

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ

Методические указания к практическим занятиям

Новосибирск 2017

УДК 636.082.2 / 573.6
ББК П 45.3
С28

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии

Составитель: Себежко О.И., к.б.н., доц.

Рецензент: Котомина Г.А., канд. биол. наук, доцент кафедры экологии
НГАУ

Биотехнологические методы в селекции: метод. указания к
практическим занятиям / сост. Себежко О.И.; Новосиб. гос. аграр. ун-т.
Биолого-технолог. фак-т. – Новосибирск, 2017. – 130 с.

Методические указания предназначены для студентов Биолого-технологического факультета, обучающихся по направлению подготовки 36.03.02 «Зоотехния» очной и заочной форм обучения.

Изложены основные разделы курса «Биотехнологические методы в селекции», индивидуальные задания по каждой теме. Приведены глоссарий, библиографический список, вопросы для подготовки к практическим занятиям и промежуточному контролю.

Методические указания утверждены и рекомендованы к изданию учебно-методическим советом биолого-технологического факультета (протокол № 2 от 01.03 2017 г.).

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ

Введение.

В настоящее время интенсификация животноводства настоятельно требует дальнейшего развития теоретических основ и совершенствования организационных форм селекции сельскохозяйственных животных за счет привлечения новых методов оценки генотипов животных. К числу таких методов относится использование генетических маркеров и ДНК-технологий. Достоинство этих маркеров состоит в том, что они не изменяются на протяжении жизни животного, наследуются по законам Менделя и сравнительно легко выявляются в лабораторных условиях, а потому могут выполнять роль сигнальных генов при решении ряда задач селекции.

Необходимость изучения этих вопросов продиктовано огромным интересом, проявляемым к данной проблеме во всем мире со стороны генетиков и селекционеров, работающими с сельскохозяйственными животными, и отсутствием в литературе достаточно полных обобщений.

На основе современных положений генетики, селекции необходимо подготовить будущих зоотехников к практической деятельности, требующей углубленную фундаментальную и профессиональную подготовку, к возможной научно-исследовательской работе в области совершенствования и создания высокопродуктивных стад, пород, типов сельскохозяйственных животных на основе генетического анализа и мониторинга основных признаков продуктивности.

Изучения дисциплины сводятся к приобретению навыков использования теоретической генетики для совершенствования племенных и продуктивных качеств сельскохозяйственных животных, определения потенциала продуктивности, контролируемого генотипом, разработки методов генетической оценки популяций и отдельных особей по потомству и тиражирования их в высокопродуктивные стада.

На современном этапе зоотехник должен профессионально решать вопросы разведения сельскохозяйственных животных, управлять производством высококачественной продукции, проводить научные исследования с использованием сложных экспериментов и наблюдений, их анализ и обработку, а также участвовать в составлении планов, программ, практических рекомендаций и их внедрении.

Цели и задачи дисциплины

Общая трудоёмкость дисциплины составляет 4 зачётные единицы (144 ч). Дисциплина относится к вариативной части, дисциплинам по выбору.

Дисциплина **"Биотехнологические методы в селекции"** предназначена для формирования у студента основополагающего уровня понимания прикладного значения биотехнологии в селекции животных, связи биотехнологии с практикой и ее народнохозяйственное значение; понимания проблем маркер-зависимости ген-зависимой селекции, мониторинга эволюционных и селекционных процессов в популяциях при пороодообразовании и породопреобразовании; использования ДНК-технологий в управлении потоком генетического материала и создании желательных генотипов

В соответствии с назначением **основной целью дисциплины** является

расширение и углубление знаний студентов по теоретическим и практическим основам селекции с.-х. животных с использованием инновационных методов биотехнологии, генетической и клеточной инженерии.

Исходя из цели, в процессе изучения дисциплины решаются следующие задачи:

- освоить методы биотехнологии в воспроизводстве животных;
- изучить перспективы генетической инженерии в животноводстве;
- овладеть инновационными методами биотехнологии в селекции животных
- обобщить имеющуюся информацию по генетике полиморфных систем крови у сельскохозяйственных животных в свете современных представлений о природе полиморфизма.
- установить возможность применения цитогенетического контроля в процессе селекции животных по маркерным хромосомам; выявлении числовых и структурных аномалий хромосом в породах, линиях, семействах, изучении связей хромосомных нарушений с воспроизводительной функцией, продуктивностью, жизнеспособностью, болезнями животных.
- обобщить научные изыскания и передовой опыт по применению ДНК-технологий в управлении потоком генетической информации, сохранении биоразнообразия, разработки генетически обоснованных программ разведения и подбора родительских форм животных для получения заданных генотипов.

- показать роль и значение генетических маркеров в решении научных и прикладных задач генетики и селекции животных.

В результате изучения дисциплины студент будет:

- **знать** классические и современные концепции биотехнологии в селекции сельскохозяйственных животных; теоретические и прикладные аспекты маркер-зависимой и ген-зависимой селекции, методы и модели, применяемые в современных ДНК-технологиях в сельскохозяйственном производстве и в животноводстве в частности;
- **уметь** целенаправленно применять инновационные методы в селекционно-племенной работе; целенаправленно применять инновационные методы в селекционно-племенной работе; применять комплекс генетических и биотехнологических методов в управлении наследственностью и изменчивостью для совершенствования и создания новых генотипов;
- **владеть** эффективными методами и практическими приемами воспроизводства и разведения сельскохозяйственных животных; методами генетического анализа, использовать генетические маркеры в целях изучения особенностей генетической организации по ним стад, пород и линий животных; выполнять задания по использованию методов и теоретических положений генетики для решения актуальных задач животноводства.

В процессе освоения дисциплины используются следующие образовательные технологии, способы и методы формирования компетенций: лекция-презентация, активизация творческой деятельности, деловая игра, интерактивные формы обучения (коллективные методы), выполнение индивидуальных заданий.

Контроль знаний, умений и навыков студентов осуществляется в следующих формах. Входящий контроль проводится с целью установления остаточных знаний по базовым дисциплинам в виде тестирования на первом практическом занятии. Текущий контроль осуществляется в виде тестов, опроса по темам, написания и защиты контрольной работы.

Промежуточный контроль проводится с целью установления остаточных знаний по дисциплине – зачет с оценкой.

Содержание тем, вопросы для подготовки к занятиям и варианты индивидуальных заданий по темам

Тема № 1.

Предмет, методы и значение биотехнологических методов в селекции

Содержание темы:

Селекция — наука о выведении новых и совершенствовании существующих сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов с необходимыми человеку свойствами.

Сортом, породой и штаммом называют популяцию организмов (растений, животных и микроорганизмов), искусственно созданную человеком, которая характеризуется определенным генофондом, наследственно закрепленным морфологическими и физиологическими признаками, определенным уровнем и характером продуктивности.

В задачи селекции входит:

1. повышение продуктивности сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов;
2. изучение разнообразия растений, животных и микроорганизмов, являющихся объектами селекционной работы;
3. анализ закономерностей наследственной изменчивости при гибридизации и мутационном процессе;
4. исследование роли среды в развитии признаков и свойств организмов;
5. разработка систем искусственного отбора, способствующих усилению и закреплению полезных для человека признаков у организмов с различными типами размножения;
6. создание устойчивых к заболеваниям и климатическим условиям сортов и пород; — получение сортов, пород и штаммов, пригодных для механизированного промышленного выращивания, разведения и уборки.

Теоретической базой селекции является генетика. Она также использует достижения теории эволюции, молекулярной биологии, биохимии и других биологических наук. Селекция, опираясь на комплекс наук, использует научные открытия для преобразования наследственности растений, животных и микроорганизмов.

Основные методы селекции. К методам селекции традиционно относят

1. отбор,
2. гибридизацию,

3. мутагенез.

Во второй половине XX в. стали применять принципиально новые методы экспериментальной биологии —

4. клеточную и генную инженерию. Это направление легло в основу новой области биологии — биотехнологии.

В основе селекции как науки лежит разработанная Ч. Дарвином концепция искусственного отбора. На ранних этапах социальной эволюции человека искусственный отбор проводился бессознательно. Люди сохраняли потомство от лучших представителей и употребляли в пищу худших без сознательного намерения вывести более совершенную породу или сорт. При методическом отборе человек сознательно систематически отбирает представителей с определенными качествами и стремится к выведению нового сорта или породы.

Различают два вида искусственного отбора:

1. массовый и

2. индивидуальный.

1. При массовом отборе выделяют группу особей с желаемыми признаками. Потомство при таком отборе генетически неоднородно и поэтому дает расщепление признаков при размножении. В связи с этим отбор проводят в ряде поколений.

2. При индивидуальном отборе выделяют единичные особи с ценными качествами и отдельно выращивают их потомство.

При последующем самоопылении у растений или близкородственных скрещиваниях у животных выводят чистые линии.

Чистая линия — группа генетически однородных (гомозиготных) организмов, представляющих ценный исходный материал для селекции.

Отбор тем эффективнее, чем разнообразнее в наследственном отношении исходный материал. Одним из путей увеличения разнообразия материала для селекции является гибридизация. Она бывает двух видов:

1. близкородственная, позволяющая перевести рецессивные гены в гомозиготное состояние; 2. неродственная, помогающая объединить в одном организме гены, ответственные за ценные признаки разных особей.

При близкородственной гибридизации — инбридинге (англ. inbreeding, от in — в, внутри и breeding — разведение) — повышается степень гомозиготности организмов. Многократный инбридинг может привести к резкому ослаблению или вырождению потомков.

2.Неродственная гибридизация может быть

2.1.внутривидовой — скрещивание особей разных сортов или пород одного вида и

2.2.отдаленной — скрещивание особей разных видов и родов.

2.1.При гибридизации особей разных линий — аутбридинге (англ. out — вне и breeding — разведение) — удается получить гетерозиготные гибриды, превосходящие по своим качествам родительские формы. В этом случае проявляется эффект гетерозиса (греч. heteroiosis — изменение, превращение) — гибридной силы, основной причиной которого является отсутствие проявления вредных рецессивных аллелей в гетерозиготном состоянии. Эффект гетерозиса широко применяют для получения высокоурожайных гибридов кукурузы, огурцов, сахарной свеклы и других культурных растений. В птицеводстве межлинейная гибридизация мясных пород кур дает возможность получить гетерозисных цыплят — бройлеров. Уже со второго поколения эффект гетерозиса угасает.

