

Документ подписан простой электронной подписью  
Информация о владельце:  
ФИО: Таскаев Сергей Валерьевич  
Должность: Ректор  
Дата подписания: 17.09.2025 10:58:45  
Уникальный программный ключ:  
04c19ed8bfb98f3b6cb77a486b9a8788b8322323

 <p>МИНОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИИ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ЧелГУ»)</p>	Фонд оценочных средств по дисциплине «Внеядерная и внехромосомная наследственность» по направлению подготовки 06.03.01 «Биология» ФГБОУ ВО «ЧелГУ»	стр. 1
--	--	--------

**Фонд оценочных средств  
для промежуточной аттестации  
по дисциплине (модулю)**

**Внеядерная и внехромосомная наследственность**

Направление подготовки (специальность)  
**06.03.01 Биология**

Направленность (профиль)  
**Генетика**

Присваиваемая квалификация  
**Бакалавр**

Форма обучения  
**очная**

Год (ы) набора: 2023

Челябинск, 2025 г.

## 1. ПАСПОРТ ФОНДА ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

Направление подготовки: **06.03.01 Биология**

Направленность (профили): Генетика

Дисциплина: **Внеядерная и внехромосомная наследственность**

Семестры изучения: 7

Форма промежуточной аттестации: экзамен

## 2. ПЕРЕЧЕНЬ ФОРМИРУЕМЫХ КОМПЕТЕНЦИЙ

### 2.1. Компетенции, закреплённые за дисциплиной

Изучение дисциплины «Внеядерная и внехромосомная наследственность» направлено на формирование следующих компетенций:

Коды компетенции (по ФГОС)	Содержание компетенций согласно ФГОС	Коды и содержание индикаторов	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине
1	2	3	4
ПК-1	Способен применять современные методы обработки, анализа и синтеза полевой, производственной и лабораторной биологической информации, правила составления научно-технических проектов и отчетов	ПК-1.4 Использует теоретические знания об основных биологических закономерностях.	<p><b>Знать:</b> Для достижения индикатора ПК-1.4: современные методы, используемые для работы с внеядерными и внехромосомными элементами наследственности</p> <p><b>Уметь:</b> Для достижения индикатора ПК-1.4: формулировать и решать практические и научные задачи, предполагающие знание генетики, принципов внеядерной и внехромосомной наследственности</p> <p><b>Владеть:</b> Для достижения индикатора ПК-1.4: навыками работы с основными лабораторными приборами</p>

**3. СОДЕРЖАНИЕ ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ ПО ДИСЦИПЛИНЕ**

№ п/п	Код компетенции/планируемые результаты обучения	Контролируемые темы/разделы	Наименование оценочного средства для текущего контроля	Наименование оценочного средства на промежуточной аттестации № задания
1	<p><b>ПК-1</b></p> <p><b>Знать:</b> Для достижения индикатора ПК-1.4: современные методы, используемые для работы с внеядерными и внехромосомными элементами наследственности</p> <p><b>Уметь:</b> Для достижения индикатора ПК-1.4: формулировать и решать практические и научные задачи, предполагающие знание генетики, принципов внеядерной и внехромосомной наследственности</p> <p><b>Владеть:</b> Для достижения индикатора ПК-1.4: навыками работы с основными лабораторными приборами</p>	<p>Раздел 1. Введение.</p> <p>Раздел 2: Транспозоны</p> <p>Раздел 3: Плазмиды</p> <p>Раздел 4: Фаги</p> <p>Раздел 5: Векторы для клонирования в бактериях</p> <p>Раздел 6: Внеядерная наследственность</p> <p>Раздел 7. Работа в молекулярно-генетической лаборатории. Основные лабораторные методы.</p>	Устный опрос, выполнение лабораторных работ	Вопросы к экзамену 1-29

**3.1 Виды оценочных средств**

*Примечание: типовые задания, критерии и показатели оценивания в рамках текущего контроля представлены в рабочей программе дисциплины (модуля). Полные комплекты оценочных средств и контрольно-измерительных материалов хранятся на кафедре.*

**3.2 Содержание оценочных средств**

Оценочные средства промежуточной аттестации по дисциплине «Внеядерная и внехромосомная наследственность» представлены вопросами к экзамену по дисциплине.

1. Основные типы бактериальных транспозонов: IS-элементы, Mu-подобные фаги.

Вставочные (инсерционные) последовательности (IS-элементы) - простейший тип мигрирующих элементов, их величина не превышает 1500 пар оснований (в среднем

800- 1400). IS-элементы самостоятельно не реплицируются и не кодируют распознаваемых фенотипических признаков. Содержащиеся в них гены обеспечивают только их перемещение из одного участка в другой.

Основные функции IS-последовательностей — регуляция активности генов бактериальной клетки (могут инактивировать гены, в которые включились, или, встраиваясь в хромосому, проявлять эффект промотора, включающего либо выключающего транскрипцию соответствующих генов), индукция мутаций типа делеций или инверсий (при перемещении) и дупликаций (при встраивании в хромосому), координация взаимодействий плазмид, транспозонов и профагов (как между собой, так и бактериальной хромосомой).

Mu-подобные фаги — умеренные бактериофаги  $\gamma$ -протеобактерий, сложнейшие транспозоны, которые помимо генов транспозиции/интеграции несут детерминанты сборки фаговых частиц и имеют внеклеточную форму существования. При первичной интеграции в геном инфицированной клетки используют механизм консервативной транспозиции, а при переходе из лизогенной стадии (профага) к литической — репликативную транспозицию.

Интеграция фага Mu происходит в случайные сайты, провоцируя инсерционный мутагенез, с дупликацией 5 п.н. ДНК-мишени. При развитии литического сценария множественные копии фага вызывают фрагментацию хромосомы, что способствует упаковке в фаговые капсиды и последующей трансдукции не только вирусной ДНК, но и ближайших фрагментов ДНК-мишени. Иногда фрагменты хромосомы при упаковке в капсид полностью заменяют фаговую ДНК.

## 2. Основные типы бактериальных транспозонов: Tn-элементы.

Транспозоны (Tn-элементы) состоят из 2000-25 000 пар нуклеотидов, содержат фрагмент ДНК, несущий специфические гены, и два концевых IS-элемента. При включении в ДНК бактерий транспозоны вызывают дупликации, при выходе из определённого участка ДНК

— делеций, при выходе и включении обратно с поворотом фрагмента на 180 градусов— инверсии. Транспозоны не способны к самостоятельной репликации и размножаются только в составе бактериальной хромосомы. Каждый транспозон обычно содержит гены, приносящие важные для бактерии характеристики типа множественной устойчивости к антибактериальным агентам. Поскольку транспозоны содержат гены, определяющие фенотипически выраженные признаки (например, устойчивость к антибиотикам), то их легче обнаружить, чем IS-элементы. В общем, для транспозонов характерны те же гены, что и для плазмид (гены устойчивости к антибиотикам, токсинообразования, дополнительных ферментов метаболизма).

## 3. Классические транспозоны эукариот.

Транспозоны эукариот сходны по организации с мобильными генетическими элементами прокариот. Они с флангов ограничены инвертированными повторами, необходимыми для их транспозиции. Наиболее хорошо изученные транспозоны эукариот – P-элемент дрозофилы и Ac-элемент кукурузы. Они представлены в геномах в 30 – 50 копиях, содержат ген транспозазы. Этот ген имеет прерывистое строение – состоит из экзонов и интронов. РНК, считанная с него, подвергается сплайсингу.

Сплайсированная иРНК служит матрицей для синтеза транспозазы – белка, обеспечивающего перемещение элементов из одного участка генома в другой. При интеграции транспозонов в новый участок ДНК происходит дупликация сайта-мишени. Р-элемент при транспозиции обычно встраивается в определенный сайт с канонической последовательностью: ГГЦАГАС.

