

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА  
ШЕВЧЕНКА  
ННЦ «Інститут біології та медицини»**

**Чопей М.І., Афанасьєва К.С.**

Методичні рекомендації до курсу

**«СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ»**

**КИЇВ - 2020**

*Рекомендовано Вченою радою ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 7 від 10 лютого 2020 року)*

**Автори:**

Чопей М.І., к.б.н., асистент кафедри фундаментальної медицини  
Афанасьєва К.С., д.б.н., доцент кафедри загальної та медичної генетики

**Рецензенти:**

Савчук О.М., д.б.н., професор, завідувач кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Скрипник Н.В., к.б.н., доцент кафедри цитології, гістології та репродуктивної ембріології, заступник директора з навчально-педагогічної роботи ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

**Методичні рекомендації до курсу «Сучасні проблеми молекулярної біології» / Чопей М.І., Афанасьєва К.С. – Київ: 2020. – 36 с.**

Методичні рекомендації містять перелік основних понять та завдань, а також практичні роботи до практичних занять з курсу «Сучасні проблеми молекулярної біології», наведені приклади модульно-рейтингових питань. Для окремих завдань наведено алгоритм їх розв'язку.

Методичні рекомендації призначені для студентів ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, які навчаються за освітньою програмою «Медицина», освітнього рівня «Магістр».

## ЗМІСТ

<b>Тема 1.</b> Принципи організації геному людини .....	4
<b>Тема 2.</b> Молекулярні механізми транскрипції у еукаріот.....	11
<b>Тема 3.</b> Процесинг молекул РНК.....	17
<b>Тема 4.</b> Молекулярні механізми трансляції у еукаріот.....	22
<b>Тема 5.</b> Сучасні молекулярно-біологічні методи, що застосовуються для діагностики захворювань.....	29
<b>Список рекомендованих джерел.....</b>	<b>35</b>

# ТЕМА 1

## ПРИНЦИПИ ОРГАНІЗАЦІЇ ГЕНОМУ ЛЮДИНИ

*Питання для обговорення:*

1. Структура ДНК.
2. Структура хроматину.
3. Хромосоми людини.
4. Варіабельність геному людини. Механізми виникнення варіабельності геному людини.
5. Приклади захворювань, асоційованих з варіабельністю геному.

*Основні терміни та поняття:*

**Водневі зв'язки** – слабкі нековалентні взаємодії між атомом Гідрогену, що приєднаний до електронегативного атому, як наприклад, Оксиген чи Нітроген, (ця група є донором водневого зв'язку) та електронегативним атомом іншої хімічної групи та молекули (акцептор водневого зв'язку).

**Фосфодиефірний зв'язок** – ковалентний зв'язок, що утворюється між фосфатною групою одного нуклеотида та ОН-групою при 3'-атомі пентози іншого нуклеотида.

**Нуклеотид** – структурний компонент (мономер) ДНК та РНК молекул. Кожен нуклеотид складається з трьох частин: азотиста основа (аденін, гуанін, цитозин, тимін або урацил), цукру-пентози (рибоза або дезоксирибоза) та залишку фосфорної кислоти.

**ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота)** – макромолекула, що складається з двох антипаралельних полімерних ланцюгів, які утримуються разом за рахунок водневих зв'язків між їх мономерами – дезоксирибонуклеотидами. Первинний носій генетичної інформації.

**Подвійна спіраль** – структурна організація молекули ДНК, в якій два антипаралельні полінуклеотидні ланцюги, з'єднані за рахунок водневих зв'язків між парами азотистих основ, взаємозакручені один навколо одного.

**Комплементарність** – хімічна спорідненість між азотистими основами ланцюгів нуклеїнових кислот, що є результатом утворення водневих

зв'язків між ними. Є підґрунтям для спарювання основ між ланцюгами подвійної спіралі ДНК (А-Т та G-C пари), а також між ланцюгами ДНК та РНК протягом експресії генів у клітинах та при використанні методик молекулярної гібридизації (А-U та G-C пари).

**Стекінг-взаємодії** – тип нековалентних взаємодій між парами азотистих основ, що забезпечують стабілізацію подвійної спіралі ДНК. Містять два компоненти: гідрофобні взаємодії та вандерваальсові взаємодії між парами азотистих основ.

**Хроматин** – комплекс молекул ДНК та асоційованих з нею білків (гістони та негістонові білки), що забезпечує компактну укладку ДНК протягом інтерфази в ядрах еукаріотів.

**Нуклеосома** – ключова структура, пов'язана з організацією хроматину в ядрах еукаріотів, що складається з октамеру гістонових молекул (чотири пари корових гістонових білків – Н2А, Н2В, Н3 та Н4), навколо якого намотана молекула ДНК, довжиною 145 п.н.

**Гістони** - група білків, що характеризуються високим позитивним зарядом, та беруть участь у нуклеосомному (Н2А, Н2В, Н3 та Н4) та наднуклеосомному (Н1) рівнях організації хроматину.

**Петельні домени ДНК** – структурно-функціональний рівень організації інтерфазного хроматину, що полягає у закріпленні («заякоренні») двох кінців молекули ДНК за допомогою ядерних білків. Формування та реорганізація петельних доменів тісно пов'язані з активацією та репресією транскрипції, реплікацією та репарацією ДНК.

**Еухроматин** – ділянки хроматину, що є слабо конденсованими в період інтерфази і слабо профарбовуються специфічними барвниками, порівняно з іншими регіонами хроматину. В таких ділянках міститься основна кількість генів.

**Гетерохроматин** – ділянки хроматину, які є сильно конденсованими в період інтерфази і, відповідно, значно інтенсивніше профарбовуються специфічними барвниками, порівняно з іншими регіонами хроматину. В таких ділянках переважно міститься невелика кількість генів.

**Геном** – сукупність послідовностей ДНК, що міститься в гаплоїдному наборі певного організму; включає в себе як кодуючі, так і некодуючі послідовності.

**Однонуклеотидний поліморфізм (Single nucleotide polymorphism, SNP)** – однонуклеотидна варіабельність геному між двома чи більше індивідами в межах конкретного генетичного локусу. В геномі людини знайдено близько 3 000 000 SNP.

**Copy number variation (CNV)** – тип варіабельності геному, при якому спостерігається відмінність у кількості копій певної повторюваної ділянки ДНК у особин одного виду.

**Варіабельні нуклеотидні тандемні повтори (Variable number tandem repeats, VNTR)** – варіабельність геному, що проявляється у різній кількості копій коротких повторюваних послідовностей ДНК (завдовжки від 2 до 20 нуклеотидів), які представлені у вигляді тандемних повторів, у особин одного виду. Наявність таких варіабельних тандемних повторів стало передумовою для розвитку методик ДНК фінгерпринтингу.

**Реплікація ДНК** – процес подвоєння молекул ДНК, що відбувається перед проходженням клітиною мітотичного чи мейотичного поділу та забезпечує відтворення та передачу генетичної інформації дочірнім клітинам.

**Мутації** – стійкі зміни в структурі чи кількості молекул ДНК.

**Репарація ДНК** – сукупність процесів, що спрямовані на виправлення помилок у структурі ДНК, які виникли в процесі реплікації чи під дією мутагенних факторів.