2.2.При отдаленной гибридизации, из-за генетических, морфологических, физиологических и иных различий организмов, применяют специальные методы преодоления нескрещиваемости. Межвидовые (межродовые) гибриды часто оказываются бесплодными вследствие нарушения процессов гаметогенеза. В то же время отдаленная гибридизация может привести к возникновению форм, представляющих хозяйственную ценность из-за ярко выраженного гетерозиса. Так, например, при скрещивании лошади с ослом получается выносливый, сильный и долгоживущий гибрид — мул. Интересно, что у лошака — гибрида ослицы и жеребца — эффект гетерозиса практически отсутствует.

Отличаются большой силой и выносливостью нары — гибриды одногорбого и двугорбого верблюдов. Ценны бестеры — гибриды белуги и стерляди.

В естественных условиях частота мутирования генов сравнительно невелика. Повышения количества мутаций можно достичь, действуя на организм различными мутагенами (радиация, ультрафиолетовые лучи, некоторые химические вещества). Мутации не носят направленного характера, но они поставляют материал, из которого селекционер отбирает организмы с интересующими его признаками.

Традиционные, описанные выше методы селекции имеют естественные ограничения в области изменения генотипа организма.

Бурное развитие новых методов исследований в генетике, расширение и углубление наших представлений о структуре и законах организации наследственного аппарата клетки обусловили создание и разработку принципиально новых методов. Раньше генетическое разнообразие форм растений и животных – исходного материала для селекции – экспериментально создавалось в селекции методами гибридизации, полиплоидии, мутагенеза и др. Теперь можно достигать еще большего разнообразия благодаря манипулированию отдельными клетками живого организма, отдельными хромосомами и отдельными генами. Родились новые понятия и направления современной генетики: клеточная, хромосомная инженерия и генная инженерия. При этом принципиальное отличие данных методов от традиционно используемых в селекции, например мутагенеза, состоит в целенаправленном, а не случайном расширении границ изменчивости генотипа, в планируемом разнообразии исходного материала для селекции.

Вопросы для самоконтроля:

1. Как называется область научных знаний о применении биологических систем и биологических процессов для получения разнообразных продуктов?
2. В задачи какой науки входит генетическая трансформация живых организмов?
3. Назовите метод получения генетически одинаковых клеток, организмов?
4. Как называется метод, позволяющий объединять зародышевые клетки разных организмов?
5. Назовите направление науки, которая занимается созданием неприродных форм белков на основе видоизмененных генов?
6. Назовите, кто придумал термин «биотехнология»?
7. Как называется совокупность методов по реконструкции зародышевых клеток растений и животных?
8. Как называются биологически активные вещества, катализирующие химические реакции в живых организмах?
9. Какое вещество является носителем наследственной информации?

10. Какое явление открыл Ф. Гриффитс в 1928 г. у пневмококков?
11. Как называется процесс реализации генетической информации гена в виде белковых продуктов?
12. Какие методы оценки генотипов животных Вы можете назвать?
13. Какие методы селекции относятся к традиционным?

Варианты индивидуальных заданий

Вариант 1.

Задание 1.

Селекция. Задачи селекции. Основные методы селекции. Традиционная, MAS-селекция, геномая селекция.

Задание 2.

Имеется последовательность из 39 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК сле

дующего состава:

5'-ЦЦТТАГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦАТГ-3'

3'-ГГААТЦЦГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТАЦ-5'

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

Вариант 2.

Задание 1.

Научные предпосылки использования методов биотехнологии в селекции животных. Современные возможности биотехнологии в области селекции.

Задание 2.

Рестрикционный фермент HindIII разрезает ДНК по последовательности ААГЦТТ. Насколько часто этот фермент будет разрезать двухцепочечную ДНК? (Иными словами, какова средняя длина фрагментов разрезанной ДНК?).

Вариант 3.

Задание 1.

Инновационные биотехнологические системы в животноводстве.. Маркирование количественных признаков. ДНК-паспортизация животных.

Задание 2.

Гаплоидный геном содержит около 3×10^9 нуклеотидных пар (н.п.) ДНК. Если вы порежете ДНК рестрикционным ферментом EcoRI, узнающим гексамерную последовательность ГААТТЦ, то сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

Вариант 4.

Задание 1.

Биотехнологические диагностикумы в сельском хозяйстве и ветеринарии
Тестирование животных на генетическую устойчивость и предрасположенность к болезням.

Задание 2.

Ниже приведены последовательности двух фрагментов ДНК, выделенных из организмов разных видов.

1) 5'-АГЦАТАЦТГТГААТТЦАЦА-3' 2) 5'-АТГААТТЦТТАГЦАТАЦ-3'
3'-ТЦГТАТГАЦАЦТТААГТГТ-5' 3'-ТАЦТТААГААТЦГТАТГ-5'

С помощью каких ферментов можно получить гибридную молекулу ДНК из этих фрагментов? Опишите последовательные этапы получения гибридной молекулы..

Тема № 2. Генная и клеточная инженерия

Содержание темы:

В настоящее время в результате успехов фундаментальных наук возникла возможность развития принципиально новых эффективных методов влияния на организм животных, на наследственность.

Биотехнология — это промышленное использование биологических процессов и систем на основе получения высокоэффективных форм микроорганизмов, культур клеток и тканей растений и животных с заданными свойствами. Главные разделы биотехнологии — генная и клеточная инженерия

Методы клеточной и генной инженерии открывают возможности создания организмов с новыми, в том числе и не встречающимися в природе, комбинациями наследственных признаков.

Генная инженерия — это целенаправленный перенос нужных генов от одного вида живых организмов в другой, часто очень далеких по своему происхождению. Позволяет человеку целенаправленно улучшать наследственные качества организмов, получать в неограниченном количестве ценные биологически активные вещества.

Методы генной инженерии наиболее детально разработаны на микроорганизмах. Можно направленно изменять их генотип. В отличие от спонтанных мутаций эти изменения можно заранее планировать. Так, в микроорганизмы совершенно определенно встраивают гены, ответственные за синтез интер-ферона, соматотропина, некоторых незаменимых аминокислот. Возможности дальнейшего развития этого направления огромны. Для того чтобы искусственным путем наделить какой-либо организм новыми наследственными свойствами, нужно ввести в него новый ген или несколько генов от другого организма. Причем нужно, чтобы эти гены в чужом организме начали "работать" — производить белки. Осуществляется эта процедура с помощью двух операций "разрезания" и "сшивания". Роль портняжных инструментов играют **ферменты рестриктазы и лигазы**.

Рестриктазы (своеобразные молекулярные ножницы), действуя на двухцепочечную ДНК, "узнают" в ней определенную последовательность нуклеотидов. Причем, каждая рестриктаза узнает только свою последовательность ДНК, прикрепляется к ней и разрезает ее в месте прикрепления. Рестриктазам безразлично, чью ДНК разрезать — человека или растения, бактерии или вируса, лишь бы в ней были

распознаваемые участки. Это значит, что две совершенно несхожих между собой последовательности ДНК (допустим из клеток слона и лягушки) при обработке одной и той же рестриктазой легко можно сшить (склеить) друг с другом. Обычно рестриктазы распознают в молекулах ДНК очень короткие, но строго специфичные для каждого фермента участки длиной в 4 – 6 пар нуклеотидов и разрезают обе цепи ДНК посередине этих участков или с некоторым смещением. В первом случае образуются обрывки с **ровными (тупыми) концами**, а во втором – стороны разрезаемых цепочек ДНК заходят одна за другую. Такие одноцепочечные концы называются "липкими", поскольку они могут как бы слипаться между собой в силу комплементарности.

Ярким примером рестриктазы второго типа является **EcoRI**, которая узнает фрагмент ДНК из шести нуклеотидов ГААТTC, и режет эту последовательность ДНК ассиметрично, «ступенькой» между нуклеотидами Г и А. В результате место разреза в одной цепи смещено по отношению к другой на 4 пары оснований. При таком разрезе образуется два выступающих конца. Эти концы притягиваются друг к другу, желая восстановить свои старые связи и скрепиться, как им и положено, водородными мостиками. Если с той же EcoRI получить фрагменты ДНК из различных организмов, то все они будут иметь одинаковые, подходящие друг к другу **“липкие концы”**. Скрепить выступающие липкие концы двух молекул ДНК помогает другой фермент - **ДНК-лигаза**. Он лигирует, то есть “сшивает” между собой сахарофосфатные остовы двух фрагментов с образованием полной структуры двойной спирали ДНК.

Для доставки чужеродных генов в различные организмы учёные стали применять специальные устройства, так называемые векторы.

Вектор – это молекула ДНК, способная **самостоятельно реплицироваться** в клетках различных организмов и **обеспечивать размножение (клонирование)** и работу (**экспрессию**) встроенного в неё искусственно какого-либо гена. В английской литературе вектор часто обозначается словом vehicle – повозка.

Идеальными векторными молекулами, созданными самой природой, оказались **плазмиды**, представляющие собой небольшие **кольцевые молекулы ДНК**, самостоятельно живущие в цитоплазме бактерий. Плазмиды способны к автономной репликации, обладают **генами устойчивости** к различным антибиотикам, что позволяет легко обнаружить их присутствие в клетках, плазмиды могут внедряться в

хромосому клетки хозяина, а также имеют участки ДНК (**сайты рестрикции**) для действия ряда рестриктаз. Это означает, что каждая такая рестриктаза может разрезать кольцо плазмидной ДНК и переводить её в линейное состояние. После чего линейную плазмиду можно легко соединить с фрагментом ДНК другого вида с подходящими липкими концами.

На следующем этапе развития генной инженерии учёные начали включать в векторы все гены различных организмов. Иными словами, они начали создавать **генные банки** или **генные библиотеки**.

Генные инженеры, **раздробив** с помощью **определённой рестриктазы** (**техника «дробовика»**) **суммарную ДНК конкретного организма** на фрагменты, добавляют к ним вектор, обработанный той же рестриктазой, и всю эту смесь используют для **трансформации бактерий**. Обычно в каждую рекомбинантную клетку имеет шанс попасть одна молекула ДНК, представляющая собой гибрид вектора и какого-нибудь одного из многих фрагментов присутствовавших в смеси. Клетка, получившая гибридную ДНК, размножившись, образует клон. **Набор клонов** бактерий, содержащих различные рекомбинантные молекулы, включившие все возможные фрагменты ДНК определённого организма и составляют **геномную библиотеку (банк генов)**. Техника «дробовика» позволила получить **набор клонов бактерий** или **гибридных фагов**, различающихся по включённым фрагментам ДНК. Уже в 1974 г. Д. Хогнесс с сотрудниками создали **геномную библиотеку дрозофилы** в клетках *E. coli*. Через два года американцы Л. Кларк и Д. Карбон стали владельцами **библиотеки всех генов** самой бактерии *E. coli*. Вслед за этим были получены **геномные библиотеки** ряда других **организмов**, включая **человека**.