#### 4. Ретротранспозоны.

Ретротранспозоны - транспозоны, кодирующие ферменты типа обратной транскриптазы. Ретротранспозон - перемещающийся элемент в эукариотических организмах, имеющий гены, цикл репликации и интеграционный механизм, сходный с ретровирусами, т. е. содержащий гены, кодирующие обратную транскриптазу, протеазу, РНКазу и интегразу. Типичный ретротранспозон фланкирован длинными концевыми повторами, содержащими промотор и сигналы терминации транскрипции. Ретротранспозоны перемещаются путем обратной транскрипции РНК-копии и последующего встраивания ДНК-копии в новый сайт генома. Процесс синтеза ДНК при размножении ретротранспозонов с участием ревертазы происходит в вирусоподобных частицах, белковые компоненты которых также кодируются генами ретротранспозонов. Однако такие частицы неинфекционны, поскольку большая часть ретротранспозонов в отличие от ретровирусов не содержит гена, который мог бы кодировать белок оболочки вирусной частицы, обеспечивающей ее выход из клетки и способность к заражению других клеток. Существуют также ретротранспозоны, которые не содержат длинных концевых повторов (напр., семейство повторов L1 в геноме человека). Ретротранспозоны широко распространены у эукариот, они присутствуют в геномах дрожжей, растений, насекомых и позвоночных, включая человека. Ретротранспозоны, или мобильные генетические элементы первого типа, состоят из двух подтипов — ретротранспозонов с длинными концевыми повторами (англ. LTR, long terminal repeats), и ретротранспозонов без длинных концевых повторов. Последние в свою очередь делятся на длинные диспергированные повторы (англ. LINE, long interspersed elements) и короткие диспергированные повторы (англ. SINE, short interspersed elements).

#### 5. Роль транспозонов.

Некоторые этапы эволюционирования организмов были вызваны активностью мобильных элементов генома. Уже первая нуклеотидная последовательность генома человека показала, что многие гены являются производными транспозонов. Мобильные генетические элементы могут влиять на организацию генома путем рекомбинации генетических последовательностей и входя в состав таких фундаментальных структурных элементов хроматина, как центромеры и теломеры. Мобильные элементы могут влиять на соседние гены, изменяя узоры (паттерны) сплайсинга и полиаденилирование или выполняя функции энхансер или промоторов. Транспозоны могут влиять на структуру и функции генов путем выключения и изменения функций, изменении структуры генов, мобилизации и реорганизации фрагментов генов и изменение эпигенетического контроля генов.

#### 6. Применение транспозонов

Генная инженерия. Поскольку мобильные элементы генома способны к встраиванию в

хроматин, они используются в генной инженерии для специального и контролируемого вставки генов или участков ДНК, которые изучают ученые. Транспозонов используются для мутагенеза и для определения регуляторных элементов генома в лабораториях.

Филогенетика. Кроме использования транспозонов в генной инженерии, изучение активности транспозонов является методом филогенетики. Путем анализа и сопоставления нуклеотидных последовательностей геномов различных видов можно найти транспозонов, что имеющиеся у одних видов, но отсутствуют в других. Виды, в которых одинаковый Ретротранспозон, скорее всего получили его от общего предка. Таким образом можно получить информацию об эволюционном развитии видов и строить филогенетические деревья.

#### 7. Плазмиды. Основные свойства бактериальных плазмид: Репликация. Интеграция. Конъюгация. Мобилизация.

Плазмиды — внехромосомные мобильные генетические структуры бактерий, представляющие собой замкнутые кольца двунитчатой ДНК. По размерам составляют 0,1

—5 % ДНК хромосомы. Плазмиды способны автономно копироваться (реплицироваться) и существовать в цитоплазме клетки, поэтому в клетке может быть несколько копий плазмид.

Плазмиды могут включаться (интегрировать) в хромосому и реплицироваться вместе с ней. Различают трансмиссивные и нетрансмиссивные плазмиды. Трансмиссивные (конъюгативные) плазмиды могут передаваться из одной бактерии в другую. Среди фенотипических признаков, сообщаемых бактериальной клетке плазмидами, можно выделить следующие:

- 1) устойчивость к антибиотикам;
- 2) образование колицинов;
- 3) продукция факторов патогенности;
- 4) способность к синтезу антибиотических веществ;
- 5) расщепление сложных органических веществ;
- 6) образование ферментов рестрикции и модификации.

Репликация плазмид происходит независимо от хромосомы с участием того же набора ферментов, который осуществляет репликацию бактериальной хромосомы. Плазмиды, имеющие значительные молекулярные размеры (более 10 мкм длины), обнаруживаются в бактериальных клетках в небольшом числе экземпляров (1 - 2 копии на хромосому), поэтому их называют малокопийными плазмидами. Автономная репликация и последующая сегрегация таких плазмид регулируются согласованно с репликацией бактериального генома и поэтому в каждой клетке содержится только одна или две копии плазмиды. О таком типе репликации говорят как о репликации со строгим контролем.

Самостоятельная репликация более мелких плазмид (0,5 - 10 мкм) подвержена менее строгому контролю и их число может достигать нескольких десятков копий на хромосому, т.е. они являются многокопийными. Такой тип репликации называется репликация с ослабленным контролем. Небольшие многокопийные плазмиды представляют собой удобный объект для генетической инженерии и их часто используют в качестве векторов при клонировании генетического материала различных организмов.

Интегрированные плазмиды репродуцируются одновременно с бактериальной

хромосомой. Интеграция плазмид происходит при наличии гомологичных последовательностей ДНК, при которых возможна рекомбинация хромосомной и плазмидной ДНК (что сближает их с профагами).

Под конъюгацией понимают перенос ДНК между бактериальными клетками при их непосредственном контакте. Как правило, при конъюгации передаются плазмиды, но у некоторых организмов передаваться может и хромосомная ДНК. При конъюгации имеет место однонаправленный перенос генетического материала от клетки-донора к клетке-реципиенту.

Неконъюгативные плазмиды – мелкие плазмиды, не содержат *tra*-генов, неспособны самостоятельно передаваться от одних клеток к другим. Неконъюгативные плазмиды могут быть перенесены в реципиентные клетки с помощью конъюгативных плазмид. Перенос неконъюгативных плазмид с помощью конъюгативных называется мобилизацией. Мобилизация может функционировать из-за наличия в плазмидах IS-элементов и транспозонов, которые обеспечивают образование коинтегратов. В реципиентных клетках коинтеграты распадаются на два автономных репликаона.

#### 8. Основные свойства бактериальных плазмид: Несовместимость.

Поверхностное исключение. Стабильность. Фенотипические признаки.

Несовместимость. Родственные плазмиды не могут сосуществовать в одной клетке, поскольку они несовместимы.

Поверхностное исключение присуще конъюгативным плазмидам. Свойство означает, что если в клетке есть определенная плазида, то другая плазмидная ДНК при конъюгации с трудом преодолевает клеточную стенку.

Стабильность. Надёжность числа копий сайты *ori*, *inc*. Точное распределение по дочерним клеткам белок *par*. Разрешение коинтегратов.

Придают клеткам различные фенотипические признаки: 1) устойчивость к антибиотикам, ионам тяжелых металлов, мутагенам (R-плазмиды); 2) способность вызывать биодegradацию ксенобиотиков (D-плазмиды); 3) способность синтезировать антибиотики, бактериоцины, пигменты и др. соединения; 4) способность вызывать образование опухолей у растений (Ti-плазмиды); 5) донорные свойства (F-плазмиды) и др.

#### 9. F-плазида. Генетика. Конъюгативность. Образование F'-плазмид.

F-плазида, или F-фактор — это конъюгативная эписома клеток *Escherichia coli* K-12, то есть клеточный элемент, необходимый для одного из типов полового процесса бактерий — конъюгации. Размер её кольцевой ДНК составляет 94,5 тысяч пар

нуклеотидов. Молекулярная масса F-фактора равна  $45 \cdot 10^6$  Да. F-плазида — эписома со строгим контролем репликации. Попадая в F-клетки (клетки, не имеющие F-плазмиды до этого), эта плазида изменяет их фенотипические свойства. Клетки приобретают половые пили (выросты мембраны для конъюгации), а также чувствительность к фагам MS2, f1, f2, Q $\beta$ , становятся донорами ДНК, перестают поддерживать развитие фагов T3 и T7. При конъюгации таких клеток блокируется проникновение в них донорной ДНК (проявляется свойство поверхностного исключения). За конъюгативные свойства F-плазмиды отвечает *tra*-область генома, в которую входит 24 гена, сгруппированных в три оперона. За автономную репликацию F-плазмиды отвечают *rep*-гены. За распределение молекул плазмидной ДНК по дочерним клеткам отвечают гены области

par. Рядом с областью par находится ген *rif*, продукт которого исключает развитие в клетке фагов T3 и T7. Структурными компонентами, обеспечивающими интеграцию F-плазмиды в бактериальную хромосому, являются элементы IS2, IS3A, IS3B и Tn1000 (они представляют собой последовательности нуклеотидов), входящие в состав плазмидной ДНК. Они взаимодействуют с аналогичными элементами бактериальной ДНК через сайтспецифическую рекомбинацию и встраиваются в неё в разных местах и направлениях в зависимости от локализации и направления бактериальных элементов. Клетка после интеграции в её ДНК F-плазмиды приобретает свойства Hfr-клетки, то есть способна с высокой частотой направленно передавать свои гены другим клеткам. F-плазида, интегрированная в хромосому, может из неё исключаться. При неправильном исключении F-плазмиды образуется F'-плазида, то есть F-плазида, содержащая в своём составе гены бактериальной хромосомы. Если при вычленении F'-плазмиды из бактериальной хромосомы хоть какие-то нуклеотиды в *tra*-опероне выпадают, то образовавшаяся F- плазида будет неконъюгативной (не сможет входить в клетки-реципиенты). Для сохранения репликонных свойств (способности самовоспроизводиться) F'-плазида обязательно должна содержать область *гер*.