*Приклади типових задач:*

1. Фрагмент одного з ланцюгів ДНК має наступну нуклеотидну послідовність:

**5'-ACCTAGCTCGCTTATGGCAC-3'**

Визначте послідовність нуклеотидів у комплементарному ланцюгу.

2. Фрагмент одного з ланцюгів ДНК має наступну нуклеотидну послідовність:

**5'-ACCTAGCTCGCTTATGGCAC-3'**

Запишіть схему структури дволанцюгової молекули ДНК. Яка довжина цього фрагмента? Якою є маса ДНК? Середня молекулярна маса одного нуклеотида – 330, а відстань між сусідніми парами нуклеотидів в молекулі ДНК – 0,34 нм.

3. Фрагмент молекули ДНК містить 380 аденілових нуклеотидів, що становить 19% від загальної кількості. Визначте, скільки в даному фрагменті тимідилових, гуанілових та цитидилових нуклеотидів.
4. Фрагмент молекули ДНК містить 290 аденілових нуклеотидів, що становить 15% від загальної кількості. Визначте, скільки в даному фрагменті цитидилових нуклеотидів.
5. Фрагмент молекули ДНК містить 500 цитидилових нуклеотидів, що становить 22% від загальної кількості. Визначте довжину даного фрагменту? Відстань між сусідніми парами нуклеотидів в молекулі ДНК – 0,34 нм.
6. Фрагмент молекули ДНК містить 250 гуанілових нуклеотидів, що становить 22% від загальної кількості. Визначте молекулярну масу даного фрагменту? Середня молекулярна маса одного нуклеотида – 330.
7. Фрагмент молекули ДНК містить 17% аденілових нуклеотидів. Який відсоток гуанілових нуклеотидів у даному фрагменті?
8. Фрагмент молекули ДНК містить 17% тимідилових нуклеотидів. Який відсоток тимідилових, гуанілових та цитидилових нуклеотидів у даному фрагменті?
9. В одному ланцюзі ДНК міститься 140 аденілових, 59 гуанілових, 87 тимідилових та 102 цитидилових нуклеотидів. Визначте довжину даного фрагменту ДНК. Відстань між сусідніми парами нуклеотидів в молекулі ДНК – 0,34 нм.

10. В одному ланцюзі ДНК міститься 54 аденілових, 95 гуанілових, 120 тимідилових та 154 цитидилових нуклеотидів. Визначте молекулярну масу даного фрагменту ДНК? Середня молекулярна маса одного нуклеотида – 330.
11. Довжина ділянки молекули ДНК становить 1700 нм. Визначте кількість нуклеотидів в даній ділянці. Відстань між сусідніми парами нуклеотидів в молекулі ДНК – 0,34 нм.
12. Довжина ділянки молекули ДНК становить 3400 нм. Визначте молекулярну масу даного фрагменту. Середня молекулярна маса одного нуклеотида – 330, а відстань між сусідніми парами нуклеотидів в молекулі ДНК – 0,34 нм.
13. Фрагмент ДНК має 150 пар нуклеотидів. Скільки фосфатних залишків має цей фрагмент?
14. Скільки фосфатних залишків має фрагмент ДНК, довжиною 850 нм? Відстань між сусідніми парами нуклеотидів в молекулі ДНК – 0,34 нм.
15. Два ланцюги ДНК з'єднані водневими зв'язками. Визначте число водневих зв'язків в ділянці ДНК, яка містить 42 аденілових нуклеотида та 32 гуанілових нуклеотида.

### *Практична робота 1*

#### **Робота з електронною базою даних OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)**

*Мета роботи:* Ознайомитися з базою даних OMIM. Проаналізувати один з генів людини (його функцію, локалізацію, мутації та спадкові захворювання, спричинені ними). Проаналізувати різні хромосоми людини відносно кількості генів, локалізованих у них. Порівняти статеві хромосоми людини, знайти псевдоаутосомні регіони у них.

*Хід роботи:*

1. Перейти за посиланням <https://omim.org/>. Ознайомитися із загальними опціями онлайн бази даних.
2. Ввести у рядок пошуку назву гена людини, що кодує певний білок (наприклад, dystrophin – білок м'язової тканини, що забезпечує об'єднання актинових філаментів; мутації в гені даного білка призводять до розвитку ряду спадкових захворювань, зокрема, міодистрофії Дюшена).
3. Перейти за посиланням, що відповідає найбільш релевантному результату. Ознайомитися з отриманою інформацією що стосується функції гена, його локалізації, мутацій та спадкових захворювань, що спричинені ними.
4. Перейти за посиланням <https://omim.org/geneMap/#>, де # - це позначка хромосоми (1-22, X, Y). Заповнити таблицю, де зазначити загальну кількість локусів для кожної хромосоми та приклади захворювань, асоційованих з мутаціями у генах, що розташовані у відповідній хромосомі:

<b>Хромосома</b>	<b>Загальна кількість генів/локусів</b>	<b>Приклади захворювань</b>

5. Для статевих хромосом заповнити таблицю псевдоаутосомних локусів:

<b>Ген/Локус</b>	<b>Положення в X-хромосомі</b>	<b>Положення в Y-хромосомі</b>	<b>Захворювання, пов'язані з мутаціями в гені/локусі</b>

6. Зробити загальний звіт по інформації, отриманій стосовно обраного гена людини, та кількості генів і пов'язаних з ними спадковими захворюваннями по кожній хромосомі людини.

*Приклади модульно-рейтингових питань:*

1. З яких компонентів складається нуклеотид?

2. З яких компонентів складається рибонуклеотид?
3. З яких компонентів складається дезоксирибонуклеотид?
4. З яких компонентів складається аденіловий рибонуклеотид?
5. З яких компонентів складається аденіловий дезоксирибонуклеотид?
6. З яких компонентів складається урациловий нуклеотид?
7. З яких компонентів складається тимідиловий нуклеотид?
8. Як називаються нековалентні взаємодії, які головним чином стабілізують подвійну спіраль ДНК?
9. Скільки гістонових молекул входить до складу нуклеосоми?
10. Скільки типів гістонових молекул входить до складу нуклеосоми?
11. Скільки хромосом міститься у ядрах соматичних клітин людини?
12. Скільки хромосом міститься у ядрах гамет людини?
13. Як називаються ділянки хроматину, у яких знаходиться основна частина активних генів?
14. Як називаються ділянки хроматину, у яких практично відсутні активні гени?
15. Скільки водневих зв'язків утворюється між аденіном і тиміном в молекулі ДНК?
16. Скільки водневих зв'язків утворюється між гуаніном і цитозином в молекулі ДНК?
17. Який нуклеотид є комплементарним до аденіну в молекулі ДНК?
18. Який нуклеотид є комплементарним до аденіну в молекулі РНК?
19. Що таке SNP?
20. Який розмір (в кількості пар нуклеотидів) має геном людини?
21. Як називається основний фермент, що забезпечує процес подвоєння ДНК?
22. Між якими частинами нуклеотида утворюється фосфодієфірний зв'язок?
23. Як називається сукупність послідовностей ДНК, що міститься у гаплоїдному наборі певного організму?
24. Що таке мутації ДНК?
25. Що таке репарація ДНК?