Однако существующие методы введения в геном животных инородного генетического материала еще недостаточно совершенны и степень вероятности встраивания чужеродных генов и их экспрессии невелика и исчисляется несколькими процентами и менее. Поэтому необходимо наличие большого числа яйцеклеток для успеха генно-инженерных манипуляций. Установлено, что оптимальной фазой введения инородного генетического материала является стадия зиготы до слияния пронуклеусов. Именно при введении генов в пронуклеус обеспечивается наибольшая вероятность успеха. Следовательно, необходимо иметь большое число яйцеклеток, и уметь их оплодотворять, чтобы уже на фазе зиготы подвергнуть генно-

инженерным манипуляциям. В принципе зиготы можно получать от предварительно стимулированных и оплодотворенных животных оперативным путем. Но это очень сложный и трудоемкий способ, связанный с операциями на животных. Поэтому особое значение для развития генно-инженерных работ в животноводстве приобретает отработка методов извлечения из яичников, культивирования, оплодотворения созревших овоцитов *in vitro* и последующего их раннего развития и трансплантации. Сочетание этих двух методов создает оптимальные условия для широкого внедрения генной инженерии в практику селекционно-племенной работы в животноводстве. По всей вероятности, в ближайшей перспективе методами генной инженерии будут созданы новые формы сельскохозяйственных животных.

Клеточная инженерия основана на культивировании отдельных клеток или тканей на искусственных питательных средах. Такие клеточные культуры используются для синтеза ценных веществ, производства незараженного посадочного материала, получения клеточных гибридов.

В растениеводстве в селекции эти методы уже получили значительное развитие. Культивирование клеток растений *in vitro* обеспечивает возможность применять системы интенсивного отбора клеток, культивированных в строго контролируемых селективных условиях.

Присущие растительным клеткам свойства тотипотентности (свойство отдельных клеток развиваться в целостный организм) дают возможность плюс-варианты регенерировать в целые растения и использовать в процессе селекционной работы.

Методы клеточной инженерии перспективны и в животноводстве. Уже накоплен большой опыт культивирования соматических клеток животных *in vitro*, разработаны оптимальные среды и режимы культивирования, отработаны способы длительного хранения клеток при низких температурах. Как уже было сказано, активные исследования проводятся и по культивированию генеративных клеток. Разработка этих методов создает прочную основу для развертывания теоретических и прикладных работ по клеточной инженерии сельскохозяйственных животных, которые будут иметь все возрастающее народнохозяйственное значение.

Метод *гибридизации клеток* приобретает все большее значение в селекции. Оказалось, что если взять клетки разных органов и тканей или

клетки разных организмов, объединить их, образуется новая, гибридная клетка. Свойства этой гибридной клетки существенно отличаются от свойств родительских клеток. Таким путем можно получать клетки, выделяющие необходимые человеку лекарства.

Химерные организмы и методы получения генетических мозаиков.

В настоящее время одним из перспективных направлений биотехнологии животных является искусственное получение химер, или генетических мозаиков. Сущность этого метода, основанного на достижениях клеточной инженерии и микроманипуляциях на ранних эмбрионах, заключается в искусственном объединении эмбриональных клеток двух и более животных, относящихся не только к одной породе, но и к разным породам и даже видам. Полученные животные-химеры несут признаки разных генотипов. Современная микрохирургия позволяет получать химер, имеющих 4-х и более родителей.

Существует два метода получения химерных животных – агрегационный и инъекционный. Агрегационный метод заключается в объединении клеток генетически разнородных зародышей на ранних стадиях их развития, а инъекционный – в микроинъекции клеток в бластоцисту эмбриона-реципиента.

Первыми созданными и идентифицированными химерами были мыши между двумя линиями, которые различались по окраске (чёрные и белые). Их химерное потомство оказалось крапчатым. Это связано с тем, что организм мышей – химер включал генетически разные популяции клеток, то есть представлял генетических мозаик.

В последние годы большое внимание уделяется получению межпородных и межвидовых химер млекопитающих. Это особенно важно в селекции сельскохозяйственных животных, так как межвидовые и межпородные химеры могут сочетать в одном организме разные хозяйственно-полезные признаки.

Учёными были получены химеры между двумя близкими видами мышей, которые обычно не скрещиваются – М. мускулос и М. кароли. У межвидовых химер, которые развивались в организме М. кароли не выявили иммуногенетической несовместимости клеток, их развитие происходило нормально. Если же межвидовые химеры получали реципрокной инъекцией, и развитие происходило в организме М. мускулос, то химеры погибали в течение 16 суток после пересадки. Таким образом, не всегда удаётся получить химерных животных разных видов.

Успехи, достигнутые в разработке методом создания химерных лабораторных млекопитающих, позволили практически подойти к созданию химерных сельскохозяйственных животных. В начале 80-х годов была предпринята попытка получить химерных телят от коров европейского и индийского типов. В результате был получен химерный теленок. Фенотипически он отличался от сверстников, но при эритроцитарном типировании у него обнаружены были антигены, типичные для европейского скота.

Для получения межвидовых химер между овцой и козой применяли агрегационный и инъекционный методы и реципрокные пересадки. В результате опытов было получено 8 химерных животных. Шерсть у них представляла собой смесь волос исходных видов, рога по строению были, как у козы, но закручены, как у барана, а экстерьер соответствовал одному из родительских видов. Таким образом, у химер наблюдали мозаичность только волосяного покрова. Интересным представляется факт рождения ягнёнка от козы и козлёнка от овцы. Эти животные развивались из инъецированных химер.

Следует отметить, что химерные животные не передают потомкам характерную для них генетическую мозаичность. Подобно гетерозиготным или гибридным животным, у их потомков происходит расщепление, в результате чего нарушаются ценные генетические комбинации. Хотя химерные животные поддерживают хозяйственно-полезные признаки лишь на протяжении одного поколения, для разведения крупного рогатого скота они могут представлять большой практический интерес. Например, можно создавать химерных животных, сочетающих такие признаки, как молочная и мясная продуктивность, которые являются антогонистами и несовместимыми в одном организме. Создание инъекционных химер путём введения в эмбрион определённой линии клеток позволит улучшить иммунную систему и повысит резистентность к ряду болезней.

Вопросы для самоконтроля:

1. Как называется участок ДНК, содержащий информацию о строении белка?
2. Из каких мономеров состоит полимерная молекула ДНК?
3. Как называется ДНК, состоящая из фрагментов, полученных от разных организмов?

4. Какое вещество является углеводной основой нуклеотида?
5. Каким элементом молекулы нуклеотида определяется его специфическое название?
6. Сколько типов нуклеотидов, входят в состав нуклеиновых кислот.
7. Как называются концы цепи ДНК?
8. Какой нуклеотид комплементарен аденину в ДНК, в РНК?
9. Как называется разрушение вторичной структуры ДНК?
10. Назовите процесс восстановления вторичной структуры ДНК?
11. Какие ферменты способны расщеплять молекулу ДНК на фрагменты?
12. Как называются концы фрагментов ДНК, полученные при симметричном расщеплении сайта рестрикции.
13. В каком направлении идет присоединение нуклеотидов в молекуле ДНК?
14. Сколькими водородными связями соединены цитозин и гуанин?
15. Сколько атомов углерода входит в состав дезоксирибозы?
16. Как называется химическая связь, соединяющая нуклеотиды в одноцепочечную молекулу ДНК?
17. Назовите пиримидиновые основания?
18. С помощью какой химической связи образуется вторичная структура ДНК?
19. Как называется взаимное расположение цепей в молекуле ДНК?
20. Назовите пуриновые основания?
21. Сколько гидроксильных групп входит в состав рибозы?
22. Что присоединено к пятому атому углерода дезоксирибозы?
23. Что присоединено к третьему атому дезоксирибозы?
24. Как называются ферменты, отщепляющие концевые нуклеотиды?
25. Сколько классов рестриктаз существует?
26. Рестриктазы какого класса расщепляют ДНК в сайте узнавания?
27. Название чего зашифровано в обозначении рестриктаз?
28. Как называется домен ДНК-полимеразы с 5'-3' полимеразной активностью?
29. Из скольких частей состоит молекула ДНК-полимеразы?
30. Какой фермент способствует удвоению молекулы ДНК?

- 31.Каким методом можно разделить смесь фрагментов ДНК по их длине?
- 32.Как называются участки ДНК, не несущие информацию о строении белка?
- 33.Как называются участки гена в которых зашифрована информация о строении белка?
- 34.Как называется участок гена, служащий для связывания РНК-полимеразы?
- 35.Как называется участок ДНК, узнаваемый рестриктазой?
- 36.Как называются концы фрагментов ДНК, полученные при несимметричном расщеплении сайта рестрикции?
- 37.Как называется последовательность нуклеотидов, читаемая одинаково по обеим цепям ДНК?
- 38.Как называется олигонуклеотид, комплементарный 3'-концу ДНК-матрицы и служащий началом для синтеза комплементарной цепи ДНК?
- 39.С помощью какого фермента можно превратить РНК в ДНК?
- 40.Как называется короткий фрагмент ДНК, содержащий сайт узнавания какой-либо рестриктазы?
- 41.Как называется ДНК, синтезированная на РНК-матрице?
- 42.Какой фермент присоединяет отдельные нуклеотиды к 3'-концу молекулы ДНК?
- 43.С помощью какого фермента возможно соединение фрагментов в единую молекулу?

Варианты индивидуальных заданий

Вариант 1.

Задание 1.

Ферменты, используемые в генной инженерии, их основные свойства и применение.

Задание 2.

Исследователи получили трансгенные растения табака, в которые, используя в качестве вектора специализированную Ti-плазмиду, был введен нужный ген вместе с подсоединенным к нему канамицину-устойчивым геном предварительно встроенные во фрагмент Т-ДНК плазмиды. Наследование вставленного нужного гена тестировалось у потомков по устойчивости к канамицину Для проверки было взято два трансгенных растения. Было проведено возвратное

скрещивание трансгенного растения No1 с табаком дикого типа, при этом 50% потомков оказались канамицин устойчивыми, а 50% – чувствительными. Когда возвратное скрещивание при помощи линии табака дикого типа было проведено с трансгенным растением No2, то 75% потомков были канамицин устойчивы, и только 25% – чувствительными. Какова разница между трансгенными растениями № 1 и № 2?