#### 10. R-плазида. Плазида ColE1.

R-плазмиды – это плазмиды, детерминирующие множественную лекарственную устойчивость (или резистентность, откуда и название) бактериальной клетки к антибактериальным веществам (прежде всего антибиотикам). Состав R-плазмиды определяется наличием в нём двух основных оперонов. Поэтому эта плазида может находиться в двух формах. Если в состав R-плазмиды входит *tra*-оперон, то в этом случае R-плазида является конъюгативной. *Tra*-оперон в составе этой плазмиды называется RTF-фактор (*resistance transfer factor* – фактор, передающий устойчивость). Гены, детерминирующие устойчивость к антибиотикам, формируют так называемый *г*-оперон (если быть более точным, то устойчивость к каждому антибиотику детерминирует отдельный *г*-оперон – т.е. в состав R-плазмиды входит несколько *г*-оперонов), который, в свою очередь, тоже может существовать как самостоятельная плазида. Другими словами, конъюгативная R-плазида состоит из двух плазмид: RTF-фактора и *г*-фактора (что можно понимать, как включение меньшей *г*-плазмиды в состав большей RTF-плазмиды).

Col-плазмиды. Col-факторы, или факторы колициногенности определяют способность бактериальных клеток штаммов *E.coli* синтезировать белки - колицины, вызывающие гибель клеток, не имеющих иммунитета к колицину данного типа. Col-плазмиды подразделяют на 2 группы. Феномен колициногенности был открыт А. Gratia в 1925 году у бактерий штамма *E.coli*. Как оказалось позднее, плазмиды колициногенности достаточно широко распространены и отличаются размерами, копийностью, принадлежностью к разным группам несовместимости.

Одна бактериальная клетка может нести несколько разных Col - плазмид. Из чего можно сделать вывод о принадлежности указанных плазмид к разным группам несовместимости и, следовательно, отсутствию филогенетического родства между ними. Среди Col - плазмид встречаются как конъюгативные (ColIb, ColV и др.), так и неконъюгативные (ColE1, ColE2 и др.) плазмиды.

11. Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*. Плазмиды грамположительных бактерий Ti-плазида, индуцирующая опухоль плазида. Плазида почвенной бактерии

*Agrobacterium tumefaciens*, T-участок которой способен включаться в ядерную ДНК реципиентной клетки двудольных растений, что приводит к образованию специфических опухолей (корончатых галлов). У разных штаммов бактерий эта плазида кроме T-ДНК содержит область, кодирующую функцию конъюгации (Tra), область репликации (Ori V) и область вирулентности (Vir). Последовательности Ti-плазмиды, фланкирующие T-ДНК (пограничные или концевые области), играют важную роль в интеграции в растительный геном и содержат несовершенные прямые повторы по 24—25 п.н. В корончатых галлах разные штаммы *Agrobacterium tumefaciens* индуцируют синтез разных опинов (октопина, нопалина, агропина), в соответствии с чем различают октопиновые или нопалиновые Ti-плазмиды. Ti-плазмиды широко используют в качестве векторов в генной инженерии растений. Для этого переносимый (целевой) ген вставляется в Ti-плазмиду вместо области T-ДНК. Ti-плазида без T-ДНК называется обезоруженной.

Многокопийные плазмиды грамположительных бактерий размером до 10 kb, как правило, реплицируются по механизму "катящегося кольца" (плазмиды RCR-типа). В процессе копирования плазмид RCR-типа образуются промежуточные структуры, напоминающие греческую букву сигма ( $\sigma$ ) и выявляются интермедиаты в виде однострессовой ДНК. Кроме того, белки репликации плазмид RCR-типа (Rep-белки) и сайты инициации вегетативной репликации (dso и sso) характеризуются рядом отличительных особенностей. Грамотрицательные бактерии имеют дополнительный барьер проницаемости в виде внешней мембраны, через которую не проникают белковые молекулы. Поэтому некоторые ферменты, например фосфатазы, которые обычно секретируются грамположительными бактериями, задерживаются у них в периплазме. Однако и среди грамотрицательных бактерий есть виды и штаммы, способные продуцировать внеклеточные белки. Так, штаммы *E. coli*, несущие плазмиду, детерминирующую синтез гомолизина, приобретают способность и к его секреции. Первоначально гомолизин, по-видимому, поступает в периплазматическое пространство. Для выведения его из клетки необходим синтез двух белков, кодируемых той же плазмидой. Эти белки встраиваются во внешнюю мембрану и обеспечивают энергозависимое перемещение гомолизина наружу.

## 12. Природная генная инженерия плазмид

В мире микроорганизмов плазмиды играют роль своеобразных посредников при межклеточном обмене генами. Обычно о присутствии плазмид в бактериальной клетке судят по проявлению определенных признаков, к которым относятся устойчивость к отдельным лекарственным препаратам, способность к переносу генов при конъюгации, синтез веществ антибиотической природы, способность использовать некоторые сахара или обеспечивать деградацию ряда веществ. Из перечисленного выше видно, что плазмиды делают возможным существование организмов в более широком диапазоне условий внешней среды, т.е. действуют как факторы адаптации. Большую группу составляют плазмиды с нерасшифрованными функциями; такие плазмиды выявляют с использованием физико-химических методов. Большинство бактериальных плазмид имеет фактор несовместимости и фактор переноса. Они несут множество специальных, детерминируемых каждой отдельной плазмидой маркеров, таких как устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам, ультрафиолетовому облучению, способность к биосинтезу токсинов. В 60-70 годы прошлого века накопилось множество фактов, свидетельствующих о роли плазмид, преимущественно крупных, в процессе быстрого распространения в клинике устойчивых штаммов бактерий. И тогда закономерно встал вопрос о происхождении этих плазмид:

присутствовали ли они в клетках патогенных бактерий изначально (до применения антибиотиков), а затем просто произошло увеличение их численности, или же они сформировались в условиях интенсивного использования различных антибиотиков.

### 13. Понятие о фагах. Фаг $\lambda$ . Генетика.

Бактериофаги, или фаги - вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки и клетки архей. Чаще всего бактериофаги размножаются внутри бактерий и вызывают их лизис. Как правило, бактериофаг состоит из белковой оболочки и генетического материала одноцепочечной или двуцепочечной нуклеиновой кислоты (ДНК или, реже, РНК).

Фаг лямбда (фаг  $\lambda$ ) — это умеренный бактериальный вирус *E. coli* двухцепочечной геномной ДНК. Был впервые обнаружен Э. Ледербергом в 1950 году (Е.М. Lederberg, 1950). Основное отличие – могут быть в 3-х состояниях: Вирион, Вегетативный фаг, Профаг. Длинный хвостовой отросток, ДНК 2-х цепочечная, линейная внутри головки. На 5'-конце каждой ее цепи имеется одноцепочечная последовательность из 12 нуклеотидов – липкие концы (cos-сайты). Сразу же после проникновения фаговой ДНК в бактериальную клетку, липкие концы ДНК ковалентно соединяются ДНК-лигазой клетки-хозяина и образуется кольцевая молекула. Далее, как правило, эта кольцевая молекула бактериофаговой ДНК не приступает к транскрипции, а встраивается в бактериальную хромосому. Установлено, что гены фага  $\lambda$  кодируют синтез четырех регуляторных белков, один из которых репрессорный белок cI (кодируется геном cI) блокирует развитие событий литического цикла, а антирепрессорный белок Cro (кодируется геном cro), наоборот, запускает их. После поступления ДНК фага  $\lambda$  в клетку, выбор между литическим и лизогенным путями развития зависит от относительной скорости накопления регуляторных белков: если преобладает антирепрессорная функция белка Cro, то развиваются события литического цикла, если успеет проявиться функция репрессорного белка cI, литический цикл не осуществляется, так как белок cI связывается с ДНК фага  $\lambda$  в особых участках, препятствуя транскрипции фаговых генов.

