФ на рибозу или дезоксирибозу с образованием пентозофосфатов. Затем пентозофосфат, соединяясь с основанием, превращается в нуклеотид и свободную фосфорную кислоту. На последнем этапе нуклеотид фосфорилируется с участием АТФ и превращается в нуклеотид. Схематически процесс биосинтеза нуклеотида из свободного основания можно представить следующим образом (на примере синтеза адениловой кислоты):



**Синтез ДНК.** Химические анализы показывают, что количество ДНК в течение жизненного цикла клетки постоянно. Но в период клеточного деления количество ДНК резко возрастает, и ее концентрация увеличивается ровно в два раза. Таким образом, после деления клетки содержание ДНК в дочерних клетках остается таким же, каким оно было в материнской клетке. Молекула ДНК представляет собой две комплементарные полинуклеотидные цепи, скрученные вокруг общей оси, причем в цепях аденин соответствует тимину, а гуанин – цитозину, соединенным водородными связями. Таким образом, каждая цепь ДНК служит специфической структурой, которая может соединяться только с комплементарной структурной цепью и точно определять структуру вновь создаваемой цепи. В процессе удвоения молекул ДНК в период клеточного деления прежде всего разрываются водородные связи между цепями, цепи раскручиваются и расходятся. После этого под действием соответствующих ферментов к каждой из одиночных цепей присоединяются новые нуклеотиды. Но так как сочетание должно быть строго определенным, то на каждой образовавшейся цепи строится вторая комплементарная цепь прежнего состава.

Этот процесс удвоения ДНК представлен на схеме:



Таким образом, благодаря принципу комплементарности в строении молекулы из одной молекулы ДНК образуются две совершенно одинаковые молекулы. Способность ДНК давать строго определенные, подобные себе новые молекулы играет определяющую роль в явлениях наследственности и в передаче генетической информации. ДНК определяет синтез специфических белков в клетке, и изменения в ее структуре будут вести к синтезу неспецифических для данной клетки и

организма белков, что в конечном итоге вызывает изменения в обмене веществ и свойствах организма. Поэтому сама ДНК должна сохранять постоянство строения, не изменять его даже при делении клеток, что и достигается в результате специфического механизма самоудвоения ее молекулы. В периоды между делениями клеток молекула ДНК остается очень инертной, стабильной, что резко отличает ее от всех других веществ – белков, углеводов, липидов, которые подвергаются непрерывному обмену и обновлению. Одним из наиболее крупных достижений биохимии явилось выделение и очистка ферментов, катализирующих синтез нуклеиновых кислот. Эти работы позволили воспроизвести синтез ДНК и РНК вне живой клетки. В 1956 году А. Корнберг выделил и очистил из экстрактов кишечной палочки фермент, катализирующий синтез ДНК из ее простых предшественников. Фермент был назван ДНК-полимеразой, а впоследствии получил название – ДНКнуклеотидилтрансфераза. Позднее этот фермент был выделен из других объектов. Он катализирует синтез ДНК только из соответствующих трифосфатов, при замене трифосфатов на дифосфаты или монофосфаты синтеза ДНК не было. Необходимым условием для выявления максимальной активности ДНК-нуклеотидилтрансферазы является одновременное присутствие в среде трифосфатов всех четырех дезоксирибонуклеозидов (дезокситимидина, дезоксицитидина, дезоксигуанозина, дезоксиаденозина), а также ионов магния и небольшого количества ДНК (так называемой затравки).

### **Контрольные вопросы**

- 1 Какова роль нуклеиновых кислот в организме?
- 2 В чем заключается процесс биосинтеза нуклеиновых кислот?
- 3 В чем заключается процесс синтеза ДНК?
- 4 В чем заключается процесс биосинтеза пуриновых нуклеотидов?
- 5 В чем заключается процесс биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов?

### **Практическая работа №8. Геномные технологии и ДНК-диагностика**

Используя технику рекомбинантных ДНК, удаётся исследовать варианты генов, ответственных за развитие многих заболеваний. Этим способом идентифицированы точечные мутации, вызванные заменой одного азотистого основания, делениями или вставками, приводящими к

появлению аллелей, кодирующих функционально неактивные белки. Дефектные "полиморфы" возникают как за счёт изменений в кодирующих участках гена, так и в результате мутаций в некодирующих; областях, тесно примыкающих к генам и вызывающих нарушение их работы. Разработанные технологии позволяют вести целенаправленное картирование генов человека в рамках международного проекта "Геном человека". Официально эта научная программа с участием ведущих молекулярно-генетических лабораторий США, стран Западной Европы, а также России и Японии оформилась в 1990 г. В ходе работы над проектом картированы 923 гена, вызывающих развитие моногенных заболеваний, более 100 из них полностью секвенированы. К концу 2001 г. работами лабораторий США, Великобритании, Японии и ряда европейских стран с точностью до 90% завершена расшифровка генома. Ожидается, что в течение ближайших 2-3 лет будут изучены все гены, ответственные за развитие патологических процессов у человека. Это позволит вывести диагностику и лечение многих болезней на новый уровень.