Вариант 2.

Задание 1.

Векторы, используемые в генетической инженерии, их основные характеристики.

Задание 2.

С помощью Ti-плазмиды, содержащей ген устойчивости к канамицину, исследователи провели трансформацию растения *Arabidopsis thaliana*. Были выделены два клона (А и Б), устойчивые к канамицину. После самоопыления растений получили следующие результаты:

Растение А → 3/4 потомков устойчивы к канамицину,

1/4 потомков чувствительны к канамицину;

Растение Б → 15/16 потомков устойчивы к канамицину,

1/16 потомков чувствительны к канамицину.

Схематически изобразить соответствующие хромосомы у растения А и растения Б и объяснить полученное соотношение фенотипов в F1 у потомства растений А и Б после самоопыления.

Вариант 3.

Задание 1.

Введение ДНК в клетки животных, растений, бактерий, дрожжей. Конструирование линий клеток, суперпродуцирующих биологически активные вещества.

Задание 2.

В плазмиде pUC18 имеется полилинкерный участок, который содержит сайты рестрикции для 10 различных рестриктаз. Можно ли встроить в эту плазмиду приведённые ниже фрагменты двухцепочечной ДНК?

5'-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3'

3'-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5'

5'-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3'

3'-ГГААТТЦГААТЦГАТТЦГТТАТЦТТЦГАААГТТАЦ-5'

Вариант 4.

Задание 1.

Генно-инженерные системы для получения биологически активных веществ.

Задание 2.

Имеется фрагмент двухцепочечной ДНК следующего состава:

5'-ТАГГАТЦЦАТТАААТАГТГГАТЦЦГТ-3'
3'-АТЦЦТАГГТААТТТАТЦАЦЦТАГГЦА-5'

Можно ли встроить данный фрагмент в плазмиду pBR322? Как подтвердить, что фрагмент чужеродной ДНК встроен в плазмиду pBR322?

Тема № 3

Перспективы и возможности генной инженерии в животноводстве

Содержание темы:

Главный биологический фактор интенсификации животноводства — генетическое совершенствование животных, основных орудий производства в этой отрасли; повышение их генетического потенциала. Широкое использование крупномасштабной селекции прежде всего в молочном скотоводстве, а затем и в других подотраслях животноводства позволило резко ускорить темпы генетического совершенствования разводимых в стране пород сельскохозяйственных животных. Возможности этой системы далеко не использованы, и она будет все шире внедряться в практику племенного дела

Вместе с тем у этой системы, основанной на методах генетики популяций, имеются и ограничения. Так, поиск быка-улучшателя основан на оценке по потомству большого числа производителей. А это связано с большими затратами, поскольку быки-улучшатели — явление редкое, а выдающиеся — чрезвычайно редкое. Кроме того, ряд селекционных программ, направленных на выведение животных, невосприимчивых к некоторым заболеваниям (лейкоз, мастит), пока не дают существенных сдвигов. Поэтому селекционеры сельскохозяйственных животных все чаще обращают внимание на клеточную и генную инженерию. Один из методов клеточной инженерии — трансплантация ранних эмбрионов, получение идентичных близнецов, химерных животных — уже широко внедряется в практику селекции сельскохозяйственных животных и ускоряет генетическое улучшение пород.

С 50-х годов до настоящего времени разработаны методы генетического манипулирования, которые сложились в четкую систему генной инженерии животных.

Современные подходы направлены на создание трансгенных животных, характеризующихся измененными или принципиально новыми свойствами, расширяющими ассортимент и спектр производимой продукции животноводства в соответствии с потребностями современного рынка. Первое трансгенное животное (мышь) получено с помощью микроинъекции рекомбинантной ДНК в зиготу Дж. Гордоном с соавт. в 1980 г., а первые сельскохозяйственные трансгенные животные были получены в 1985 г. Г. Бремом. Термин предложен Дж. Гордоном и Ф. Раддлом в 1981 г.

В настоящее время в мире получили развитие следующие направления использования трансгенных в животноводстве

- создание животных – продуцентов биологически активных рекомбинантных белков для медицины, ветеринарии и пищевой промышленности;
- создание животных – моделей заболеваний человека и животных;
- получение трансгенных животных – доноров внутренних органов для трансплантации;
- создание трансгенных животных с измененным качеством животноводческой продукции.

Приоритетность развития данных направлений трансгенеза в животноводстве обусловлена потребностями современного рынка, так как они направлены на удовлетворение растущих потребностей рынка за счет разработки эффективных и конкурентоспособных технологий получения рекомбинантных белков фармакологического, ветеринарного и пищевого назначения;

- обеспечивают создание принципиально новых видов продукции для различных областей медицины (трансплантационной медицины, фармакологии и т.п.).
- способны обеспечивать повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и качества производимой продукции животноводства, обеспечивая тем самым продовольственную безопасность страны и повышая качество жизни населения.

Широким фронтом ведутся исследования и разработки по выделению и клонированию определенных генов, их внедрению в геном. Если генная инженерия в микробиологии стала реальностью и приобретает все большее практическое значение, то у животных применение этих методов только начинается, однако установлено, что в принципе можно выделить определенные гены из генома животных и встроить их в геном другой особи. Ген соматотропина (гормона роста) крысы встроен в геном мыши. В результате у некоторых трансгенных животных увеличились скорость роста реципиента и конечная живая масса. Можно себе представить, какое огромное практическое значение будет иметь использование этого приема на сельскохозяйственных животных. Представляется возможным по заранее намеченному плану реконструировать геном домашних животных, придать ему заранее заданные свойства. Для достижения таких результатов традиционными методами потребовалась бы работа в течение многих поколений.

Возникает перспективная задача — использовать домашних животных как живые реакторы, ферментеры для производства ценнейших биологически активных веществ. Например, встроив ген интерферона с необходимыми регуляторными элементами в геном коровы, можно рассчитывать, что этот гормон будет экс-прессироваться и в молочной железе. А поскольку активность молочной железы высокая, то можно получать данное вещество с молоком в значительных количествах и, вероятно, при высокой экономической эффективности. Это же в принципе относится и к другим биологически активным веществам. В данном случае молочный скот — оптимальный объект для создания таких живых реакторов. Ни одно другое сельскохозяйственное животное не имеет такого интенсивного синтеза самых разнообразных продуктов и выведения их из организма.

Рыночный сегмент генетически модифицированных животных представлен сегодня только продукцией, получаемой от трансгенных животных — продуцентов биологически активных рекомбинантных белков терапевтического и диагностического назначения: разрешение в 2006 году Европейским Агентством по оценке лекарственных препаратов (ЕМЕА) к использованию антитромбина III человека, производимого с молоком трансгенных животных, открыло новую эру в производстве рекомбинантных белков лекарственного назначения. Сегодня этот продукт остается единственным продуктом, получаемым от трансгенных животных, разрешенных к использованию на человеке.

Развитие данного сегмента рынка обусловлено потребностью в производственных системах, которые способны эффективно производить рекомбинантные белки и/или антитела, мировая потребность в которых составляет 100 кг в год и более (данные FDA).

Основным рыночным фактором роста данного сегмента является то, что трансгенные животные — биореакторы способны обеспечить 10-1000 кратный уровень синтеза рекомбинантных белков с молоком или с белком куриных яиц по сравнению с традиционными культурными клеточными системами, а так же существенно меньшие производственные затраты.

Так, по данным одного из лидеров рынка компании GTC стоимость моноклональных антител, производимых с молоком трансгенных коз, оценивается в 105 долларов США за грамм против 300 - 3000 долларов США за грамм при использовании традиционных культуральных клеточных систем. По данным института животноводства Нойштат

(Германия) мировой рынок фармакологических белков, производимых трансгенными животными, к 2017 г составит 18,6 миллиардов долларов.

Однако можно отметить усилия американских ученых, работающих с геномом лосося. В рацион человека включен лосось AquAdvantage. AquAdvantage получается из обычного атлантического лосося путем внедрения гена гормона роста от тихоокеанского лосося Чинук. Последний известен в России как чавыча — крупнейший вид тихоокеанской «красной рыбы», которую называют еще «королевский лосось». Особи AquAdvantage стерильны — они не могут воспроизводиться на воле или скрещиваться с океанской популяцией.

FDA (управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США) не нашло отличий в питательных и биологических свойствах ГМО-лосося по сравнению с обычным.

Фрагмент ДНК, внедряемый рыбе для ускорения роста, не наносит ей вреда, зато AquAdvantage набирает товарный вес втрое быстрее природного лосося. В итоге, рыба начала расти не только весной и осенью, как раньше, а круглый год. И вместе обычных трех лет достигала размеров, необходимых для продажи, за 16-18 месяцев. Можно подсчитать, насколько это выгоднее для продавцов.

Одновременно FDA объявило о выпуске двух инструкций по маркировке продуктов с ГМО-ингредиентами. Один справочник описывает правила маркировки генно-модифицированных растительных продуктов, второй — целиком посвящен лососю AquAdvantage и возможным продуктам из него, включая консервы.

При этом заявка компании AquaBounty на разрешение продавать генномодифицированного лосося ходила по инстанциям много лет. Производитель лосося AquAdvantage компания AquaBounty Technologies начала разработки вида в 1989 году. В 2003 году фирма подала заявку в FDA на одобрение своего детища как пищевого продукта. В 2012 году американские контролирующие органы-таки признали, что не видят никакого вреда от такой продукции.

Лидером рынка рекомбинантных белков, производимых трансгенными животными, является компания Genzyme Transgenics Corporation, GTC (США), которая в 2006 году вывела на рынок США и Европы первый рекомбинантный продукт, производимый с молоком трансгенных коз, — антитромбин III человека, мировая потребность в котором составляет 50 кг в год. В настоящее время компания производит с молоком трансгенных животных еще около 50 рекомбинантных белков и моноклональных антител терапевтического и диагностического

назначения, находящихся на различных стадиях клинических и предклинических испытаний. Прочные позиции на рынке белков, производимых трансгенными животными, занимает компания Pharming Group NV (Голландия). Продукт компании – ингибитор C1, производимый трансгенными животными, находится в фазе III клинических испытаний.

Кроме того, эта компания занимается выводом на рынок рекомбинантного лактоферрина человека, производимого с молоком трансгенных коров. Лидерами в разработке рекомбинантных белков, производимых с белком куриных яиц, являются компания AviGenics (Джорджия, США) и Viragen (Флорида, США). Работы по созданию трансгенных сельскохозяйственных животных – продуцентов в России проводятся институтами Российской академии наук в рамках реализации плана фундаментальных и приоритетно – прикладных исследований РАН.