Встраивание ДНК фага  $\lambda$  в бактериальную хромосому осуществляется согласно интегративной модели А.Кемпбелла. Этот процесс называется сайт-специфической рекомбинацией, так как встраивание ДНК фага  $\lambda$  осуществляется в одном и том же месте (сайте) между генами gal и bio и не зависит от гес А-системы бактериальной клетки. За интеграцию ДНК фага  $\lambda$  ответственен фермент лямбда-интеграза. Этот фермент узнает дверазные последовательности – одну в хромосомной ДНК (att  $\lambda$ ), а другую в ДНК фага (b2). Затем происходит разрыв обеих молекул ДНК и последующее их перекрестное воссоединение. После этого ДНК фага  $\lambda$  реплицируется с клеточной ДНК как единая структура, и все дочерние клетки при делении получают копию фаговой ДНК в составе хромосомы. Подобные клетки называются лизогенными, а ДНК фага  $\lambda$  в них – профагом.

### 14. Фаг $\lambda$ . Механизм лизогении. Получение необычных трансдуцирующих фагов.

Лизогенный цикл, или лизогения (англ. Lysogenic cycle) — тип жизненного цикла бактериофагов, при котором фаг встраивает свой геном в геном бактерии и удваивается при каждом делении клетки (такая стадия жизненного цикла вируса называется профагом), то есть не убивает клетку-хозяина сразу, в отличие от литического цикла.

Лизогения запускается при блокировке литического цикла. Так, баланс между литическим и лизогенным циклом у фага  $\lambda$  зависит от двух белков: репрессора, необходимого для лизогении, и белка Cro, без которого полный литический цикл невозможен. Эти белки синтезируются на ранней стадии и при литическом цикле, и при лизогенном. Эти два белка конкурируют за связывание с определённым оператором. Если белок cII, необходимый для перехода к лизогении, сможет стимулировать образование такого количества репрессора, чтобы он противодействовал Cro, то будет сохраняться лизогения, в противном случае фаг переключится на литическую программу. Именно белок-репрессор, кодируемый геном cI, поддерживает лизогению и блокирует транскрипцию ранних генов литического цикла, связываясь с ключевыми операторами OL и OR, предотвращая транскрипцию гена cro, без белкового продукта которого литический цикл невозможен. Чтобы связываться с операторами, репрессор должен иметь димерную форму. Более того, для поддержания лизогении необходимо присутствие его димеров. Репрессор связывается с ДНК с помощью мотива «спираль-поворот-спираль», причём димеры репрессора связываются с оператором кооперативно.

Явление переноса генетической информации от клетки-донора к клетке-реципиенту с помощью фага было названо трансдукцией. Трансдукция основана на том, что в процессе размножения фагов в бактериях могут образовываться фаговые частицы, которые наряду с фаговой ДНК или вместо нее содержат фрагменты бактериальной ДНК. Такие фаговые частицы называются трансдуцирующими. По морфологии и адсорбционным свойствам они ничем не отличаются от обычных фаговых вирионов, но при заражении ими новых клеток передают генетические детерминанты предыдущего хозяина. В соответствии с этим принято выделять два типа трансдукции:

- генерализованную (неспецифическую, или общую);
- специфическую, или ограниченную.

#### 15. Фаги лямбдоидного семейства.

Скудное строение генов, порядок. Одинаковый механизм лизогении. Белки-репрессоры: cII Int.

Колифаги - бактериофаги (вирусы бактерии), которые заражают бактериальную клетку, размножаются в ней и убивают её. Обычно колифаги обитают в колиформных бактериях. Бактериофаги являются также индикаторами качества воды (степени очистки воды) из-за сходства с кишечными вирусами (энтеровирусами) человека. Они достаточно хорошо обнаруживаются. Наиболее изучены две группы: соматические колифаги, которые инфицируют штаммы организма - хозяина (E.Coli) через рецепторы клеточных стенок; и F-специфические РНК-бактериофаги, которые инфицируют штаммы E.Coli и родственные бактерии через F- или секс-пили.

#### 16. Фаг P1.

P1 является умеренным бактериофагом, который заражает *Escherichia coli* и некоторые другие бактерии. При прохождении лизогенного цикла геном фагов существует как плазида в бактерии, в отличие от других фагов (например, фагов лямбды), которые интегрируются в ДНК хозяина. P1 имеет головку, содержащую ДНК, прилагается к контрактильный хвост с шестью хвостовыми волокнами. P1 фаг получил исследовательский интерес, потому что он может быть использован для передачи ДНК

из одной бактериальной клетки в другую в процессе, известном как трансдукция. Как он реплицирует во время своего литического цикла он захватывает фрагменты хромосомы хозяина. Если полученные вирусные частицы используются для заражения другого хозяина, захваченные фрагменты ДНК могут быть интегрированы в геном нового хозяина. Этот метод геной инженерии *in vivo* широко использовался в течение многих лет и до сих пор используется и сегодня, хотя и в меньшей степени. P1 также может быть использован для создания вектора клонирования искусственных хромосом P1, который может нести относительно большие фрагменты ДНК. P1 кодирует рекомбиназы сайта конкретных, *Cre*, который широко используется для выполнения клеточных конкретных или времени конкретных рекомбинации ДНК путем фланговых целевой ДНК с локус P сайтов.

Геном фага p1 умеренно велик, около 93Kbp в длину. В вирусной частице он находится в виде линейной двойной молекулы ДНК. После вставки в хост он циркуляризируется и реплицируется как плазида. В вирусной частице молекула ДНК длиннее (110Kbp), чем фактическая длина генома. Он создается путем вырезания фрагмента соответствующего размера из конкатемерной цепи ДНК, имеющих несколько копий генома. Из-за этого концы молекулы ДНК идентичны. Это называется неизлечимо излишним. Это важно для ДНК, чтобы быть круговой в хозяине. Другим последствием вырезания ДНК из конкатемера является то, что данное линейное молекула может начаться в любом месте на круговом геноме. Это называется циклической перестановкой. Геном особенно богат последовательностями Chi, признанными бактериальной рекомбиназой RecBCD. Геном содержит два происхождения репликации: *oriR*, который реплицирует его во время лизогенного цикла и *oriL*, который реплицирует его на литической стадии. Геном P1 кодирует три tRNAs, которые выражаются в литической стадии.

#### 17. Фаг M13. Эволюционные взаимоотношения плазмид и фагов.

Бактериофаг, геном которого представлен кольцевой одноцепочечной ДНК, специфичен в отношении мужских (F+) клеток *E. coli* - M13 не лизирует клетку-хозяина, а фаговое потомство постоянно выходит в межклеточную среду; M13-ДНК широко используется в качестве вектора для клонирования, т.к. позволяет выделять клонированные в составе вектора фрагменты ДНК в одноцепочечной форме, что позволяет непосредственно использовать их для секвенирования по методу Сэйнджера. Капсид фага прежде всего собрано от 50 белков аминокислоты, названных pVIII (или p8), который закодирован геном VIII (или g8) в геноме фага. Для дикой частицы типа M13 это делает приблизительно 2 700 копий p8, чтобы сделать пальто приблизительно 900 нм длиной. Общие стадии к вирусному жизненному циклу: инфекция, повторение вирусного генома, собрание новых вирусных частиц и затем выпуска частиц потомства от хозяина. Волокнистое использование фага бактериальная структура, известная как F-пиль, чтобы заразить *E. coli*, с наконечником M13 p3, связывающимся с белком TolA на бактериальном pilus. Геном фага тогда передан цитоплазме бактериальной клетки, где резидентские белки преобразовывают одноцепочечный геном ДНК в двухцепочечную репликативную форму («RF»). Эта ДНК тогда служит шаблоном для выражения генов фага.