## ТЕМА 2

### МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ТРАНСКРИПЦІЇ У ЕУКАРІОТ

*Питання для обговорення:*

1. Ініціація, елонгація та термінація транскрипції у еукаріот.
2. Типи еукаріотичних РНК-полімераз.
3. Регуляція процесу транскрипції у еукаріот.
4. Приклади захворювань, що асоційовані з порушенням процесу транскрипції.

*Основні терміни та поняття*

**Транскрипція** – процес перенесення генетичної інформації з ДНК на РНК, шляхом синтезу комплементарної молекули РНК із використанням одного з ланцюгів ДНК як матриці.

**РНК (рибонуклеїнова кислота)** – тип нуклеїнової кислоти, мономерами якої є рибонуклеотиди (містять залишок фосфорної кислоти, цукор-рибозу, а також одну з чотирьох азотистих основ – А, Г, С чи У). На відміну від ДНК, РНК є переважно одноланцюговою. Виділяють декілька типів РНК, серед яких – рибосомальна РНК (рРНК), матрична РНК (мРНК), транспортна РНК (тРНК) та різноманітні малі регуляторні молекули РНК.

**Промотор** – специфічна регуляторна послідовність ДНК, з якою зв'язується РНК-полімераза при ініціації транскрипції.

**РНК-полімераза** – фермент, що каталізує синтез молекули РНК на матриці ДНК в процесі транскрипції.

**РНК-полімераза I** – еукаріотична РНК-полімераза, що каталізує транскрипцію більшості генів рРНК.

**РНК-полімераза II** – еукаріотична РНК-полімераза, що каталізує транскрипцію білкових генів.

**РНК-полімераза III** – еукаріотична РНК-полімераза, що каталізує транскрипцію генів тРНК та деяких генів рРНК.

**Енхансер** – регуляторна послідовність ДНК, зв'язування з якою призводить до активації (посилення) транскрипції відповідних генів.

**Сайленсер** – регуляторна послідовність ДНК, зв'язування з якою призводить до пригнічення (інгібування) транскрипції відповідних генів.

**Некодуючий (матричний) ланцюг** – ланцюг ДНК, що служить матрицею при транскрипції, а його послідовність є комплементарною послідовності новосинтезованого ланцюга РНК.

**Кодуючий (змістовний) ланцюг** – ланцюг ДНК, послідовність якого є ідентичною послідовності новосинтезованого ланцюга РНК. Змістовний ланцюг є комплементарним матричному ланцюгу.

**Екзони** – кодуючі (змістовні) ділянки еукаріотичних генів. Нуклеотидна послідовність цих ділянок надалі транлюється в амінокислотну послідовність білків.

**Інтрони** - некодуючі (беззмістовні) ділянки еукаріотичних генів. Нуклеотидна послідовність цих ділянок вирізається в процесі сплайсингу і не транлюється в амінокислотну послідовність білків.

**Ініціація транскрипції** – сукупність подій, пов'язаних з активацією РНК-полімерази та запуску процесу транскрипції відповідного гена.

**Елонгація транскрипції** – етап транскрипції, на якому відбувається власне синтез молекули РНК на матриці ДНК.

**Термінація транскрипції** – сукупність подій, пов'язаних з завершенням синтезу молекули РНК та розбиранням РНК-полімеразного комплексу.

**Транскрипційні фактори** – група ДНК-зв'язувальних білків, що взаємодіють із специфічними послідовностями ДНК (промотори, інші регуляторні елементи) і таким чином забезпечують регуляцію транскрипції різноманітних генів.

*Приклади типових задач:*

1. Загальна довжина еукаріотичного гена становить 290000 пар нуклеотидів. Визначте кількість нуклеотидів кодуючої частини гена, якщо інтрони складають 49%, а регуляторні елементи – 10% від загальної послідовності нуклеотидів.

*Алгоритм розв'язування*

Еукаріотичні гени складаються з трьох компонентів: регуляторні елементи, інтрони (некодуючі ділянки) та екзони (власне, кодуюча частина гена). В даній задачі інтрони та регуляторні елементи становлять сумарно 59% від загальної кількості нуклеотидів гена. Відповідно, екзони (кодуюча частина гена) становить:

$$100\% - 59\% = 41\%.$$

Знаючи частку кодуючої частини гена у % та загальну довжину гена, можемо знайти кількість нуклеотидів кодуючої частини гена:

$$290000 * 41 / 100 = 118\ 900 \text{ нуклеотидів.}$$

*Відповідь:* 118 900 нуклеотидів.

2. Фрагмент молекули мРНК має наступну послідовність:

**5'-UUACGAGACCGAUCAGCAUUA-3'**

Напишіть послідовність матричного ланцюга ДНК, що кодує цю молекулу мРНК.

3. Фрагмент молекули мРНК має наступну послідовність:

**5'-UUACGAGACCGAUCAGCAUUA-3'**

Напишіть послідовність змістовного ланцюга ДНК, що кодує цю молекулу мРНК.

4. Фрагмент кодуючого ланцюга ДНК має наступну послідовність:

**5'-TATGAATGAGTAAACGTG-3'**

Напишіть послідовність РНК, що синтезується на ньому.

5. Фрагмент некодуючого ланцюга ДНК має наступну послідовність:

**5'-TATGAATGAGTAAACGTG-3'**

Напишіть послідовність РНК, що синтезується на ньому.

### *Практична робота 2*

#### **Робота з електронними базами даних NCBI та Uniprot**

*Мета роботи:* Ознайомитися з базами даних амінокислотних та нуклеотидних послідовностей, різноманітними онлайн-інструментами для аналізу цих послідовностей. Проаналізувати один з білків людини (його амінокислотну послідовність, фізико-хімічні характеристики, функції, локалізацію, асоційовані захворювання, нуклеотиду послідовність гена, що його кодує, його розташування, кількість екзонів та інтронів).

#### *Хід роботи:*

1. Відкрити стартову сторінку UniProt – ресурс, що дозволяє шукати та аналізувати амінокислотні послідовності білків, - <http://www.uniprot.org>.  
Здійснити пошук білка (наприклад, insulin – гормон пептидної природи, що регулює концентрацію глюкози в крові; порушення у регуляції експресії даного гену призводять до розвитку певних типів цукрового діабету), обрати одну зі знайдених послідовностей (наприклад, послідовність P01308, INS\_HUMAN), ознайомитись з інформацією щодо обраного білка.
2. Відкрити сторінку BLAST - інструмент, що дозволяє шукати гомологічні даному білку амінокислотні послідовності і вирівнювати їх - <https://www.uniprot.org/blast>.  
Ввести ідентифікатор послідовності (наприклад P01308) або саму послідовність у форматі FASTA, виконати «Run BLAST». Ознайомитись з отриманими результатами.
3. Перейти на стартову сторінку NCBI – один з найпотужніших інтернет-ресурсів, який містить базу нуклеотидних послідовностей (GeneBank), базу статей в галузі біології та медицини (PubMed) та багато іншого - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Відкрити розділ Genes&Expression → Gene, ввести у поле пошуку назву білка чи гена, що його кодує (наприклад, insulin), обрати ген людини і проаналізувати отримані дані.