Все исследования ограничены рамками лабораторий. Риск поступления трансгенных животных или их продуктов в окружающую среду сегодня практически исключен. Работы в других вышеперечисленных направлениях трансгенеза животных, как в мире, так и в России находятся на стадии исследований. Вывод таких продуктов на рынок по самым оптимистичным прогнозам потребует не менее 5 - 10 лет.

Создание генетически модифицированных животных является одним из ключевых направлений развития биотехнологий в животноводстве в мире.

Вопросы для самоконтроля:

1. Как называется молекула ДНК, служащая для переноса чужеродной ДНК в клетку?
2. Как называются внехромосомные генетические элементы прокариот кольцевой формы?
3. Как называются гибриды между плазмидами и бактериофагами?
4. Как называются плазмидные векторы содержащие сайты, ответственные за упаковку ДНК фага в белковую оболочку?
5. Как называется вектор, способный встраиваться в геном клетки-реципиента?

6. Как называется метод внесения ДНК в клетки помощью электрического поля?
7. Как называется короткий фрагмент ДНК с радиоактивной меткой, комплементарный участку какого-либо гена?
8. Как называется состояние бактериальной клетки, при котором она способна воспринимать экзогенную ДНК?
9. Как называется процесс увеличения копий гена?
10. Какие маркерные гены несет в себе плазмидный вектор?
11. Как называется совокупность колоний бактерий, содержащих разные участки генома какого-либо организма?
12. Как называется метод поиска нужных генов в библиотеке с помощью ДНК-зонда?
13. Каким методом для поиска нужного гена можно воспользоваться, если искомый ген экспрессируется в клетках бактерий.
14. Какая библиотека генов содержит более полную информацию о генах эукариот: геномная или библиотека к-ДНК?
15. С помощью какого прибора осуществляется бомбардировка клеток?
16. Как называется процесс поиска нужной последовательности ДНК в библиотеках генов?
17. Как называется метод деления эмбрионов на половинки?
18. Каким свойством обладают клетки ранних эмбрионов?
19. Как называются организмы, объединяющие в себе эмбриональные клетки, полученные от разных зигот?
20. Как называется метод соматической гибридизации морул?

Варианты индивидуальных заданий

Вариант 1.

Задание 1.

Получение трансгенных растений и животных с полезными свойствами
Возможности использования рекомбинантных ДНК.

Задание 2.

Структурный ген величиной 0,5 кб, выделенный из генома имеет на одном конце сайт рестрикции для фермента рестриктазы EcoR1, а на другом для HindIII. Можно ли клонировать этот ген в E. Coli при помощи плазмиды pUC18?

Вариант 2.

Задание 1.

Эффективность современных методов биотехнологии в животноводстве. Значение генно-инженерных методов в сохранении биоразнообразия животных.

Задание 2.

Кольцевая плазмида pSC101 несет только один участок расщепления рестриктазой EcoR1. Какой из приведённых ниже фрагментов ДНК можно встроить в данную плазмиду?

5'-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТЦАЦА-3'

3'-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5'

5'-ЦЦТТАГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦАЦАТГ-3'

3'-ГГААТЦЦГГАЦТТААТТЦГТТАТЦАЦАЦТТАГТГТАЦ-5'

Вариант 3.

Задание 1.

Перспективы генной инженерии. Риски генных технологий. Этические проблемы молекулярно-генетических технологий.

Задание 2.

При помощи рестриктазы PstI получен фрагмент двухцепочечной ДНК с липкими концами. Можно ли встроить данный фрагмент в плазмиду pBR322? Как подтвердить, что фрагмент чужеродной ДНК встроен в плазмиду pBR322?

Вариант 4.

Задание 1.

Генно-инженерные методы в создании генотипов животных с заданными свойствами. Консолидация генотипов выдающихся животных.

Задание 2.

Ген для белка β-тубулина был получен из грибка *Neurospora*, вставлен в кольцевую плазмиду и клонирован в бактерии *E.coli*. Опишите шаг за шагом последовательность действий, необходимых для того, чтобы клонировать этот ген от родственного грибка *Podospora*, используя в качестве вектора кольцевую плазмиду pBR, представленную на рисунке справа, которая несет два гена устойчивости к антибиотикам канамицину (kan) и тетрациклину (

Тема № 4

Биотехнология в воспроизводстве

Содержание темы:

Воспроизводство животных - это основной фактор, лимитирующий эффективность производства животноводческих продуктов на промышленной основе. Причины, препятствующие достижению оптимальных результатов в воспроизводстве домашнего скота различны. Новые методы расширяют возможности регулирования воспроизводства. Они связаны с манипулированием на уровне клеток или эмбрионов, с использованием физиологически активных соединений, поэтому названы биотехнологическими. К числу этих методов относят: стимуляцию и синхронизацию охоты, суперовуляцию, искусственное осеменение, трансплантацию эмбрионов, хранение гамет и эмбрионов, целенаправленное получение двоен, регулирование пола, раннюю диагностику беременности, управление процессом родов, создание химер и др.

Стимуляция и синхронизация охоты осуществляется с помощью прогестерона - женского полового гормона стероидной природы, регулирующего ход эстрального цикла, простагландинов, а также их комбинации. Этот прием позволяет вызывать появление охоты у групп племенных животных в один и тот же период времени.

В США для синхронизации охоты у телок в молочном и мясном скотоводстве выпускается препарат "Синхро-мейт-В". Он представляет совокупность двух гормонов, один из которых имплантируется под кожу, а другой инъектируется внутримышечно. Имплант помещается под кожу уха телки и сразу же после этого следует инъекция другого гормона. Под действием этих двух гормонов эстральный цикл телки прерывается и временно останавливается. Через некоторое время имплант удаляют из уха животного, начинается новый эстральный цикл. Так как имплант удаляется одновременно у всех телок, то и цикл начинается в одно и то же время.

Применение гормональных препаратов снимает необходимость ежедневного контроля за состоянием половой активности животных. Преимущество синхронизированной охоты состоит в реальной возможности формирования однородных групп животных в период осеменения, одновременности рождения приплода, точном учете кормов в группах.

Суперовуляция

Потенциальные возможности воспроизводства самок млекопитающих огромны. В их яичниках содержатся десятки и сотни тысяч овоцитов. Однако в процессе онтогенеза лишь небольшая часть из них реализуется в виде потомков. Остальные овоциты подвергаются атрезии (обратному развитию) и воспроизводстве не участвуют.

Суперовуляция - состояние, вызванное гормонами, когда в яичниках животных развивается и овулирует в несколько раз больше яйцеклеток. В зависимости от вида число овулирующих яйцеклеток может быть увеличено в 3 - 8 и даже в 50 раз. С помощью этого приема становится возможным получение большего количества эмбрионов от лучших по продуктивности коров.

Искусственное осеменение

Искусственное осеменение животных является самым старым и хорошо отработанным биотехнологическим методом разведения сельскохозяйственных животных. Применение этого метода позволяет ограничить распространение половых инфекций, которые нередко служат причиной бесплодия животных. Оно также позволяет эффективно использовать генетический потенциал лучших производителей. Экономический эффект от искусственного осеменения обусловлен снижением затрат на содержание большого поголовья производителей, возможностью быстрого размножения генотипа с хозяйственно - полезными признаками, улучшением генетического потенциала ремонтного стада.

Трансплантация эмбрионов

Трансплантация эмбрионов в настоящее время является одной из наиболее актуальных проблем в области животноводства. С развитием трансплантации в руках исследователей появилось достаточное количество ранних эмбрионов, что дало мощный импульс работам по манипуляции с этими объектами..

С помощью пересадки эмбрионов можно резко увеличить выход числа потомков от высокопродуктивных коров. Трансплантация эмбрионов, или эмбриотехнология, заключается в получении одного или нескольких эмбрионов из матки племенных животных (доноров) и пересадке в матку коров (реципиентов), где эмбрионы развиваются до отела. Этот метод в сочетании с суперовуляцией у доноров позволяет получить большое потомство от высокопродуктивных животных. Этим способом эмбрионы можно внедрить в ту или иную породу в другие регионы, используя в качестве реципиентов коров мясных пород.

Применение этого метода также упрощает обмен генофондом сельскохозяйственных животных между странами и континентами. Пересадка эмбрионов может быть использована для получения потомства от ценных, но бесплодных коров, утративших способность к размножению в результате несчастного случая, болезни или по возрасту.

Когда было установлено, что кролик обладает иммунитетом по отношению к ящуру, была выдвинута идея использования метода трансплантации для оздоровления потомства зараженных ящуром животных. Половые пути кролика, куда трансплантируются эмбрионы, способны разрушать вирус ящура в эмбрионах. Трансплантация может быть использована и для временного хранения эмбрионов. В яйцеводах крольчих удастся осуществлять трансконтинентальную перевозку эмбрионов овец.

Извлечение эмбрионов до 70-х годов производили в основном хирургическим путем, впоследствии он был заменен менее травматичным и трудоемким нехирургическим, основанным на введении в матку особого зонда по естественному каналу. Зонд имеет три канала. Один из каналов предназначен для надувания баллончика, который закупоривает рог матки, препятствуя вытеканию жидкости. По другому каналу вводится физиологический раствор с температурой 25-30°C, который вымывает эмбрионы и возвращается вместе с ними через третий канал зонда в пробирку, помещенную в водяную баню с температурой 35°C. Из этой жидкости извлекаются эмбрионы. В среднем при суперовуляции от донора можно получить от 5 до 7 эмбрионов.

Трансплантацию производят с помощью специального зонда или пистолета для осеменения. Эмбрионы помещаются в рога матки. Стельность у самок - реципиентов проверяется по уровню прогестерона в плазме крови на 21-й день.

На первое место следует поставить уже достаточно хорошо разработанный метод разделения ранних эмбрионов. Первый успешный опыт по разделению эмбрионов на стадии 2—8 бластомеров был осуществлен Виллардом (Кембридж, Великобритания). Однако получение такого материала связано с большими трудностями и может быть осуществлено в научно-исследовательских учреждениях.