Эволюционные взаимоотношения плазмид и фагов: играют роль в эволюции бактерий, способствуют горизонтальному переносу генов. Изучая плазмиды и фаги можно понять эволюцию более сложных организмов. Плазмиды – свойства фагов и плазмид наиболее интересный объект. Предполагается, что это промежуточное звено между

плазмидами и фагами или продукт их эволюционного взаимодействия. Фаг и плазмиды не могут размножаться вне клетки. Предполагается, что вирусы берут своё начало со стадии плазмид. Первые вирусы были фазмидами, утратили свойства плазмиды и стали вирусамис литическим путём.

#### 18. Понятие о векторах.

Вектор – обязательная генетическая конструкция, используемая в опытах по генной инженерии. Вектором (лат. – переносчик, носитель) в ГИ называют молекулу ДНК, способную самостоятельно реплицироваться, включать чужеродную ДНК, переносить ее в реципиентные клетки и стабильно там поддерживать. Векторы используют для создания *in vitro* молекул рекДНК и для последующего введения их в клетки, в составе которых они клонируют число чужеродных генов.

#### 19. Общая характеристика векторов. Какие факторы являются определяющими при выборе клонирующего вектора?

Требования к вектору.

1. Вектор должен длительное время существовать в популяции клеток- хозяев, т.е. реплицироваться автономно или вместе с хромосомами клеток.
2. В любом векторе должны быть биохимические или генетические маркеры, которые позволяли бы обнаруживать его присутствие в клетках. Можно выделить 2 группы маркерных генов, позволяющие отличить трансформированные клетки: Селективные гены, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.), гербицидам (у растений). Это могут быть гены ауксотрофности по какому-либо субстрату и т.д. Основной принцип работы такого маркера – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток. Репортерные гены, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано (гены  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS), зеленого флюоресцентного белка (GFP), люциферазы (LUC), хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT)).
3. Структура вектора должна допускать встраивание в нее чужеродной последовательности нуклеотидов без нарушения ее функциональной целостности. Это значит, что вектор должен содержать хотя бы один единичный сайт рестрикции.

Классификация

векторов:

По области  
использования:

1. Клонирование (клонирование генов, кДНК или любых фрагментов ДНК).
2. Экспрессирующие (синтез мРНК и белков).
3. Интегративные (обеспечивают интеграцию чужеродной ДНК в геном клетки или вируса)
4. Специализированные векторы (секвенирование и мутирование генов). По происхождению:
  1. Плазмидные
  2. Фаговые

3. Гибридные (сочетают свойства плазмид и фагов). По структуре ДНК:

1. Кольцевые
2. Линейные

По способу поддержания в клетке:

1. Автономные (реплицирующиеся самостоятельно)
2. Интегративные (реплицирующие в составе клеточной хромосомы. По числу молекул в клетке:

1. Малокопийные (несколько копий)
2. Мультикопийные (десятки копий).

По числу репликаторов, имеющихся в векторном геноме:

1. Монорепликонные
2. Бирепликонные, их также называют челночными, если они могут реплицироваться в клетках различных видов

20. Системы клонирования в клетках *E. coli*. Плазмидные векторы. Трансформация клеток *E. coli* плазмидными векторами.

Первые плазмидные векторы pSC101 и ColE1 представляют интерес лишь с исторической точки зрения. Они оба несут по одному сайту узнавания для рестриктазы EcoRI и использовались для клонирования *is*coRI-фрагментов ДНК. С этой целью кольцевые векторные молекулы сначала линейризовали рестриктазой, в результате чего образовывались 3'-выступающие одонитевые концы 5'-AATT-3'. Такие же концы имелись у фрагментов чужДНК, что позволяло объединять эти молекулы благодаря их комплементарным взаимодействиям и восстанавливать ковалентные связи с помощью ДНК-лигазы. Отметим, кстати, что одновременно было предложено синтезировать комплементарные концы у взаимодействующих молекул ферментативными методами. Эти процедуры получения рекДНК стали с тех пор классическими, ознаменовав начало истории генетической инженерии.

Трансформация клеток *E. coli*. Плазмидные векторы и рекДНК, сконструированные на их основе, вводят в реципиентные клетки методом генетической трансформации, т. е. путем обработки клеток изолированной ДНК. Возможность трансформации бактерий зависит от их компетентности, т. е. от способности пропускать ДНК через клеточную стенку. Для некоторых родов бактерий (*Bacillus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Streptomyces* и др.) состояние компетентности естественно. Наиболее распространены обработка клеток двухвалентными катионами "на холоду" и электропорация (пробой клеточной стенки электрическим током). Известно также, что последовательные циклы замораживания и оттаивания ослабляют клеточную стенку и делают ее проницаемой для вхождения ДНК в клетку.

21. Системы клонирования в клетках *E. coli*. Фаговые векторы.

Векторы, сконструированные на основе ДНК фага  $\lambda$ . Фаговые векторы подразделяются на векторы внедрения и векторы замещения. Первые несут один сайт узнавания для избранной рестриктазы, поэтому у них, как и у плазмидных векторов, длина рекДНК равна сумме длин вектора и клонируемого фрагмента. Векторы замещения имеют два сайта узнавания для используемой рестриктазы, поэтому в такие векторы клонируемые фрагменты ДНК вставляют вместо участков, ограниченных данными сайтами. В обоих

случаях в реакциях образования рекДНК участвуют два фрагмента  $\lambda$  ДНК (левое и правое плечи векторного генома, имеющие на одном из своих концов *cos*-сайт) и фрагмент чужДНК. Под действием лигазы благодаря *cos*-сайтам прежде всего объединяются разные плечи  $\lambda$  ДНК. Затем образовавшиеся векторные молекулы реагируют с чужДНК и друг с другом, формируя конкатемеры. Они являются субстратом при сборке фаговых частиц *in vitro*.

Векторы, созданные на базе ДНК нитевидных фагов. Близкородственные нитевидные колифаги M13, f1 и fd обладают односторонней кольцевой ДНК, состоящей из 6,4 тыс. нуклеотидов, и имеют ряд свойств, позволяющих использовать их в качестве векторов. Во-первых, в их ДНК между генами II и IV есть межгенный участок (спейсер), в который можно вставлять чужеродные гены. Во-вторых, размер капсиды зависит от длины упаковываемой молекулы ДНК, что позволяет клонировать фрагменты ДНК размером до 15 тыс. нуклеотидов. В-третьих, они образуют фаголизаты с высокой концентрацией (до  $10^{12}$  частиц в 1 мл) и, таким образом, позволяют получать большие количества векторной и клонируемой ДНК.

## 22. Системы клонирования в клетках *E. coli*. Гибридные векторы

Фагмиды. Фагмидами называют плазмидные векторы, содержащие *ori*-сайт нитевидных фагов. Из векторов этого типа наиболее часто используются плазмиды серии pEMBL, pUC118/119 и Bluescript M13. Они образованы внедрением в векторы pUC фрагмента ДНК фага f1 или M13, содержащего сайт *pac*, необходимый для морфогенеза фаговых частиц, и сайты *ori*(+) и *ori*(-). В присутствии фага-помощника f1 (или M13) фагмиды, используя сайты *ori*(+), начинают реплицироваться как фаговые ДНК, образуя односторонние копии плазмид, причем выбор нити для копирования зависит от ориентации *ori*-сайта. Образовавшиеся односторонние ДНК могут упаковываться *in vivo* в капсулу и одновременно с фагом-помощником покидать естественным путем клетку. Таким образом, с помощью фагмид клонируемый фрагмент может быть получен и использован в одно- или двусторонней форме. Их преимущество перед векторами M13mp — возможность клонирования в них относительно больших фрагментов ДНК (до 10 т.п.н.), не подвергающихся внутренним перестройкам.