4. Здійснити всі описані операції із будь-яким білком людини.
5. Зробити загальний звіт: амінокислотна послідовність білка; його фізико-хімічні характеристики; функції; локалізація в межах клітини; асоційовані захворювання; гомологи в інших організмів; нуклеотидна послідовність гена, що його кодує; його розташування, кількість екзонів та інтронів; типи клітин та тканин, в яких даний ген транскрибується.

*Приклади модульно-рейтингових питань:*

1. Яка РНК-полімераза відповідає за синтез білкових генів у еукаріот?
2. Яка РНК-полімераза відповідає за синтез генів тРНК у еукаріот?
3. Яка РНК-полімераза відповідає за синтез більшості генів рРНК у еукаріот?
4. Як називається початковий етап транскрипції?
5. Як називається заключний етап транскрипції?
6. Що синтезується протягом транскрипції?
7. Як називаються кодуючі ділянки еукаріотичних генів?
8. Як називаються некодуючі ділянки еукаріотичних генів?
9. Як називається група білків, що бере участь у регуляції процесу транскрипції?
10. Як називається основний фермент, що каталізує процес транскрипції?
11. Як називається ділянка первинного зв'язування РНК-полімерази з ДНК при ініціації транскрипції?
12. Як називається регуляторна ділянка ДНК, що підсилює ефективність транскрипції, знаходячись на деякій, часто значній, відстані від промотору?
13. Як називається регуляторна ділянка ДНК, що знижує ефективність транскрипції або взагалі інгібує її, знаходячись на деякій, часто значній, відстані від промотору?
14. Як метилювання гістонів в межах гена буде впливати на процес транскрипції?
15. Як ацетилювання гістонів в межах гена буде впливати на процес транскрипції?

16. Як метилювання ДНК в межах гена буде впливати на процес транскрипції?
17. Як деацетилювання гістонів в межах гена буде впливати на процес транскрипції?
18. У транскрипційно активному хроматині гістони ацетильовані чи деацетильовані?
19. Що таке матричний ланцюг ДНК?
20. Що таке кодуючий ланцюг ДНК?
21. Що таке транс-фактор регуляції транскрипції?
22. Що таке цис-елемент регуляції транскрипції?
23. Що таке екзон?
24. Що таке інтрон?

## ТЕМА 3 ПРОЦЕСИНГ МОЛЕКУЛ РНК

*Питання для обговорення:*

1. Етапи процесингу еукаріотичних мРНК: кепування, сплайсинг, поліаденілування.
2. Альтернативний сплайсинг, транссплайсинг.
3. Процесинг тРНК та рРНК.
4. Приклади захворювань, що пов'язані з порушенням процесингу РНК.

*Основні терміни та поняття:*

**Процесинг** – процес дозрівання попередників еукаріотичних РНК з утворенням функціональних молекул. Відбувається одночасно з проходженням транскрипції.

**Кепування** – перший етап процесингу еукаріотичних мРНК, при якому відбувається модифікація 5' – кінця молекули з утворенням так званого «кепу» (хімічна природа модифікації – 7-метилгуанін).

**Сплайсинг** – етап процесингу мРНК, при якому відбувається вирізання інтронів та зшивання екзонів; в результаті мРНК стає копією лише кодуючої частини гена.

**Альтернативний сплайсинг** – процес, при якому з однієї і тієї ж молекули пре-мРНК відбувається утворення декількох різних зрілих мРНК, за рахунок вирізання різної кількості інтронів.

**Транссплайсинг** – об'єднання в складі мРНК екзонів різних генів.

**Рибозими** – молекули РНК, які виступають в якості каталізаторів при перебігу певних біологічних процесів. Наприклад, маленькі ядерні РНК при сплайсингу, рибосомальні РНК при трансляції.

**Сплайсосома** – комплекс, що утворюється на межі інтрона та екзона, який складається з пре-мРНК, маленьких ядерних РНК та допоміжних білків. Забезпечує проходження сплайсингу (маленькі ядерні РНК діють як каталізатори).

**Поліаденілування** – етап процесингу, при якому до 3'-кінця молекули мРНК приєднується «поліА-хвіст» - послідовність з 100-200 аденілових нуклеотидів.

**5'- та 3' – нетрансльовані ділянки** – ділянки в зрілій молекулі мРНК, що розташовані між кодуючою частиною і «кепом» (5' – нетрансльована ділянка) та між кодуючою частиною і «поліА-хвостом» (3' – нетрансльована ділянка). Не транслюються в амінокислотну послідовність при синтезі білка.

*Приклади типових задач:*

1. Фрагмент кодуючого ланцюга ДНК певного білкового гена має наступну послідовність:

**5'-TGCTGGCCCTCTGGGGACCTGACCCGGCCCAAGGCCTTTGTGA  
ACCAGCACCTGTGCGGCTCCACCTGGTGGGAAGCTCTTACC-3'**

Фрагмент зрілої молекули мРНК даного гена має таку послідовність:

**5'-UGCUGGCCCCUCUGUGAACCAGCACCCUGUGCGGCUCCAC-3'**

Визначте, скільки інтронів містить даний фрагмент гена. Напишіть їх послідовності.

*Алгоритм розв'язування*

Кодуючий ланцюг ДНК – це той ланцюг, послідовність якого є ідентичною послідовності новосинтезованого ланцюга РНК (за винятком нуклеотида урацилу, замість якого в молекулі ДНК буде тимін). Також ланцюг ДНК, на відміну від зрілої молекули РНК, містить послідовності інтронів.

В даній задачі наведено дві послідовності: кодуючого ланцюга ДНК (з інтронами) та зрілої молекули РНК.

Порівнюємо дві послідовності (враховуючи, що урацил в молекулі РНК відповідає тиміну в молекулі ДНК). Знаходимо співпадіння та розбіжності:

**Кодуючий ланцюг ДНК:**

**5'-TGCTGGCCCTCTGGGGACCTGACCCGGCCCAGGCCTTTGTGA  
ACCAGCACCTGTGCGGCTCCACCTGGTGGGAAGCTCTCTACC-3'**

**мРНК:**

**5'-UGCUGGCCCUCUGUGAACCAGCACCUUGUGCGGCUCCCAC-3'**

Таким чином, дві ділянки в молекулі ДНК співпадають з послідовністю, а дві – не співпадають. Отже, кількість інтронів в даному фрагменті – 2. Їх послідовності будуть наступні:

**5'-GGGACCTGACCCGGCCCAGGCCTTTG-3',**

**5'- CTGGTGGGAAGCTCTCTACC-3'.**

**Відповідь: 2 інтрони; 5'-GGGACCTGACCCGGCCCAGGCCTTTG-3';  
5'- CTGGTGGGAAGCTCTCTACC-3'.**

2. Фрагмент кодуючого ланцюга ДНК певного білкового гена має наступну послідовність:

**5'-TGCTGGCCCTCTGGGGACCTGACCCGGCCCAGGCCTTTGTGA  
ACCAGCACCTGTGCGGCTCCACCTGGTGGGAAGCTCTCTACC-3'**

Фрагмент зрілої молекули мРНК даного гена має таку послідовність:

**5'-UGCUGGCCCUCUGUGAACCAGCACCUUGUGCGGCUCCCAC-3'**

Визначте, скільки екзонів містить даний фрагмент гена. Напишіть їх послідовності.