В результате исследователи начали манипулировать с эмбрионами в более поздних стадиях развития (морула, бластоциста). Сущность метода заключается в том, что предварительно вскрывается прозрачная

зона (pellucida), эмбрион разделяется на две части. При этом одна половина остается в прежней зоне, а другую переносят в заранее подготовленную зону и производят обычную трансплантацию. Во многих опытах приживляемость разделенных эмбрионов достигает 50—60%. Прикладной аспект этой методики заключается в увеличении числа телят, полученных от каждого донора. По данным американских исследователей, половинки эмбрионов, инкубировавшиеся без прозрачной оболочки, сохраняли жизнеспособность в культуре только в 15% случаев, а при наличии зоны пеллюцида — в 35% случаев. Наилучшие результаты были получены при нехирургическом введении половинок эмбрионов — каждая в отдельной прозрачной оболочке в разные рога матки одного и того же реципиента (55% стельности).

В другом опыте были достигнуты еще лучшие результаты при хирургическом введении каждой половинки эмбриона в рог матки на той стороне, где локализовалось желтое тело (65% стельности). Стало очевидным, что разделение эмбрионов — эффективный метод увеличения потомства коров-доноров.

В настоящее время эта методика начинает внедряться в практику племенного дела. Уже получены животные от трансплантации половинок эмбрионов свиней (США, Р. У. Роунтри). По данным ряда исследователей, число потомков может быть увеличено на 30—35%. Однако этим не ограничивается значение клеточно-инженерной операции. Возможность массового получения идентичных двоен (генетических копий) очень важна. Эти животные имеют большую ценность для исследователей, занимающихся проблемой взаимодействия генотипа и среды. Использование идентичных двоен позволяет повысить точность исследований и достичь достоверных результатов при меньшем числе подопытных животных. Кроме того, наличие идентичных близнецов позволяет на одном из них проводить изучение признаков, требующих убоя животного (например, мясные качества), и переносить эти данные на близнеца, что является методически вполне обоснованным. Все это позволяет более точно и всесторонне оценить данный генотип. Кроме того, при трудоемкой и длительной работе по оценке быков по качеству потомства эту работу можно проводить только с одним из двойневых идентичных быков. Оценка одного животного будет соответствовать оценке и другого идентичного животного. Имеется информация о том, что уже получено потомство при разделении бластоцисты на 4 части. Это еще в значительной мере увеличивает значение данного метода клеточной

инженерии для повышения эффективности селекционно-племенной работы и исследований в области генетики сельскохозяйственных животных.

Регулирование пола.

К важнейшим проблемам животноводства относится разработка методов регулирования пола сельскохозяйственных животных. В практике разведения животных очень важно научиться управлять образованием в потомстве мужских и женских особей. Непредсказуемость пола рождаемых животных может приобретать значительную важность, если экономическое значение животных одного пола существенно выше экономического значения животных другого пола. Пока достигнут лишь незначительный прогресс в решении проблемы контролирования соотношения полов и в разработке методов его регуляции. Идеальным методом контролирования соотношения полов могло бы стать разделение спермиев, несущих X- и Y-хромосомы. В перспективе для целенаправленного получения особей мужского или женского пола может быть применен метод микрохирургической замены X и Y хромосом. Такие манипуляции уже проводились на растительных клетках и яйцеклетках земноводных. Очевидно, именно в этом направлении должны интенсивно развиваться исследования.

Другим подходом для воздействия на соотношение полов является определение пола у ранних эмбрионов после извлечения из репродуктивного тракта самки и перед их трансплантацией. Метод разделения эмбрионов по полу основан на определении белков, специфичных для самцов. Этот метод широко применяется в животноводческой практике многих стран. В Канаде уже с 1975 года рождаются телята, разделенные по полу на стадии эмбрионов.

Один из аспектов идентификации пола эмбрионов — цитологический, с помощью которого определяют их тип (XX или XY) путем исследования половых хромосом или хроматина. Кроме того, иммуногенетические методы, используемые для идентификации специфичных по полу антигенов эмбрионов, могут быть перспективны для разделения мужских и женских эмбрионов. Количественные различия в метаболической активности мужских и женских эмбрионов могут быть также использованы в качестве принципа для разделения эмбрионов по полу. Имеется сообщение, что с помощью колориметрического теста по определению активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы можно идентифицировать пол. Перспективны

методы, основанные на гибридизации ДНК для идентификации мужских эмбрионов. Каждый из указанных способов весьма перспективен. Однако в настоящее время наиболее разработаны и эффективны цитологический и иммунологический методы.

Вопросы для самоконтроля:

1. Назовите точное место оплодотворения.
2. Сколько времени яйцеклетка сохраняет способность к оплодотворению?
3. Какое деление происходит в момент оплодотворения?
4. Как называется оболочка, окружающая яйцеклетку?
5. Назовите ученого, открывшего сперматозоиды.
6. Как называется комплекс изменений в сперматозоидах, в результате которого они приобретают способность к оплодотворению яйцеклеток?
7. Где происходит процесс капацитации сперматозоидов?
8. Где в сперматозоиде располагаются ферменты, растворяющие прозрачную оболочку яйцеклетки?
9. Какие клетки образуются в результате деления овоцита второго порядка?
10. Как называется процесс увеличения двигательной активности сперматозоидов?
11. Какой органоид способствует движению хвостика сперматозоидов?
12. Назовите белок, обеспечивающий двигательную функцию сперматозоидов?
13. Как называется совокупность методов, позволяющих осуществлять оплодотворение в искусственных условиях?
14. Как называется оплодотворенная яйцеклетка?
15. Как называется предшественник ядра зиготы?
16. Сколько пронуклеусов образуется при оплодотворении яйцеклетки?
17. Какова кратность осеменения коров доноров?
18. Каким методом следует осеменять коров-доноров?
19. Как называется стадия эмбриона в возрасте 4 дней?

20. В каком возрасте эмбрион крупного рогатого скота попадает в матку?
21. На какой стадии находится эмбрион крупного рогатого скота в возрасте от 4 до 6 дней?
22. Как называются клетки ранних эмбрионов?
23. На какой стадии находится эмбрион в возрасте от 7 до 10 дней?
24. Как называется явление тесного сцепления между собой клеток морулы?
25. В чем находятся клетки эмбриона?
26. В каком возрасте происходит имплантация эмбриона крупного рогатого скота в матке?
27. Как называются клетки эмбриона, из которых впоследствии развиваются органы и ткани?
28. Как называются клетки эмбриона, дающие развитие плодных оболочек?
29. Как называется самка, от которой получают эмбрионы?
30. Как называется самка, которой пересаживают эмбрионы?
31. Кто впервые осуществил успешную пересадку эмбрионов на кроликах.
32. В каком году получен первый теленок методом Т.Э.
33. Какова продуктивность доноров для стада с продуктивностью 5800 кг.
34. В каком возрасте вымывают эмбрионы у крупного рогатого скота, овец?
35. Как называется ускоренный метод оценки генотипа производителя с использованием трансплантации эмбрионов?
36. С помощью какой трансплантации осуществляется восстановление генофонда редких пород и видов?
37. Каков предпочтительный возраст коровы-донора?
38. Под действием какого гормона происходит рост антральных фолликулов?
39. В каком органе происходит синтез гонадотропного гормона?
40. Из каких фракций состоит гонадотропный гормон?
41. В каком органе происходит образование ФСГ и ЛГ?
42. Назовите женские половые гормоны?

43. Какое вещество является предшественником стероидных гормонов?
44. Какой гормон способствует образованию эстрогенов в фолликуле?
45. Как называются внутренние клетки фолликула, синтезирующие эстрогены?
46. Как называются фолликулярные клетки, расположенные на периферии фолликула?
47. Из каких гормонов образуются эстрогены?
48. Как называется крупный растущий фолликул, улавливающий большее количество ФСГ?
49. Какие гормоны преобладают в мелких фолликулах?
50. Как называется процесс деградации, прекращения развития фолликула?
51. Как называется конечная стадия развития фолликула?
52. Какой гормон накапливается в клетках фолликула на последней стадии развития?
53. Какой гормон синтезируется в фолликуле под действием ЛГ?
54. Какое вещество накапливается в фолликуле под действием ЛГ и вызывает сокращение стенки фолликула?
55. Как называется выход яйцеклетки из фолликула?
56. Какое деление происходит в момент овуляции?
57. Какие клетки образуются в результате деления овоцита первого порядка?
58. Что образуется на месте фолликула после овуляции?
59. Как называется процесс разрастания клеточной массы желтого тела?
60. Как называется процесс прорастания кровеносных капилляров в клеточной массе желтого тела?
61. Какой гормон желтого тела способствует имплантации эмбриона в матке?
62. Какой гормон желтого тела облегчает процесс рождения плода?
63. Как называется желтое тело, задержавшееся на стадии секреции?

Варианты индивидуальных заданий

Вариант 1.

№ п/ п	Вопросы:
1.	Как называется область научных знаний о применении биологических систем и биологических процессов для получения разнообразных продуктов?
2.	Как называется отрасль биотехнологии, изучающая использование микроорганизмов для получения разнообразных веществ?
3.	В задачи какой науки входит генетическая трансформация живых организмов?
4.	Как называется отрасль биотехнологии по использованию ферментов для получения химических веществ и в химических процессах?
5.	Назовите метод получения генетически одинаковых клеток, организмов?
6.	Как называется метод, позволяющий объединять зародышевые клетки разных организмов?
7.	Назовите направление науки, которая занимается созданием неприродных форм белков на основе видоизмененных генов?
8.	Назовите, кто придумал термин «биотехнология»?
9.	Как называется совокупность методов по реконструкции зародышевых клеток растений и животных?
10.	Как называются биологически активные вещества, катализирующие химические реакции в живых организмах?
11.	Какое вещество является носителем наследственной информации?
12.	Какое явление открыл Ф. Гриффитс в 1928 г. у пневмококков?
13.	С получением какого вещества связано первое промышленное биотехнологическое производство?
14.	Как называется процесс реализации генетической информации гена в виде белковых продуктов?

Вариант 2

Вопросы:
1. Как называется самка, от которой получают эмбрионы
2. Как называется самка, которой пересаживают эмбрионы
3. Кто впервые осуществил успешную пересадку эмбрионов на кроликах.
4. В каком году получен первый теленок методом Т.Э
5. Какова продуктивность доноров для стада с продуктивностью 5800 кг.
6. В каком возрасте вымывают эмбрионы у крупного рогатого скота, овец?
7. Как называется ускоренный метод оценки генотипа

производителя с использованием трансплантации эмбрионов?
8. С помощью какой трансплантации осуществляется восстановление генофонда редких пород и видов?
9. Каков предпочтительный возраст коровы-донора?