Космиды. Как уже отмечалось, емкость векторов, полученных на базе ДНК фага  $\lambda$  (не более 23 т.п.н.), ограничена тем, что существенную их часть составляют гены, кодирующие структурные белки фага. Как выяснилось, в головку этого фага может упаковаться любая ДНК подходящего размера (36—52 т.п.н.), ограниченная двумя *cos*-сайтами, ориентированными в одном направлении. Это позволило, совместив в одном геноме плазмидный репликатор и *cos*-сайт фага  $\lambda$ , создать векторы нового типа, так называемые космиды. Размер космид в среднем составляет 5 т.п.н., что позволяет с их помощью клонировать ДНК размером до 45-47 т.п.н. Поэтому космиды предназначены для конструирования банков генов. Космиды фактически представляют собой автономные *cos*-сайты. Использование их для клонирования генов основано на том, что в линеаризованной форме они могут присоединяться к обоим концам фрагментов чужДНК и образовывать структуры типа конкатемерных молекул ДНК. Такие молекулы способны упаковываться *in vitro* в головки фага  $\lambda$ , если, конечно, *cos*-сайты находятся в одинаковой ориентации и размер ДНК между ними не превышает 52 т.п.н. Инъекцированные в клетки рекомбинантные молекулы ДНК циркуляризируются через *cos*-сайты и автономно реплицируются. В присутствии фага-помощника они могут быть упакованы *in vivo* в фаговые головки и после лизиса клеток отобраны в виде

фаговых частиц.

### 23. Векторы для клонирования больших фрагментов ДНК. Векторы-транспозоны.

Клонирование больших (50—100 т.п.н. и более) фрагментов ДНК — важная проблема, поскольку при этом, во-первых, существенно облегчается создание геномных библиотек, а, во-вторых, удастся провести функциональный анализ полных больших генов или их комплексов. Действительно, многие гены эукариот состоят из нескольких сотен т.п.н., а своеобразным рекордсменом является ген дистрофина, чья транскрибируемая область превышает 2 млн.п.н. Поэтому в последнее десятилетие были предприняты усилия по конструированию емких векторов.

Векторы рНАС — пока единственные линейные прокариотические векторы. При клонировании больших фрагментов ДНК линейные векторы обладают преимуществом перед кольцевыми векторами, так как эффективность образования рекДНК в этом случае выше. В то же время следует учитывать, что в процедурах выделения большие линейные молекулы ДНК более ломки, чем кольцевые. Отметим важную особенность репликационных, использованных для создания вышеупомянутых векторов: все они малокопийны. Это вызвано необходимостью обеспечить стабильность клонируемой ДНК. Известно, что с увеличением ее размера увеличивается вероятность ее структурных перестроек (делеции, вставки, инверсии). Вероятность повышается по мере увеличения числа копий рекДНК, поскольку все более сказывается эффект межмолекулярной рекомбинации.

Векторы-транспозоны. Иногда желательно, чтобы чужДНК находилась в составе клеточной хромосомы. Например, если клетки (скажем, *Pseudomonas* или *Rhizobium*) предназначены для использования в природных условиях, то интеграция клонируемого гена в хромосому позволяет предотвратить опасность его "утечки" в другие виды бактерий. Или, допустим, изучается регуляция клонируемого гена. Тогда важно, чтобы он стабильно поддерживался в клетке в единственном числе. В таких случаях в качестве переносчика генов применяют модифицированные транспозоны, которые в свою очередь переносятся в клетки подходящими плазмидами или фагами. Векторам, которые переносят транспозоны, придают способность к "самоубийству", т.е. после цикла клеточного деления эти векторы элиминируются. Известно довольно много способов "самоубийства": термочувствительный характер репликации, включение гена-киллера (например, ген *kil* у фага  $\lambda$ ) и т.д. У векторов-транспозонов удаляют гены транспозаз, лишая их тем самым способности к самостоятельным перемещениям. На их место вставляется чужДНК. Сами гены транспозаз внедряют в векторы-носители транспозонов; именно с их помощью транспозоны переносятся в клеточный геном. После "самоубийства" векторов-носителей рекомбинантный транспозон остается локализованным в определенной точке клеточного генома.

### 24. Другие системы клонирования (использование традиционных промышленных микроорганизмов).

Векторы грамотрицательных бактерий. Векторы для грамотрицательных бактерий конструируют, используя плазмиды с широким кругом хозяев, относящихся к группам несовместимости P, Q и W. Эти плазмиды реплицируются почти во всех грамотрицательных бактериях, включая промышленно важные штаммы *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Methylophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* и др.

### Наиболее характерные

представители перечисленных групп — плазмиды RP4, RSF1010 и Sa (29,6 т.п.н.), соответственно. Плазмида RP4 имеет единственные сайты рестрикции в своих селективных генах ApR и KmR, но из-за большого размера не используется в качестве вектора. Вектором является, например, ее производная плазмида pRK2501, у которой есть сайты клонирования в генах KmR (XhoI и HindIII) и TcR (SalI), а также единственные сайты EcoRI и BglII. У этого вектора отсутствует способность к конъюгации и мобилизации, поэтому его перенос возможен только методом трансформации.

Плазмида RSF1010 мультикопийна, неконъюгативна и невелика по размеру, но в ее селективных маркерах нет единственных сайтов рестрикции, поэтому она неудобна для клонирования генов. Для этой цели применяют ее производные, из которых первыми были предложены векторы серии pKT. Преимущество описываемых векторов состоит в том, что нет необходимости делать их челночными. С их помощью вначале можно осуществлять предварительные операции по клонированию в хорошо изученных генетических системах (например, *E. coli*), а затем отобранными клонами рекДНК проводить трансформацию клеток других видов. Недостаток этих векторов — их нестабильность, которая вызвана тем, что гены, отвечающие за стабильность, разбросаны по всему плазмидному геному и часть из них отсутствует в векторах. Другой недостаток — разный уровень экспрессии плазмидных генов в разных клетках, что влияет на число копий плазмид, уровень синтеза чужеродного продукта и на эффективность выражения селективных маркеров.

Векторы *Bacillus subtilis*. Клетки *B. subtilis*, будучи почвенными микроорганизмами, обладают хорошо развитым аппаратом секреции продуктов метаболизма и выделяют в ростовую среду такие промышленно важные ферменты, как, например, амилазы,  $\beta$ -лактомазы, протеазы и др. Секреция чужеродных белков существенно облегчает их выделение и очистку, а, кроме того, иногда являются единственным средством их спасения от деградации внутри клетки.

Векторы *Streptomyces*. Грамположительные почвенные бактерии рода *Streptomyces* производят свыше 60 % известных антибиотиков и обладают собственными плазмидами и фагами. Неудивительно поэтому, что для этих клеток достигнут существенный прогресс в разработке систем клонирования. Векторы обычно конструируют на базе низкокопийных плазмид SCP2 (30 т.п.н. из *S. coelicolor*) и SLP1 (17 т.п.н. из *S. lividans*). Все плазмиды конъюгативны. Однако у мультикопийных плазмидных векторов гены, отвечающие за конъюгативность, обычно делетированы, чтобы избежать возможности неконтролируемого обмена рекомбинантными ДНК между клетками в смеси трансформантов. В качестве селективных маркеров используют гены, обеспечивающие устойчивость клеток к различным антибиотикам. Наиболее распространенным маркером является ген *tsr* (устойчивость клеток к тиострептону).

25. Предмет нехромосомной наследственности. Критерии нехромосомного наследования признаков. Методы анализа наследования внеядерных признаков. Способы определения наследования органелл.

Нехромосомное наследование - передача в ряду поколений генов, локализованных вне ядра. Для нехромосомного наследования нередко характерны сложные картины расщепления, не согласующиеся с законами Менделя. Часто этот тип наследования

также называют цитоплазматическим наследованием, понимая под этим наследование генов, расположенных не только в самой цитоплазме, но и органеллах клетки, имеющих собственную ДНК (пластидов, митохондрий), а также инородных генетических элементов (например, вирусов).

Критерии нехромосомного наследования:

- Различие результатов реципрокных скрещиваний, как в случае с ночной красавицей.

Однако эти различия могут быть вызваны и сцепленным с полом наследованием.

- Насыщающие скрещивания с заменой всех хромосом женского организма на все хромосомы мужского.
- В случае изогамии отсутствие расщепления в скрещивании при гаметическом анализе (например, в тетрадах), но наличие постзиготических расщеплений в митозах.
- Повышенная чувствительность ДНК клеточных органелл или плазмид к некоторым агентам.

Методы анализа наследования внеядерных признаков: Генотипическая преддетерминация цитоплазмы или материнский эффект цитоплазмы, материнское, отцовское и двуродительское наследование органелл, анализ неядерных генов.

Способы определения наследования органелл:

1. Множественность органелльных геномов и случайное распределение органелл в клетке создает предпосылки для соматической сегрегации генов органелл;
2. Необязательное участие генов органелл обоих родителей в половом процессе

26. Материнское, отцовское и двуродительское наследование органелл. Механизмы контроля наследования органелл.