3. Фрагмент кодуючого ланцюга ДНК певного білкового гена має наступну послідовність:

**5'-TGCTGGCCCTCTGGGGACCTGACCCGGCCCAGGCCTTTGTGA  
ACCAGCACCTGTGCGGCTCCACCTGGTGGGAAGCTCTCTACC-3'**

В даному фрагменті наявні 2 інтрони:

**5'-GGGACCTGACCCGGCCCAGGCCTTTG-3',**

**5'- CTGGTGGGAAGCTCTCTACC-3'.**

Напишіть послідовність зрілої молекули мРНК.

### Практична робота 3

#### Пошук екзонів та інтронів в межах послідовності еукаріотичного гена

*Мета роботи:* Ознайомитися з онлайн-інструментами для пошуку екзонів та інтронів в межах послідовностей еукаріотичних генів. Проаналізувати послідовність одного з генів людини, встановити кількість екзонів та інтронів у ньому, та їх послідовності.

*Хід роботи:*

1. Відкрити стартову сторінку бази даних NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.  
Відкрити розділ Genes&Expression → Gene, ввести у поле пошуку назву білка людини чи гена, що його кодує (наприклад, tyrosinase – один з ферментів, що задіяний у перетворенні амінокислоти тирозин у меланін; мутації в даному гені призводять до розвитку спадкового захворювання альбінізм), ознайомитися з інформацією щодо даного гену – його локалізація, кількість екзонів.
2. Знайти послідовність гену та його зрілої мРНК форматі FASTA.
3. Відкрити сторінку інструменту BLAST, що дозволяє шукати гомологічні даному білку амінокислотні послідовності і вирівнювати їх - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
4. Внести у відповідні поля послідовності гена та мРНК тирозинази. Провести вирівнювання послідовностей.
5. Проаналізувати, які ділянки послідовності гена є гомологічними ділянкам послідовності мРНК (відповідають ексонам), а які не співпадають (відповідають інтронам).
6. Здійснити всі описані операції із будь-яким геном людини. Зробити звіт стосовно кількості екзонів та інтронів в межах обраного гена та навести їх послідовності.

*Приклади модульно-рейтингових питань:*

1. Що таке процесинг РНК?
2. Перерахуйте етапи процесингу мРНК.
3. Що таке кепування молекули РНК?
4. Що таке сплайсинг молекули РНК?
5. Що таке поліаденілування молекули РНК?

6. Вкажіть функції «кепу».
7. Вкажіть функції полі-А хвоста.
8. Які функції (функцію) виконують рибозими?
9. Якою є хімічна природа «кепу».
10. Які нуклеотиди використовуються в процесі поліаденілування?
11. Що таке альтернативний сплайсинг?
12. Що таке транссплайсинг?
13. Як називається процес вирізання некодуючих ділянок із первинного транскрипту мРНК?
14. Який нуклеотид переноситься на 5'-кінець мРНК при її кепуванні?
15. Яка послідовність нуклеотидів утворюється на 3'-кінці мРНК?
16. Якою є хімічна природа каталізаторів, від яких залежать реакції сплайсингу мРНК?
17. Як називається молекула РНК, що має каталітичні властивості?
18. Де і коли здійснюється процесинг мРНК?
19. Як називається білково-нуклеїновий комплекс, в межах якого здійснюється сплайсинг мРНК?

## ТЕМА 4

### МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ТРАНСЛЯЦІЇ У ЕУКАРІОТ

*Питання для обговорення:*

1. Генетичний код. Властивості генетичного коду.
2. Ініціація, елонгація та термінація трансляції у еукаріот.
3. Посттрансляційні модифікації білків.
4. Регуляція процесу трансляції у еукаріот.
5. Приклади захворювань, що асоційовані з порушенням процесу трансляції.

*Основні терміни та поняття:*

**Трансляція** – процес синтезу молекули білка на матриці мРНК.

**Ініціація трансляції** – процес впізнання стартового кодону (AUG) на мРНК, приєднання туди двох субодиниць рибосоми та завантаження ініціаторної аміноацил-тРНК (метіоніну) до Р-сайту рибосоми.

**Елонгація трансляції** – етап трансляції, на якому відбувається власне синтез молекули білка на матриці мРНК.

**Елонгаційний цикл** – процес впізнання відповідною аміноацил-тРНК чергового кодону на мРНК, приєднання відповідної амінокислоти до пептидильного ланцюга та подальше переміщення рибосоми на один кодон вперед.

**Термінація трансляції** – процес впізнання одного з стоп-кодонів, роз'єднання двох субодиниць рибосоми та завершення процесу трансляції.

**Генетичний код** – відповідність між послідовністю нуклеотидів молекули мРНК та послідовністю амінокислот у поліпептиді.

**Виродженість генетичного коду** – властивість генетичного коду, коли майже всі амінокислоти (за винятком метіоніну та триптофану) кодуються більше ніж одним кодоном.

**Однозначність генетичного коду** – властивість генетичного коду, коли кожний кодон визначає лише одну амінокислоту.

**Універсальність генетичного коду** – властивість генетичного коду, коли у всіх організмів однакові кодони кодують одні і ті ж амінокислоти.

**Кодон** – триплет нуклеотидів молекули мРНК, який кодує одну амінокислоту.

**Антикодон** – триплет нуклеотидів в межах антикодonoвої петлі тРНК, що комплементарний до кодону мРНК, який кодує відповідну амінокислоту.

**Стоп-кодони** – триплети нуклеотидів в молекулі мРНК, які не відповідають жодній амінокислоті, а натомість є сигналами закінчення процесу трансляції (UAG, UGA, UAA).

**Рамка зчитування** – послідовність нуклеотидів від старт-кодону (AUG) до одного із стоп-кодонів.

**Активація амінокислоти** – процес приєднання аденозинмонофосфату до молекули амінокислоти за допомогою ферменту аміноацил-тРНК-синтетази.

**Аміноацил-тРНК** – комплекс молекули тРНК з ковалентно приєднаною до неї відповідною амінокислотою.

**Шапериони** – група білків, що забезпечують створення необхідних умов для швидкого пошуку оптимальної просторової конформації білка.

*Приклади типових задач:*

1. Зі скількох амінокислот буде складатися поліпептид, який утвориться при трансляції даної послідовності мРНК (вказані також 5'- та 3'- нетрансльовані ділянки):

**5'-CUGGCCCGUCUAUGGAACCAGCACCCUGUGCGGCU  
CCCAUGACUGGCCCCUCUGACCAGCACCCUGU-3'**

Користуючись таблицею генетичного коду запишіть послідовність амінокислот в даному поліпептиді.