Вариант 3

Вопросы:
1. В каком органе происходит созревание яйцеклеток?
2. В какой период онтогенеза самок закладываются яйцеклетки?
3. Назовите самую раннюю стадию развития фолликула.
4. Сколько примордиальных фолликулов в яичнике новорожденной телки?
5. Как называется фолликул, имеющий полость?
6. На какой стадии развития находится яйцеклетка в антральном фолликуле?
7. Под действием какого гормона происходит рост антральных фолликулов?
8. В каком органе происходит синтез гонадотропного гормона?
9. Из каких фракций состоит гонадотропный гормон?
10. В каком органе происходит образование ФСГ и ЛГ?
11. Назовите женские половые гормоны?
12. Какое вещество является предшественником стероидных гормонов?
13. Какой гормон способствует образованию эстрогенов в фолликуле?
14. Как называются внутренние клетки фолликула, синтезирующие эстрогены?
15. Как называются фолликулярные клетки, расположенные на периферии фолликула?
16. Из каких гормонов образуются эстрогены?
17. Как называется крупный растущий фолликул, улавливающий большее количество ФСГ?
18. Какие гормоны преобладают в мелких фолликулах?
19. Как называется процесс деградации, прекращения развития фолликула?
20. Как называется конечная стадия развития фолликула?
21. Какой гормон накапливается в клетках фолликула на последней стадии развития?
22. Какой гормон синтезируется в фолликуле под действием ЛГ?
23. Какое вещество накапливается в фолликуле под действием ЛГ и вызывает сокращение стенки фолликула?
24. Как называется выход яйцеклетки из фолликула?
25. Какое деление происходит в момент овуляции?
26. Какие клетки образуются в результате деления овоцита первого

порядка?
27. Что образуется на месте фолликула после овуляции?
28. Как называется процесс разрастания клеточной массы желтого тела?
29. Как называется процесс прорастания кровеносных капилляров в клеточной массе желтого тела?
30. Какой гормон желтого тела способствует имплантации эмбриона в матке?
31. Какой гормон желтого тела облегчает процесс рождения плода?
32. Как называется желтое тело, задержавшееся на стадии секреции?
33. Под действием какого вещества, выделяемого маткой, начинается регрессия желтого тела?
34. Как называются циклические изменения в организме самок, связанные с созреванием яйцеклеток?
35. Назовите ученого, предложившего классификацию стадий полового цикла самок?
36. Какова длительность полового цикла коров?
37. Назовите стадии полового цикла, составляющие лютеиновую фазу полового цикла.
38. Какие стадии образуют фолликулярную фазу полового цикла?
39. Что находится в яичнике в лютеиновую фазу?
40. Какая фаза полового цикла длиннее, лютеиновая или фолликулярная?
41. Как называется стадия, при которой в яичнике формируется желтое тело?
42. Какая стадия полового цикла самая длинная?
43. В какую стадию цикла наблюдается течка?
44. Под действием каких гормонов выделяется слизь шейкой матки?
45. По какому признаку начинается отсчет дней полового цикла у коров?
46. Какова длительность охоты у коров?
47. Через какое время после окончания охоты у коров происходит овуляция?
48. Как называется самая первая стадия полового цикла?
49. На какой день полового цикла проводят гормональную обработку коров с целью вызывания суперовуляции?
50. Как называется процесс овуляции более 3-х фолликул за один цикл у самок малопродуктивных видов?
51. Каков период полураспада ГСЖК в организме?
52. Какие гормоны входят в состав гонадотропных препаратов?
53. Каков период полураспада в организме ФСГ гипофизарного происхождения?
54. Какое вещество используют для вызывания овуляции созревших фолликулов?

55. Каков интервал между инъекциями гонадотропинов и простагландина?
56. Как повлияет увеличение интервала между инъекцией гонадотропина и простагландина на число овуляций: уменьшит или увеличит?
57. В какую стадию полового цикла проводится суперовуляторная обработка коров?
58. Какие вещества используют для пролонгации лютеиновой фазы полового цикла?
59. Как называется процесс одновременного вызывания половой охоты у нескольких самок?
60. Сколько инъекций и с каким интервалом проводят для синхронизации охоты с помощью простагландина Ф2-альфа?
61. В течение какого времени применяют прогестагены для синхронизации охоты самок?
62. Как простагландин Ф2-альфа действует на лютеиновую фазу полового цикла: сокращает или удлиняет?
63. В какой день полового цикла вводят гормональные препараты для синхронизации половой охоты?
64. Какое вещество в организме самок способствует лютеолизису?

Вариант 4

Вопросы:
1. Назовите точное место оплодотворения.
2. Сколько времени яйцеклетка сохраняет способность к оплодотворению?
3. Какое деление происходит в момент оплодотворения?
4. Как называется оболочка, окружающая яйцеклетку?
5. Назовите ученого, открывшего сперматозоиды.
6. Как называется комплекс изменений в сперматозоидах, в результате которого они приобретают способность к оплодотворению яйцеклеток?
7. Где происходит процесс капацитации сперматозоидов?
8. Где в сперматозоиде располагаются ферменты, растворяющие прозрачную оболочку яйцеклетки?
9. Какие клетки образуются в результате деления овоцита второго порядка?
10. Как называется процесс увеличения двигательной активности сперматозоидов?
11. Какой органоид способствует движению хвостика сперматозоидов?
12. Назовите белок, обеспечивающий двигательную функцию сперматозоидов?
13. Как называется совокупность методов, позволяющих

осуществлять оплодотворение в искусственных условиях?
14. Как называется оплодотворенная яйцеклетка?
15. Как называется предшественник ядра зиготы?
16. Сколько пронуклеусов образуется при оплодотворении яйцеклетки?
17. Какова кратность осеменения коров доноров?
18. Каким методом следует осеменять коров-доноров?
19. Как называется стадия эмбриона в возрасте 4 дней?
20. В каком возрасте эмбрион крупного рогатого скота попадает в матку?
21. На какой стадии находится эмбрион крупного рогатого скота в возрасте от 4 до 6 дней?
22. Как называются клетки ранних эмбрионов?
23. На какой стадии находится эмбрион в возрасте от 7 до 10 дней?
24. Как называется явление тесного сцепления между собой клеток морулы?
25. В чем находятся клетки эмбриона?
26. В каком возрасте происходит имплантация эмбриона крупного рогатого скота в матке?
27. Как называются клетки эмбриона, из которых впоследствии развиваются органы и ткани?
28. Как называются клетки эмбриона, дающие развитие плодных оболочек?

Вариант 5

Вопросы:
1. К какой группе методов относится морфологическая оценка качества эмбрионов?
2. Как называется метод оценки качества эмбрионов с помощью красителей?
3. Как называется процесс поддержания жизнеспособности эмбрионов в искусственных условиях?
4. К какой группе методов оценки качества эмбрионов относится культивирование?
5. Сколько баллов включает морфологическая шкала оценки качества эмбрионов?
6. Что делают с эмбрионами, оцененными как условно годные?
7. Сколько баллов должны получить эмбрионы, чтобы быть пригодными для криоконсервации?
8. Назовите инструмент для вымывания эмбрионов?
9. Как называется метод вымывания эмбрионов с использованием инструментария?
10. Какова pH жидкости для вымывания эмбрионов?

11.	Какое количество жидкости используют для промывания рога матки?
12.	С помощью чего происходит фиксация катетера в роге матки?
13.	В какой рог матки реципиента пересаживают эмбрионы?
14.	Подсчетом чего можно определить, сколько можно получить эмбрионов от донора?
15.	Как называется температура замерзания насыщенного раствора?
16.	Какие кристаллы льда образуются при медленном охлаждении жидкости?
17.	Какие кристаллы льда образуются при быстром охлаждении жидкости?
18.	Какое явление происходит с водой при сверхбыстром охлаждении жидкости?
19.	Как называются вещества, предотвращающие клетки живых организмов от повреждений при замораживании?
20.	Как называется процесс глубокого замораживания живых организмов?
21.	Какова температура жидкого азота?
22.	В чем хранится жидкий азот?
23.	Какое явление может наблюдаться при медленном оттаивании эмбриона?
24.	Как нужно оттаивать эмбрионы, быстро или медленно?
25.	Как называется метод получения генетически одинаковых организмов?
26.	Следует ли плотно закрывать крышку сосуда Дьюара?

Вариант 6

Вопросы:
1. Как называется метод деления эмбрионов на половинки?
2. Каким свойством обладают клетки ранних эмбрионов?
3. Как называются организмы, объединяющие в себе эмбриональные клетки, полученные от разных зигот?
4. Как называется метод соматической гибридизации морул?

Тема № 5

Трансгенные животные в биотехнологии

Содержание темы:

Трансгенные животные, экспериментально полученные животные, содержащие во всех клетках своего организма дополнительную интегрированную с хромосомами и экспрессирующуюся чужеродную ДНК (трансген), которая передается по наследству по законам Менделя. Изредка трансген может реплицироваться и передаваться по наследству как экстрахромосомный автономно реплицирующийся фрагмент ДНК. Термин «трансгеноз» был предложен в 1973 для обозначения переноса генов одних организмов в клетки организмов других видов, в том числе далеких в эволюционном отношении.

В отличие от растений, где существует возможность получения целого фертильного растения из одной трансформированной соматической клетки и вегетативное размножение, получение трансгенных животных - очень сложный и длительный процесс.

В настоящее время используются несколько подходов в получении трансгенных животных. Наиболее широко распространен метод микроинъекций чужеродной ДНК (чДНК) в пронуклеусы зигот. Оптимальные условия для проведения микроинъекций в пронуклеусы зигот мышей описаны в работе Бринстера и соавторов (1994).

Получение трансгенных животных осуществляется с помощью переноса клонированных генов (ДНК) в ядра оплодотворенных яйцеклеток (зигот) или эмбриональных стволовых (плюрипотентных) клеток. Затем в репродуктивные органы реципиентной самки пересаживают модифицированные зиготы или яйцеклетки, у которых собственное ядро заменено на модифицированное ядро эмбриональных стволовых клеток, либо бластоцисты (эмбрионы), содержащие чужеродную ДНК эмбриональных стволовых клеток.

Величина вводимой ДНК может достигать 30 Мб. Интеграция нескольких копий (от 1 до нескольких сотен) экзогенной ДНК в геном происходит, как правило, в одном сайте в ориентации "голова к хвосту" или "голова к голове". При инъекции нескольких рекомбинантных конструкций, их встраивание в геном, также происходит в одном сайте.