На ранних этапах становления цитоплазматической генетики внеядерное наследование нередко называли материнским. Действительно, чаще всего органеллы передаются с цитоплазмой женских гамет от матери, поэтому одним из основных тестов на внеядерный характер признака считалась его передача по материнской линии.

В 1909 г. Баур при работе с *Pelargonium zonale* обнаружил, что одни растения при скрещивании наследовали пеструю окраску листьев от материнской формы, другие были зелеными, как отцовская форма, третьи оказывались белыми и вскоре погибали. Если проводилось реципрокное скрещивание (т.е. материнская форма была зеленой, отцовская

— пестролистной), вновь получались потомки трех типов, но их численное соотношение было другим. Таким образом, наряду с материнским наследованием органелльных признаков было описано и двуродительское. Часто наблюдается у голосеменных.

Однородительское отцовское наследование пластид первоначально было выявлено у голосеменных. Более того, у *Sequoia* и *Calocedrus* митохондрии, и хлоропласты передаются по отцовской линии, чего не обнаружено пока ни для одного из видов покрытосеменных. То есть это передача органелл гамет от отца.

Ни у голо-, ни у покрытосеменных до сих пор не найдено никаких следов системы ферментной рестрикции — модификации, которая могла бы узнавать и уничтожать органелльную ДНК одного из родителей, хотя такой тип узнавания описан для *Chlamydomonas*. Имеется лишь одна работа, прослеживающая связь между активностью фермента нуклеазы С и наличием пластидных нуклеоидов при

формировании мужского гаметофита у пяти видов цветковых растений. Авторы наблюдали строго материнское наследование с исчезновением пластидных нуклеоидов у пыльцевых клеток вида *Mirabilis jalapa*, имеющего высокую активность нуклеазы С как в пыльниках, так и в тканях пестика. У других исследованных видов активность фермента была ничтожно мала. Опубликованы результаты многочисленных исследований, описывающих события, происходящие с органеллами как во время гаметогенеза, так и после оплодотворения в зиготе.

27. Геном пластид. Типы пластид и их взаимное превращение. Геном митохондрий растений. Организация митохондриального генома грибов.  
Организация митохондриального генома животных.

Геном пластид, как водорослей, так и наземных растений представлен, как правило, кольцевой двунитевой молекулой ДНК, содержащей от 70 до 400 тысяч пар оснований. Хотя в основном геном пластид высших растений представлен 120-217 тысяч пар оснований. Пластидные ДНК таких размеров способны потенциально кодировать (информационная емкость пластома) от 70 до 150 различных полипептидов. Так как хлоропласты содержат несколько сот различных белков, то большинство белков этих органелл кодируется не пластидной ДНК, а ядерной. ДНК хлоропластов не содержит большого количества высокоповторяющихся нуклеотидных последовательностей, что отличает ее от ДНК ядра.

Различают три основных типа пластид: хлоропласты, хромопласты и лейкопласты. В эволюционном смысле первичным, исходным типом пластид являются хлоропласты, из которых при расчленении тела растений на органы произошли пластиды остальных двух типов. В процессе индивидуального развития (онтогенеза) почти все тип пластид могут превращаться друг в друга. Наиболее обычные процессы - превращение лейкопластов в хлоропласты и хлоропластов в хромопласты. В хромопласты могут превращаться и лейкопласты. При превращении хлоропластов в лейкопласты, которое может происходить при поранении растения или при помещении его в темноту, внутренняя мембранная система также в значительной степени разрушается, хлорофилл исчезает, но накопления пластоглобул не происходит. Этот процесс обратим. Например, при выставлении на свет из лейкопластов опять развиваются хлоропласты.

В отличие от большинства других эукариот, митохондрии растений имеют сложную и своеобразную генетическую систему. В пределах растительного царства структура и размер митохондриального генома сильно варьирует. Исследования митохондриальных нуклеотидных последовательностей указывают на то, что предки зеленых растений обладали компактным митохондриальным геномом, подобным митохондриальному геному современных животных. Большая часть дополнительной ДНК, найденной в геномах митохондрий растений, состоит из обширных интронов, повторов и некодирующих областей. Исходя из данных о нуклеотидных последовательностях митохондриального генома, лишь 11 - 18% мтДНК представляют собой гены, кодирующие белки или структурные РНК, более 5% последовательностей, интегрированные, по-видимому, в разные моменты эволюции, имеют хлоропластное, ядерное или вирусное происхождение. Геномы растений в сотни раз превышают мт геномы животных.

Геном грибов: *S. cerevisiae* — классический генетический объект — является также одним из наиболее детально изученных и в митохондриальной генетике. Основной наследственной единицей митохондриального генома дрожжей является нуклеоид,

имеющий диаметр 20 — 50 нм и состоящий обычно из 3—4 молекул мтДНК. Митохондриальная ДНК дрожжей связана с гистоноподобными белками. Показано, что при аминокислотном голодании у мутантов дрожжей с дыхательной недостаточностью (*petite*) количество нуклеоидов увеличивается примерно в 10 раз при неизменном количестве копий мтДНК. Увеличение числа нуклеоидов способствует усилению трансмиссии мтДНК.

Геном животных: митохондриальные геномы животных даже самых отдаленных филогенетических групп весьма сходны и значительно уступают по размерам митохондриальной ДНК большинства грибов и особенно мтДНК растений. Митохондриальная ДНК животных представляет собой замкнутую кольцевую молекулу размером от 14 до 42 т.п.н. Увеличение размеров митохондриальных геномов некоторых животных обычно происходит за счет некодирующих повторяющихся последовательностей, почти всегда в контрольной области. Митохондриальные геномы животных несут стандартный набор из 37 генов, не содержащих интронов.

#### 28. Симбиотическое происхождение клеточных органелл.

В результате изучения последовательности оснований в митохондриальной ДНК были получены весьма убедительные доводы в пользу того, что митохондрии — это потомки аэробных бактерий (прокариот), родственных риккетсиям, поселившихся некогда в предковой эукариотической клетке и «научившимися» жить в ней в качестве симбионтов (организмов, участвующих в симбиозе).

Пластиды, подобно митохондриям, имеют свои собственные прокариотические ДНК и рибосомы. По-видимому, хлоропласты произошли от фотосинтезирующих бактерий, поселившихся в своё время в гетеротрофных клетках протистов, превратив их в автотрофные водоросли.

29. Особенности проявления и наследования патологий при аномалиях митохондриального генома человека. Полный сиквенс митохондриального генома человека. Первые работы по митохондриальной генетике человека с выявлением конкретных мутаций в мтДНК.

Митохондриальное (цитоплазматическое) наследование характерно для особого класса наследственной патологии – митохондриальных болезней. Развитие генетики сделало возможным исследование комплексных признаков, которые формируются при взаимодействии нескольких генов. На этой основе возникла концепция олигогенного (дигенного и триаллельного) наследования:

При дигенном наследовании наблюдается аддитивный эффект гетерозиготных мутаций в двух различных локусах. Например, одна из форм пигментного ретинита, приводящая к потере зрения, вызвана гетерозиготностью по мутациям двух генов (ROM1 и PRPH). Оба эти гена кодируют белки, присутствующие в фоторецепторах сетчатки глаза. Индивидуумы, гетерозиготные по мутации только одного из этих двух генов, не имеют клинических проявлений.

Триаллельное наследование можно рассмотреть на примере синдрома Барде-Бидля – редкого заболевания, характеризующегося ожирением, полидактилией, аномалиями почек, пигментным ретинитом и когнитивными нарушениями. Семь различных генных локусов, мутации в которых ведут к синдрому Барде-Бидля, были идентифицированы. До недавнего времени считалось, что заболевание наследуется аутосомно-рецессивно. Однако, сейчас известно, что есть одна форма синдрома, когда индивидуум, гомозиготный по мутациям одного локуса, является также гетерозиготным по мутации другого локуса. Таким образом, для того, чтобы заболевание проявлялось, необходимо

три мутантных аллеля.