*Алгоритм розв'язування*

Враховуючи той факт, що в межах наведеної послідовності вказані також 5'- та 3'- нетрансльовані ділянки, спочатку потрібно знайти в ній стартовий кодон AUG, з якого власне розпочинається трансляція послідовностей мРНК:

**5'-CUGGCCCGUCUAUGGAACCAGCACCCUGUGCGGCU  
CCCAUGACUGGCCCCUCUGACCAGCACCCUGU-3'**

Після цього, користуючись таблицею генетичного коду, записуємо послідовність всіх амінокислот, що кодуються відповідними триплетами в даній послідовності мРНК, поки не буде знайдений один з трьох можливих стоп-кодонів – UAA, UAG або UGA:

**AUG - Met**

**GAA - Glu**

**CCA - Pro**

**GCA - Ala**

**CCU - Pro**

**GUG - Val**

**CGG - Arg**

**CUC - Leu**

**CCA - Pro**

**UGA – стоп-кодон**

Отже, послідовність амінокислот в даному поліпептиді буде наступною:

**Met-Glu-Pro-Ala-Pro-Val-Arg-Leu-Pro**

Відповідно, поліпептид складається з 9 амінокислот.

*Відповідь:* 9 амінокислот, **Met-Glu-Pro-Ala-Pro-Val-Arg-Leu-Pro**

2. Фрагмент поліпептидного ланцюга білка інсуліну людини складається із 10 амінокислот, розміщених у наступній послідовності:

**Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser**

- 1) Запишіть можливу будову фрагмента мРНК, що є матрицею для синтезу даного фрагмента молекули інсуліну?
- 2) Запишіть будову фрагмента ДНК, що кодує дану мРНК?
3. Білок складається зі 287 амінокислот. Визначте відносні молекулярні маси білка та гена, який його кодує (середня маса однієї амінокислоти – 110, нуклеотида – 330).
4. До складу білка входить 500 амінокислот. Визначте довжину та молекулярну масу гена, який його кодує (середня молекулярна маса одного нуклеотида - 330, відстань між сусідніми парами нуклеотидів в молекулі ДНК – 0,34 нм).
5. Молекула мРНК має відносну молекулярну масу 68310. Визначте кількість амінокислот та відносну молекулярну масу білка, що синтезується на цій мРНК (середня маса однієї амінокислоти – 110, нуклеотида – 330).
6. Молекулярна маса білка 95 000. Визначте довжину та кількість нуклеотидів у мРНК, що є матрицею для синтезу даного білка.
7. Ділянка мРНК, що є матрицею для синтезу певного білка, має наступну будову:

**5'- UAUGGAACCAGCUACCGCAACCCUGUGC-3'**

- 1) Запишіть послідовність амінокислот даного білка.
- 2) Як зміниться склад білка, якщо під впливом опромінювання між десятим і одинадцятим нуклеотидами в змістовному ланцюгу ДНК, що кодує дану мРНК, вбудується нуклеотид А?
- 3) Як зміниться склад білка, якщо під впливом опромінювання п'ятнадцятий нуклеотид в змістовному ланцюгу ДНК, що кодує дану мРНК, буде замінений на нуклеотид G?
8. Маса певного еукаріотичного білка – 25300, а довжина гена, який його кодує – 3060 нм. Визначте частку нуклеотидів, що припадають на кодуючі та некодуючі послідовності гена (середня молекулярна маса однієї амінокислоти – 110, а відстань між сусідніми парами нуклеотидів в молекулі ДНК – 0,34 нм).

### *Алгоритм розв'язування*

Знаючи масу білка та середню молекулярну масу однієї амінокислоти можемо встановити зі скількох амінокислот складається даний білок:

$$25300/110 = 230 \text{ амінокислот.}$$

Аналогічно можемо встановити загальну кількість пар нуклеотидів гена, що кодує даний білок, знаючи його загальну довжину та відстань між сусідніми парами нуклеотидів в молекулі ДНК:

$$3060/0,34 = 9000 \text{ п.н.}$$

Оскільки одній амінокислоті у послідовності гена відповідає кодон, що складається з трьох нуклеотидів, можемо обрахувати кількість нуклеотидів у гені, що припадає на кодуючі послідовності. Для цього потрібно помножити кількість амінокислот у білку на 3:

$$230*3=690 \text{ нуклеотидів}$$

Таким чином, частка нуклеотидів, що припадають на кодуючі послідовності гена буде наступною:

$$690/900*100\% = 7,7\%$$

Відповідно, частка нуклеотидів, що припадають на некодуючі послідовності гена становить:

$$100\%-7,7\% = 92,3\%.$$

*Відповідь:* кодуючі послідовності гена – 7,7%; некодуючі послідовності гена – 92,3%.

9. Бета-ланцюг білка гемоглобіну складається з 147 амінокислот. Скільки кодуючих нуклеотидів і триплетів входить до складу гена, що кодує даний ланцюг гемоглобіну?

### *Практична робота 4*

#### **Аналіз змін у третинній структурі білка при заміні чи вилученні певної амінокислоти**

*Мета роботи:* Використовуючи онлайн-інструменти та бази даних проаналізувати вплив заміни чи делеції певної амінокислоти в послідовності білка людини на його третинну структуру.

*Хід роботи:*

1. Відкрити стартову сторінку NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Здійснити пошук гена певного білка людини (наприклад, p53 – білок, що відіграє ключову роль в регуляції клітинного циклу та активації апоптозу; порушення в експресії даного гена чи мутації у ньому часто призводять до розвитку різноманітних типів злоякісних пухлин). Знайти послідовність мРНК для даного білка у форматі FASTA.
2. Провести трансляцію знайденої послідовності мРНК у амінокислотну послідовність білка за допомогою онлайн-інструменту <http://insilico.ehu.es/translate/>.
  3. Обрати варіант продукту, що найбільш ймовірно відповідає білку, який аналізується (переважно це буде найбільша за розміром неперервна послідовність, яка отримана в результаті трансляції). Перевірити, чи дійсно це так за допомогою сервісу BLAST - <https://www.uniprot.org/blast> (провести пошук гомологічних послідовностей до знайденої амінокислотної послідовності; у випадку відповідності її білку, який аналізується, ступінь співпадіння (гомології) буде 100%).
  4. Провести пошук відкритих рамок зчитування в межах знайденої послідовності мРНК за допомогою сервісу ORFfinder - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>. Обрати рамку зчитування, що найбільш ймовірно відповідає білку, який аналізується (переважно це буде найбільша за розміром послідовність, яка отримана в результаті пошуку відкритих рамок зчитування). Перевірити, чи дійсно це так за допомогою сервісу BLAST (інтегровано до сервісу ORFfinder). Встановити, яка рамка зчитування (1, 2 чи 3) та який ланцюг ДНК (прямий чи зворотній) відповідає білку, що аналізується; який розмір даної рамки зчитування? Порівняти знайдену амінокислотну послідовність із послідовністю, отриманою у пункті 3 (провести вирівнювання за допомогою сервісу BLAST).
  5. Побудувати тривимірну модель білка на основі знайденої амінокислотної послідовності за допомогою сервісу SWISS-MODEL: <https://swissmodel.expasy.org/interactive>.
  6. Обрати ділянку третинної структури білка (в межах отриманої тривимірної моделі), встановити яка амінокислота знаходиться у даному положенні (наприклад, Val216).
  7. В межах амінокислотної послідовності, отриманої у пункті 3 замінити обрану амінокислоту на інші амінокислоти (Leu, Phe, Arg, Asp, Glu) або взагалі видалити. Використати отримані модифіковані амінокислотні послідовності для побудови

тривимірних моделей білка за допомогою сервісу SWISS-MODEL - <https://swissmodel.expasy.org/interactive>.