Остановимся на некоторых методах, широко используемых для идентификации моногенных болезней.

### **1. Полиморфизм длины рестриционных фрагментов (ПДРФ)**

Мутации, возникающие в участках узнавания определённых рестриктаз, делают эти участки ДНК нечувствительными к действию ферментов. Это может быть легко обнаружено по изменению длины рестриционных фрагментов ДНК. ПДРФ-анализ включает следующие этапы: выделение геномной ДНК, её рестрикцию специфической эндонуклеазой, электрофоретическое разделение образующихся фрагментов ДНК и идентификацию этих фрагментов путём блот-гибридизации по Саузерну. На электрофореграммах при отсутствии рестрикции в исследуемой ДНК выявляют один крупный фрагмент, соответствующий по длине последовательности ДНК между двумя соседними участками рестрикции для той же эндонуклеазы. При наличии рестрикции в полиморфном участке на электрофореграмме будет присутствовать меньший по размерам фрагмент, равный расстоянию между полиморфным участком рестрикции и одним из ближайших постоянных участков рестрикции.

ПДРФ-анализ может быть значительно упрощён в том случае, если возможна специфическая амплификация участка ДНК, содержащего полиморфный сайт рестрикции. Тестирование состояния этого локуса возможно путём проведения ПЦР и рестрикции амплифицированного

фрагмента. При отсутствии сайта узнавания в исследуемой области ДНК размеры амплифицированного фрагмента не изменятся после его обработки рестриктазой. Если участок узнавания не изменён, обработка ферментом приведёт к образованию 2 маленьких фрагментов с той же суммарной длиной, что и исходный фрагмент.

При обследовании пациентов и членов их семей на носительство патологических генов широко используют этот метод, с помощью которого:

- идентифицируют делеции в гене дистрофи-на, на долю которых приходится около 60% всех мутаций, вызывающих миодистрофию Дюшенна;
- диагностируют гемофилию А, некоторые талассемии, ретинобластому и гранулематоз;
- контролируют здоровье детей в семьях, в которых родители являются гетерозиготами по гену серповидно-клеточной анемии и другим дефектным генам.

## **2. Определение мутаций с помощью аллельспецифических проб**

Многие мутации, вызывающие возникновение генных болезней, не попадают в участки, ответственные за узнавание ферментов рестрикции. В этом случае, если последовательность оснований в области мутации известна, то её обнаруживают с помощью аллель-специфических олигонуклеотидов. Для этого синтезируют короткие олигонуклеотидные зонды, содержащие обычно около 19 нуклеотидов, комплементарные участку нормального и мутантного аллеля в ДНК. Область генома, содержащую исследуемый ген, амплифицируют с помощью ПЦР, и образцы полученной ДНК переносят на нитроцеллюлозные фильтры (дот- или слот-блоттинг). Пробы выдерживают с  $^{32}\text{P}$ -зондами для выявления нормальной или мутантной последовательности. У гомозигот по исследуемой мутации ДНК будет гибридизоваться только с зондом, комплементарным мутантной последовательности. ДНК нормального гомозиготного индивидуума свяжется с зондом, соответствующим неизменённой нуклеотидной последовательности, тогда как с ДНК гетерозигот будут гибридизоваться оба зонда. На рисунке 4-69 представлены результаты генного зондирования 7 пациентов на носительство наиболее часто встречающейся делеции 3 нуклеотидов ( $\Delta\text{F508}$ ) в гене, ответственном за развитие муковисцидоза.

Олигонуклеотиды, аллель-специфичные по определённым мутациям, можно использовать в качестве праймеров в ПЦР при

клиническом тестировании населения на наличие патологического гена. Если ДНК, полученная от пациента, амплифицирует с мутантным олигонуклеотидом, то, следовательно, пациент является носителем мутации. Если нуклеотидная последовательность в исследуемом гене не изменена, то олигонуклеотид, содержащий мутацию, не свяжется с ДНК-матрицей, и ПЦР не пойдёт.

### **3. Использование ДНК-технологий для получения лекарственных препаратов и лечения различных болезней**

Вакцины — очищенные белки, антигенные детерминанты ряда возбудителей вирусных и бактериальных инфекций. В последнее время их получают, пользуясь техникой рекомбинантных ДНК. Первой вакциной, синтезированной этим способом, была вакцина против вируса гепатита В.

Белки, имеющие терапевтическое значение, получают с использованием этой технологии во многих странах мира. Так, одним из первых синтезирован инсулин человека. В клетках *E. coli*, трансформированных плазмидами, содержащими ДНК, которая кодировала А- и В-цепи инсулина, нарабатывают белковые продукты А- и В-цепей. После очистки их подвергают фолдингу и окислению, которое обеспечивает образование соответствующих дисульфидных мостиков.