Антиципация. При некоторых аутосомно-доминантных болезнях манифестация симптомов более ранняя и течение болезни более тяжелое у потомков по сравнению с их родителями, также страдающими этим заболеванием. Феномен увеличения тяжести болезни из поколения в поколение называют антиципацией. Одним из объяснений антиципации является экспансия нестабильных триплетных повторов. В качестве примеров можно привести такие болезни экспансии триплетных повторов, как миотоническая дистрофия, хорей Гентингтона, болезнь Кеннеди.

При отсутствии известных мутаций мтДНК в мышечной ткани следующим этапом молекулярно-генетического анализа является секвенирование всей цепи мтДНК. Это исследование, однако, является не только достаточно трудоемким и дорогостоящим, но и связано с определенными сложностями в интерпретации получаемых результатов. Поэтому предварительно необходимо провести весь комплекс морфогистохимических и биохимических анализов мышечного биоптата с целью получения абсолютно достоверных данных, позволяющих подтвердить первичную митохондриальную патологию и по возможности установить конкретное звено митохондриальной дисфункции. Так например, важными маркерами могут служить выявляемые цитохром-с-оксидазно-негативные и «рваные красные» волокна, нарушение окисления пирувата и скорости синтеза АТФ, дефекты активности отдельных субъединиц комплекса дыхательной цепи и т.д. В ряде случаев указанные нарушения позволяют весьма точно локализовать биохимический уровень поражения и предположительно установить ген или группу генов мтДНК, в которых может иметь место мутация.

Первые патогенные мутации в митохондриальной ДНК (мтДНК) обнаружены в начале 1990-х годов. Неожиданным и до сих пор необъяснимым оказалось то, что геном митохондриальной ДНК (мтДНК) мутирует с частотой в 10 раз больше, чем ядерной ДНК. Спектр клинических проявлений, вызванных мутациями мтДНК, разнообразен, хотя преобладает нервно-мышечная патология.

В митохондриальной ДНК (мтДНК) обнаружено более 100 различных перестроек и около 100 разных точковых мутаций, вызывающих заболевания. Распространенность мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК), в по крайней мере в одной европейской популяции, приблизительно 1 на 8000. В мтДНК обнаружены три типа мутаций:

1. миссенс-мутации в кодирующих регионах генов, изменяющие активность белковоокислительного фосфорилирования;
2. точковые мутации в тРНК или генах рРНК, нарушающие белковый синтез в митохондриях;
3. перестройки, вызывающие делеции или дупликации молекулы мтДНК.

#### **4. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ**

##### **4.1. Порядок проведения промежуточной аттестации**

В рамках **текущего контроля** в течение семестра для оценки знаний, умений, навыков, получаемых в ходе изучения дисциплины, учитываются успешность ответов на вопросы устного, подготовка реферативных сообщений, выполнение лабораторных работ.

Критерием успешности освоения учебного материала **по окончании учебного семестра** (промежуточная аттестация) является экспертная оценка преподавателя, учитывающая: текущую успеваемость в течение семестра (устный

опрос, реферативное сообщение, лабораторная работа). Кроме того, экспертная оценка преподавателя может основываться на регулярности посещения обязательных учебных занятий, успешности выполнения установленных на данный семестр объемов рабочей программы.

Промежуточная аттестация проводится в форме экзамена по билетам. Билет содержит два теоретических вопроса.

## **4.2 Критерии оценивания промежуточной аттестации по видам оценочных средств**

### **4.2.1 Критерии оценивания теоретического вопроса экзамена**

**«Отлично» (5)** – студент глубоко и полно владеет содержанием учебного материала и понятийным аппаратом; умеет связывать теорию с практикой, иллюстрировать примерами, фактами, данными научных исследований; осуществляет межпредметные связи, предложения. Делает выводы; логично, четко. Ясно и кратко излагает ответы на поставленные вопросы; умеет обосновывать свои суждения и профессионально-личностную позицию по излагаемому вопросу. Ответ носит самостоятельный характер.

**«Хорошо» (4)** – ответ студента соответствует указанным выше критериям, но содержание ответа имеет отдельные неточности (несущественные ошибки) в изложении теоретического и практического материала, отличается меньшей обстоятельностью,

глубиной, обоснованностью и полнотой; допущенные ошибки исправляются студентом после дополнительных вопросов преподавателя.

**«Удовлетворительно» (3)** – студент обнаруживает знание и понимание основных положений учебного материала, но излагает его неполно, непоследовательно, допускает неточности и существенные ошибки в определении понятий, формулировке положений, не привлекает для аргументации ответа основные положения исследовательских, концептуальных и нормативных документов, не умеет обосновать свои суждения; наблюдается нарушение логики изложения. Ответ отличается низким уровнем самостоятельности, не содержит собственной профессионально-личностной позиции.

**«Неудовлетворительно» (2)** – студент имеет разрозненные, бессистемные знания: не умеет выделять главное и второстепенное; допускает ошибки в определении понятий, формулировке теоретических положений, искажающие их смысл; не ориентируется в нормативно-концептуальных, программно-методических, исследовательских материалах, беспорядочно и неуверенно излагает материал; не умеет соединять теоретические положения с педагогической практикой; не умеет применять знания для обоснования и объяснения фактов, не устанавливает межпредметные связи. Не владеет фактическим материалом.

## **4.3. Результаты промежуточной аттестации и уровни сформированности компетенций**

При подведении итогов учитываются результаты текущей аттестации.

Особенности проведения процедуры оценивания результатов обучения инвалидов или лиц с ограниченными возможностями здоровья обозначены в рабочей программедисциплины (модуля).

«1 уровень» - ознакомление (иметь общее представление, узнавать);

«2 уровень» - понимание учебного материала, излагаемого в учебнике, методической разработке или преподавателем;

«3 уровень» - умение логично, последовательно, достаточно полно и точно излагать изученный материал;

«4 уровень» - творчески использовать полученные знания.

Для удовлетворительной (положительной) оценки знаний требуется минимум 3-й уровень усвоения учебного материала.

### Требования (критериальные показатели) к уровню освоения дисциплины

Результат экзамена	Требования к знаниям
Отлично	студент глубоко и полно владеет содержанием учебного материала и понятийным аппаратом; умеет связывать теорию с практикой, иллюстрировать примерами, фактами, данными научных исследований; осуществляет межпредметные связи, предложения. Делает выводы; логично, четко. Ясно и кратко излагает ответы на поставленные вопросы; умеет обосновывать свои суждения и профессионально-личностную позицию по излагаемому вопросу. Ответ носит самостоятельный характер.
Хорошо	ответ студента соответствует указанным выше критериям, но содержание ответа имеет отдельные неточности (несущественные ошибки) в изложении теоретического и практического материала, отличается меньшей обстоятельностью, глубиной, обоснованностью и полнотой; допущенные ошибки исправляются студентом после дополнительных вопросов преподавателя.
Удовлетворительно	студент обнаруживает знание и понимание основных положений учебного материала, но излагает его неполно, непоследовательно, допускает неточности и существенные ошибки в определении понятий, формулировке положений, не привлекает для аргументации ответа основные положения исследовательских, концептуальных и нормативных документов, не умеет обосновать свои суждения; наблюдается нарушение логики изложения. Ответ отличается низким уровнем самостоятельности, не содержит собственной профессионально-личностной позиции.

Неудовлетворительно	студент имеет разрозненные, бессистемные знания: не умеет выделять главное и второстепенное; допускает ошибки в определении понятий, формулировке теоретических положений, искажающие их смысл; не ориентируется в нормативно-концептуальных, программно-методических, исследовательских материалах, беспорядочно и неуверенно излагает материал; не умеет соединять теоретические положения с педагогической практикой; не умеет применять знания для обоснования и объяснения фактов, не устанавливает межпредметные связи. Не владеет фактическим материалом.
---------------------	--

**06.03.01 Биология, направленность (профиль) Генетика, ФОС РПД  
Внеядерная и внехромосомная наследственность, форма обучения  
очная**

Проректор по учебной работе      утверждено 24.02.2025      А.А. Саламатов

Ученым советом биологического факультета

Протокол заседания № 6 от 21.02.2025

Председатель Ученого совета

биологического факультета      согласовано      Д.С. Сташкевич

**Заседанием кафедры радиационной биологии**

Протокол заседания № 7 от 21.02.2025

Заведующий кафедрой      согласовано      А.В. Аклеев

Автор (составитель)      Е.В. Стяжкина

**Структура рабочей программы соответствует приказу ректора ФГБОУ ВО  
«ЧелГУ» от «13» апреля 2021 г. № 247-1**