8. Порівняти отримані тривимірні моделі білка. Проаналізувати, як амінокислотні заміни чи делеція певної амінокислоти в послідовності білка людини впливають на його третинну структуру.
9. Обрати будь-який інший білок людини та проробити з ним усі вищезазначені дії (проаналізувати мінімум 5 змін в амінокислотній послідовності). Зробити звіт по отриманим результатам.

*Приклади модульно-рейтингових питань:*

1. Як називається процес синтезу білка на матриці РНК?
2. Скільки існує типів тРНК?
3. Синтез пептидного зв'язку здійснюється шляхом переносу амінокислоти на поліпептид, що зростає, чи навпаки?
4. З якої амінокислоти починається синтез білка?
5. Як називається відповідність між послідовністю нуклеотидів у мРНК та послідовністю амінокислот в білку?
6. Що таке однозначність генетичного коду?
7. Яку функцію виконують тРНК?
8. Що таке кодон?
9. Що таке антикодон?
10. Перерахуйте властивості генетичного коду.
11. Яку функцію виконують рРНК?
12. Як називається фермент, що забезпечує приєднання амінокислоти до тРНК?
13. Який триплет відповідає стартовому кодону? Яку амінокислоту він кодує?
14. Скільки існує стоп-кодонів?
15. Які триплети генетичного коду є стоп-кодонами?
16. Скільки існує стартових кодонів?
17. Які триплети генетичного коду є стартовими кодонами?
18. Які є три сайти рибосоми, з якими зв'язується тРНК?
19. Яка молекула РНК переносить амінокислоти до рибосоми?
20. Скільки різних амінокислот входить до складу білків?

## ТЕМА 5

### СУЧАСНІ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ, ЩО ЗАСТОСОВУЮТЬСЯ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ

*Питання для обговорення:*

1. Ампліфікація ДНК.
2. Клонування ДНК.
3. Полімеразна ланцюгова реакція. Типи ПЛР.
4. ДНК-біочіпи.
5. Секвенування ДНК та білків.

*Основні терміни та поняття:*

**Плазміда** – невелика циркулярна молекула ДНК, що існує в прокаріотичній клітині, окремо від бактеріальної хромосоми.

**Вектор** – молекула ДНК, що містить обмежений набір генів, і у яку вбудовують фрагмент ДНК, який цікавить дослідника.

**Рестриктази** – ферменти класу ендонуклеаз, які здійснюють розрізання обох ланцюгів ДНК у специфічних сайтах. Широко використовуються в молекулярно-біологічних дослідженнях.

**Трансформація бактеріальних клітин** – перенесення вектора з вбудованою молекулою ДНК, яка цікавить, до клітини.

**Гель-електрофорез** – метод розділення молекул ДНК, РНК чи білків на основі їх розмірів, що зумовлює різну швидкість руху під дією електричного струму.

**Ампліфікація ДНК** – процес суттєвого збільшення кількості копій (до декількох мільйонів копій) певного фрагменту ДНК за рахунок багаторазової реплікації даного фрагменту.

**Клонування ДНК** – процес створення ідентичних копій певного фрагменту ДНК (переважно гена) в межах чужорідного геному (наприклад, бактеріальної плазміди).

**Полімеразна ланцюгова реакція(ПЛР)** – методика для ампліфікації фрагментів ДНК, що полягає у повторюванні циклів денатурації, відпалу праймера та ДНК-залежного синтезу ДНК.

**Кількісна полімеразна ланцюгова реакція** (також відома, як ПЛР в реальному часі) – методика, що базується на протоколі полімеразної ланцюгової реакції, але дозволяє відслідковувати прогрес ампліфікації міченої молекули ДНК протягом процедури ПЛР.

**ПЛР із зворотною транскрипцією** – модифікація ПЛР, яка дозволяє ампліфікувати фрагмент РНК. В ході даної методики фрагмент молекули РНК спочатку перетворюють у фрагмент одноланцюгової молекули ДНК в процесі реакції зворотної транскрипції, після чого проводять ампліфікацію даної молекули за допомогою стандартного протоколу ПЛР.

**ДНК-біочіпи (мікроарей)** – технологія, що передбачає закріплення невеликих за розміром мічених фрагментів ДНК чи олігонуклеотидів на певному твердому носії (субстраті), з можливістю подальшого використання таких структур для ідентифікації наявності специфічних фрагментів ДНК чи РНК (наприклад, при аналізі експресії генів).

**Секвенування** – група методів, що дозволяють встановити нуклеотидну послідовність нуклеїнових кислот чи амінокислотну послідовність білків.

**Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)** – група послідовностей ДНК в межах прокаріотичних геномів, що походять від ДНК бактеріофагів та використовуються для визначення та знищення подібних послідовностей ДНК при інфекційних захворюваннях.

**CRISPR/Cas технологія** – підхід, що дозволяє редагування послідовностей геномної ДНК, за допомогою використання послідовностей CRISPR та імунологічних білків Cas.

*Приклади типових задач:*

1. Загальна довжина гена певного білка інтересу становить 14900 пар нуклеотидів, з яких інтрони складають 71%, а регуляторні

елементи – 8% від загальної послідовності нуклеотидів. Із скількох амінокислот складається білок, що кодується цим геном?

Було індуковано експресію даного гена та виділено цільовий білок. Далі було проведено електрофоретичне розділення виділених білків (включаючи білок інтересу) за допомогою гелелектрофорезу в поліакриламідному гелі. Було використано маркер молекулярних мас, що включає такі маси: 25, 35, 45, 60, 75, 100, 140 та 180 кДа.

Зобразіть схематично очікувану електрофореграму, де в 1-ій доріжці розставте в правильному порядку компоненти маркера молекулярних мас так, як вони повинні рухатися при електрофорезі, а у 2-ій доріжці – смугу, яка буде відповідати білку інтересу (відносно маркера молекулярних мас).

Для розрахунку молекулярної маси білка на основі кількості амінокислот використовуйте усереднену молекулярну масу однієї амінокислоти, що становить 110 Да.

2. Лінійний фрагмент ДНК розміром 3 тисячі пар нуклеотидів має два сайти рестрикції рестриктази *SmaI* та один сайт рестрикції рестриктази *EcoRV*. *SmaI* розрізає даний фрагмент у сайті між 985 і 986 парою нуклеотидів та у сайті між 2038 та 2039 парою нуклеотидів. *EcoRV* розрізає цей фрагмент у сайті між 1722 і 1723 парою нуклеотидів. Які розміри фрагментів утворяться при розрізанні даної молекули ДНК окремо *SmaI* та *EcoRV*, а також їх сумішшю. Зобразіть схематично рестрикційну карту фрагмента ДНК, на якій покажіть відстані в парах нуклеотидів між сайтами розрізання *SmaI* та *EcoRV*.
3. Після автоматизованого циклу секвенування певного гена за допомогою флуоресцентно мічених дидезоксинуклеотидтрифосфатів, електроферограма відображає послідовні піки наступних кольорів: червоний, червоний, чорний, зелений, зелений, синій, чорний, червоний, зелений, чорний, синій, синій, синій, зелений, чорний, червоний, зелений, зелений, синій, зелений, червоний, чорний, червоний, чорний, синій.  
Якщо програмне забезпечення комп'ютера відображає флюорофори від ddATP зеленим, ddCTP синім, ddGTP чорним, а ddTTP - червоним, то яка буде послідовність нуклеотидів досліджуваного регіону (в напрямку від 5'-кінця

до 3'-кінця) ? Для отриманої послідовності запишіть послідовність комплементарного ланцюга ДНК та послідовність мРНК, яка на ньому синтезується.