Аналогичным способом получен гормон роста, используемый для лечения детей с недостаточностью этого гормона. Более сложные белки получены в культуре клеток млекопитающих. Так, дефекты в гене фактора VIII, кодирующего один из белков — участников свёртывающей системы крови, ответственны за возникновение гемофилии. До того, как фактор VIII был получен методами генной инженерии, большое количество больных погибало от СПИДа или гепатита, которыми они заражались в результате введения выделенного из крови фактора VIII или переливания крови от доноров, являвшихся носителями этих болезней.

Тканевый активатор плазминогена (ТАП) - протеаза, участвующая в процессе фибринолиза и предотвращающая образование тромбов в кровеносном русле; получена с помощью рекомбинантных ДНК. ТАП назначают больным с ишемической болезнью сердца для ускорения растворения тромбов, которые могут вызвать закупорку коронарных артерий и нарушить поступление кислорода в миокард.

Осуществлено получение рекомбинантных факторов роста,

обеспечивающих восстановление гемостаза: эритропоэтина, интерлейкинов, колоний-стимулирующих факторов. Эти препараты используют в лечении больных анемией, после трансплантации костного мозга или химиотерапии, чтобы стимулировать образование клеток крови и снизить риск иммунодефицита. Разработаны методы получения белков человека с использованием трансгенных животных; эти белки получают в результате искусственного введения чужеродного гена в оплодотворённую яйцеклетку или в ранние зародыши млекопитающих. Генноинженерные мероприятия можно провести таким образом, чтобы интересующий нас белок человека секретировался с белками молока.

#### **4. Генная терапия**

Генная терапия - лечение наследственных, многофакторных и инфекционных заболеваний путём введения в соматические клетки пациентов генов, которые обеспечивают исправление генных дефектов или придают клеткам новые функции.

Первый клинический опыт применения генной терапии был осуществлён в 1990 г. в Бетесде (США) на четырёхлетней девочке, страдавшей наследственным иммунодефицитом, вызванным мутацией в гене аденозиндезаминазы (ADA). Ребёнку были введены её собственные лимфоциты, предварительно трансформированные вне организма генной конструкцией, включающей ген ADA + ген neo + ретровирусный вектор. Лечебный эффект наблюдался в течение нескольких месяцев, после чего процедуру введения гена повторяли многократно без видимых неблагоприятных эффектов.

Для успешной генотерапии необходимо:

- обеспечить эффективную доставку чужеродного гена в клетки-мишени;

- создать условия для длительной экспрессии гена в этих клетках.

К настоящему времени разработаны химические, физические и биологические методы доставки чужеродного гена в клетки-мишени. Однако пока только вирусные векторы или генетические конструкции, включающие вирусные последовательности, способны к эффективной доставке необходимого гена и его последующей длительной экспрессии. В результате из более чем 175 уже одобренных протоколов клинических испытаний по генотерапии более 120 основаны на применении ретровирусных векторов.

В геном пациента чужеродная ДНК может вводиться либо в культуре клеток (*ex vivo*), либо непосредственно в организм больного (*in vivo*). При осуществлении первого способа выделяют и культивируют



специфический тип клеток пациента, вводят в него чужеродный ген, отбирают трансформированные клетки и реинфузируют их тому же больному.

Генная терапия *in vivo* основана на прямом введении в специализированные ткани больного клонированных и определённым образом упакованных последовательностей ДНК, поступающих с помощью рецепторов в определённые типы клеток. В этом способе гены вводят, как правило, в виде аэрозольных и инъектируемых форм. Наиболее часто аэрозольную генотерапию используют при лечении болезнй лёгких (например, раке лёгких) и муковисцидоза.

Наряду с развитием исследований, касающихся лечения наследственных дефектов, генотерапию всё чаще используют для лечения ненаследственных, главным образом, инфекционных и онкологических болезней.

Единственное и неперемное ограничение таких работ состоит в том, чтобы все генотерапевтические мероприятия были направлены на конкретного больного и затрагивали только его соматические клетки.

Современный уровень знаний не позволяет проводить коррекцию генных дефектов на уровне половых клеток и клеток ранних доимплантационных зародышей человека в связи с реальной опасностью засорения генофонда нежелательными генными конструкциями и внесения мутаций с непредсказуемыми результатами.

В целях предотвращения распространения дефектных генов в популяции людей и рождения детей с наследственными патологиями во многих странах мира работают генетические консультанты, а также проводят пренатальную диагностику, позволяющую оценить здоровье плода с использованием анализа ДНК на самых ранних стадиях развития.

### **Контрольные вопросы**

- 1 Что такое генная инженерия?
- 2 Что такое геном?
- 3 Каково применение генной инженерии в медицине?
- 4 Какие существуют способы детекции результатов генетического анализа?
- 5 Какие существуют методы идентификации мутаций?
- 6 Что такое ДНК-диагностика?
- 7 Что такое секвенирование ДНК?
- 8 Перечислите методы профилактики наследственных заболеваний.

9 Каково применение биотехнологий в медицине?

10 Перечислите методы выделения ДНК.