4. Було виділено певний невідомий пептид. Для встановлення його послідовності було здійснено наступні кроки та отримані результати:

- (1) Визначено амінокислотний склад за рахунок проведення гідролізу в присутності 6М HCL: **Ala, Arg, Gly, 2 Met, Lys, Ser, Val;**
- (2) Обробка хімотрипсином - **відсутність ефекту;**
- (3) Обробка ціаноген бромідом – отримано три фрагменти, що складаються з наступних амінокислот: **а) Ala, Gly, Lys, Met; б) Met, Val; в) Arg, Ser;**
- (4) Обробка трипсином - отримано три фрагменти, що складаються з наступних амінокислот: **а) Ala, Gly, Lys; б) Arg, 2 Met, Val; в) Ser**
- (5) Обробка дансилхлоридом – отримано дві модифіковані амінокислоти: **Dabsyl-Gly; Dabsyl-Lys**
- (6) Обробка карбоксипептидазою А – відщеплено амінокислоту **Ser** від решти поліпептидного ланцюга.

Враховуючи, що хімотрипсин здійснює розщеплення пептиду по карбоксильній стороні амінокислотних залишків Phe, Tyr, Trp; трипсин - по карбоксильній стороні амінокислотних залишків Lys, Arg; ціаноген бромід - по карбоксильній стороні амінокислотного залишку Met; дансилхлорид модифікує та відщеплює амінокислотні залишки, що мають вільну аміногрупу, а карбоксипептидаза А відщеплює амінокислотний залишок, який знаходиться на С-кінці пептиду, встановіть, запишіть послідовність виділеного пептиду в напрямку від N до С-кінця молекули.

### *Практична робота 5*

#### **Підбір праймерів для полімеразної ланцюгової реакції**

*Мета роботи:* ознайомитись з інструментом Primer-BLAST. Здійснити підбір праймерів за допомогою даного інструменту для проведення полімеразної ланцюгової реакції для ампліфікації одного з генів людини.

### *Хід роботи:*

1. Відкрити стартову сторінку NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Перейти до розділу DNA&RNA → Nucleotide Database, ввести у поле пошуку назву гена (наприклад, BRCA2 – білок, який кодується даним геном задіяний у процесах репарації дволанцюгових розривів молекули ДНК; мутації в цьому гені асоційовані з розвитком спадкових варіантів раку грудей та яєчників), знайти послідовність гена BRCA2 людини, перейти у формат FASTA.

3. Обрати опцію «Pick Primers». Буде здійснено перенаправлення на сторінку програми Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

4. Ознайомитись з опціями програми, з параметрами праймерів та продукту ампліфікації, які можна задавати. У найпростішому випадку, не змінюючи параметрів, просто натиснути "Get primers" внизу сторінки.

5. Дочекатись результатів і проаналізувати їх. Обрати одну пару праймерів. Записати послідовності праймерів, їх параметри і довжину очікуваного продукту ампліфікації.

6. Здійснити всі описані операції із будь-яким геном у геномі людини, оформити відповідний звіт.

### *Приклади модульно-рейтингових питань:*

1. Що таке плазміда?
2. Що таке вектор?
3. Які ви знаєте типи ПЛР?
4. Як називаються ферменти, що здатні розпізнавати певний сайт у ДНК і «розрізати» його?
5. Із якої ділянки плазміди розпочинається її реплікація?
6. Що таке вектор?
7. Як називається введення плазмідного вектора у бактеріальну клітину?
8. Що таке κДНК?
9. Що таке праймери? Для чого вони використовуються?
10. Що таке ампліфікація ДНК?
11. Що таке секвенування?

12. Які ви знаєте методи секвенування?
13. Що таке ДНК-біочіпи?
14. Для чого використовується CRISPR/Cas технологія?
15. Що таке клонування ДНК?

## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія. – К.: Київський університет. – 2008.
2. Weaver R.F. Molecular biology. 2nd ed. – New York: McGraw-Hill Companies. – 2002.
3. Сиволоб А.В., Афанасьєва К.С., Рушковський С.Р. Методичні вказівки до семінарських занять з курсу “Молекулярна біологія”. – К.: Фітосоціоцентр. – 2008.
4. Buckingham L. Molecular diagnostics: fundamentals, methods and clinical applications. / L. Buckingham, M. Flaws. – F.A. Davis Company, Philadelphia, 2007 – 479 p.
5. Lewin B. Genes VIII. – Upper Saddle River, New Jersey: Pearson Prentice Hall. – 2004.
6. Lodish H., Berk A., Zipursky L.S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Molecular cell biology. 4<sup>th</sup> ed. – New York: W.H. Freeman and Company. – 2000.
7. Brown T.A. Genomes. – New York ; London: Garland Science, 2002.
8. Chromatin structure and dynamics: state-of-the-art. New Comprehensive Biochemistry / eds. J. Zlatanova, S.H. Leuba. Amsterdam : Elsevier, 2004. – Vol. 39.
9. Chakalova, L., Fraser, P. Organization of transcription // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2010. – Vol. 2(9). – a000729.
10. The ENCODE Project Consortium // Nature. – 2007. – Vol. 447. – P. 799–816.
11. Chagin, V.O., Stear, J.H., Cardoso, M.C. Organization of DNA Replication // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2010. – Vol. 2. – a000737.
12. Kornberg A., Baker T.A. DNA replication. – New York : W.H. Freeman and Company, 1992.
13. Lesk, A.M. Introduction to bioinformatics. – New York : Oxford University Press, 2002.
14. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. – Cold Spring Harbor, New York : CSHL Press, 2001.

15. Wolfsberg, T.G., Wetterstrand, K.A., Guyer, M.S. et al. A user's guide to the human genome // Nature Genetics Supplement. – 2002.– Vol. 32. – P. 4–79.
16. Miller M. B., Tang Yi-Wei Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology // Clinical microbiology reviews. – 2009. – Vol. 22. – P. 611-63.
17. Pellestor F., Paulasova P. The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics // European Journal of Human Genetics. – 2004. – Vol. 12. – P. 694–700

***Интернет-ресурсы:***

1. NCBI databases <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
2. OMIM <https://www.omim.org/>
3. Uniprot <https://www.uniprot.org/>
4. Protein Data Bank: <https://www.rcsb.org/>
5. Expasy: Swiss Bioinformatics Resource Portal: <https://www.expasy.org/>
6. Encyclopedia of DNA elements <http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>