Другой подход в получении трансгенных животных заключается в инфицировании ранних эмбрионов млекопитающих рекомбинант-ными ретровирусами. Недостатком этого метода является получение трансгенных животных с мультисайтовой интеграцией трансгена и его нестабильной наследуемостью в поколениях.

Еще одним подходом в получении трансгенных животных является использование трансформированных чужеродной ДНК, эмбриональных стволовых клеток, путем инъекции последних в полость бластоцисты.

Основным преимуществом данного метода является возможность проводить направленный мутагенез на уровне целого организма, при помощи гомологичной рекомбинации чужеродной ДНК с геномной ДНК.

Для получения трансгенных животных использовались и другие методы, к которым относятся: применение сперматозоидов, обработанных экзогенной ДНК, для оплодотворения яйцеклеток в условиях *in vitro*; использование липосом в качестве вектора чужеродной ДНК. Однако, эти методы имеют значительно менее широкое распространение, в сравнении с методом микроинъекции чужеродной ДНК в пронуклеус зиготы

Используемая стратегия состоит в следующем:

1. Клонированный ген вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки.
2. Оплодотворенные яйцеклетки с экзогенной ДНК имплантируют в реципиентную женскую особь (поскольку успешное завершение развития эмбриона млекопитающих в иных условиях невозможно).
3. Отбирают потомков, развившихся из имплантированных яйцеклеток, которые содержат клонированный ген во всех клетках.
4. Скрещивают животных, которые несут клонированный ген в клетках зародышевой линии, и получают новую генетическую линию.

Эксперименты по генетической модификации многоклеточных организмов путем введения в них трансгенов требуют много времени. Тем не менее, трансгеноз стал мощным инструментом для исследования молекулярных основ экспрессии генов млекопитающих и их развития, для создания модельных систем, позволяющих изучать болезни человека, а также для генетической модификации клеток молочных желез животных с целью получения с молоком важных для медицины белков. Был даже предложен новый термин «фарминг» (*pharming*), относящийся к процессу получения из молока трансгенных домашних животных аутентичных белков человека или фармацевтических препаратов. Использование молока целесообразно потому, что оно образуется в организме животного в большом количестве и его можно выдаивать по мере надобности без вреда для животного. Вырабатываемый молочной железой и секретируемый в молоко новый белок не должен при этом оказывать никаких побочных эффектов на нормальные физиологические процессы, протекающие в организме трансгенного животного, и подвергаться посттрансляционным изменениям, которые, по крайней мере, близки к таковым в клетках человека. Кроме того, его выделение из молока, которое содержит и другие белки, не должно составлять большого труда.

Несмотря на то, что первые трансгенные сельскохозяйственные животные были получены в 1985 г. введением экзогенной ДНК в пронуклеус зигот, до настоящего времени не разработано эффективного метода, который бы мог быть использован для создания генетически модифицированных животных независимо от вида и от целей эксперимента. Разработка новых эффективных методов переноса генов в эмбриональные и соматические клетки животных, а также совершенствование существующих подходов остается актуальной задачей. Среди большого разнообразия способов внедрения экзогенной ДНК в геном животного можно выделить следующие, которые нашли широкое применение в практике трансгеноза: - метод микроинъекции, - опосредованный ретровирусами перенос генов, - использование модифицированных эмбриональных стволовых клеток, - перенос трансформированных ядер генеративных и соматических клеток, - использование спермиев и сперматогониев как переносчиков ДНК.

Среди других способов доставки экзогенной ДНК в организм животных можно отметить использование липосом, аденовирусных векторов, а также метод высокоскоростной инъекции. Однако эти методы не нашли широкого применения вследствие их недостаточной стабильности, а также отсутствия интеграции трансгена в геном.

Микроинъекции рекомбинантной ДНК в оплодотворенные ооциты многоклеточных животных пока остаются наиболее популярным способом введения чужих генов в организм животных. Несмотря на то, что метод требует высокой квалификации и дорогостоящего оборудования, простота и надежность окупают все его недостатки.

На частоту интеграции экзогенной ДНК при использовании метода микроинъекции оказывают влияние такие факторы, как чистота вводимого образца, форма и концентрация ДНК, состав буферного раствора для микроинъекции, качество эмбрионов, а также способ пересадки эмбрионов реципиентам (нехирургический, хирургический, лапароскопический).

Трансгенных животных в потомстве идентифицируют различными методами, чаще всего ПЦР, и скрещивают для получения трансгенных линий. Некоторые из трансгенных животных оказываются мозаичными (половые клетки не содержат экзогенной ДНК), поэтому при скрещивании трансгенным оказывается меньшая часть потомства первого поколения, чем расчетные 50 %. В ряде случаев гомозиготные линии получить не удастся, поскольку 5-15 % трансгенных инсерций в гомозиготном состоянии летальны, так как инсерция иногда нарушает

жизненно-важные части генома. Точный механизм, обеспечивающий интеграцию инъектированной ДНК в хромосомы клетки-мишени, неизвестен, однако анализ структуры встроенной ДНК позволяет выявить некоторые моменты. Интеграция происходит случайным образом в один хромосомный локус, который может содержать от одного до нескольких тысяч tandemных копий интегрированной ДНК.

Около 30 % полученных первичных трансгенных животных, как правило, обнаруживают ту или иную степень мозаичности, что может являться следствием интеграции экзогенной ДНК после завершения первого цикла репликации. Степень интеграции экзогенной ДНК в геном, т.е. число трансгенных животных от общего числа родившихся животных, при использовании метода микроинъекции в зависимости от вида животных колеблется в незначительных пределах 5-15 %.

Наиболее важным с учетом затрат, требующихся для получения одного трансгенного животного, является показатель общей эффективности трансгеноза, который рассчитывается как отношение числа полученных трансгенных животных к общему числу пересаженных эмбрионов, выраженное в процентах. Величина этого показателя для млекопитающих также относительно постоянна и составляет в среднем от ~0,5 % у свиней и коров до ~2 % у мышей.

Ретровирусные векторы также используются для получения трансгенных животных. Инфицирование предимплантационных эмбрионов рекомбинантными ретровирусами - относительно несложная эффективная процедура. Восьмиклеточную морулу освобождают от яйцевой оболочки и помещают в культуральную чашку с фибробластами, продуцирующими рекомбинантный ретровирус. Инфицированные эмбрионы, достигшие стадии бластулы, имплантируют псевдобеременным самкам. В результате формируются трансгенные организмы, мозаичные по числу и локализации встроеной рекомбинантной ДНК в геном. Поэтому для получения чистых линий далее необходим масштабный аутбридинг.

Недостатком метода является ограничение вставки экзогенной ДНК ~8 тп, вследствие чего трансген может оказаться лишенным прилегающих регуляторных последовательностей, необходимых для его экспрессии, а в некоторых случаях интеграция в исходный локус нестабильна. Новые лентивирусные векторы (лентивирусы принадлежат семейству ретровирусов) показали свою очень высокую эффективность при доставке ДНК в ооциты и зиготы.

Инъекция рекомбинантных лентивирусных конструкций в перивителлиновое пространство свиных зигот и коровьих ооцитов привело к появлению потомства с самой высокой на данный момент долей трансгенных особей. В то же время лентивирусные векторы обладают всеми недостатками ретровирусных: малый размер вставки экзогенной ДНК и множественная интеграция в хозяйский геном, которая может привести к таким нежелательным побочным эффектам, как активация онкогенов и инсерционный мутагенез.

Кроме того, для лентивирусных векторов наблюдается высокая степень мозаичности получаемого трансгенного потомства и отдельные факты сайленсинга (инактивации) лентивирусных рекомбинантных последовательностей в полученных трансгенных линиях. Использование ретровирусных векторов имеет и еще один большой недостаток. Хотя эти векторы создаются так, чтобы они были дефектными по репликации, геном штамма ретровируса (вируса-помощника), который необходим для получения большого количества векторной ДНК, может попасть в то же ядро, что и трансген.

Несмотря на все принимаемые меры, ретровирусы-помощники могут реплицироваться в организме трансгенного животного, что совершенно недопустимо, если этих животных предполагается использовать в пищу или как инструмент для получения коммерческого продукта. И поскольку существуют альтернативные методы трансгеноза, ретровирусные векторы редко используются для создания трансгенных животных, имеющих коммерческую ценность.

Модифицированные эмбриональные стволовые клетки могут быть использованы для получения трансгенных животных. Клетки, выделенные из эмбрионов на стадии бластоцисты, могут пролиферировать в культуре, сохраняя способность к дифференцировке в любые типы клеток, в том числе и в клетки зародышевой линии, при введении в другой эмбрион на стадии бластоцисты. Такие клетки называются плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками (ES). В ES-клетки в культуре можно ввести целевой трансген различными методами (трансфекция, электропорация, ретровирусная инфекция и т.д.) без нарушения их плюрипотентности.

Практическое достоинство этой схемы заключается в том, что она дает большие возможности для проведения селекции клеток по определенному параметру. Это может быть число копий трансгена, его локализация или характер экспрессии.

Зная последовательности, окружающие конкретный сайт для желаемой интеграции, можно сконструировать вектор для встраивания целевой ДНК путем гомологичной рекомбинации. Например, заменить какой-либо ген, кодирующий легко идентифицируемый признак с целью селекции, убрав или восстановив его функцию в полученной трансгенной клетке.

Отобранные трансгенные ES-клетки можно культивировать и использовать для получения трансгенных животных. Это позволяет избежать случайного встраивания трансгена, характерного для метода микроинъекций и ретровирусных векторных систем. Все получаемые по такой схеме животные являются мозаиками, поэтому необходима селекционная работа по получению чистых линий.

Проблему мозаичности первичных трансгенных животных можно преодолеть пересадкой ядер трансформированных ES-клеток в энуклеированные ооциты, которые затем продолжают свое нормальное развитие. В результате в каждой клетке полученного животного будет содержаться трансген.

Перенос ядер трансформированных генеративных и соматических клеток в яйцеклетку, или соматический ядерный перенос (somatic nuclear transfer), еще один способ, используемый в практике трансгеноза. Было показано, что ядра эмбриональных клеток различных животных при переносе в энуклеированную яйцеклетку иногда способны обеспечивать развитие целого нового организма. После непродолжительного культивирования даже ядра из некоторых дифференцированных клеток способны обеспечивать развитие до жизнеспособной особи.

Так, например, знаменитая овечка Долли была клонирована в 1997 г. слиянием культивируемых (3-6 пассажей) клеток эпителия молочной железы (вымени) взрослого шестилетнего животного с лишенной ядра яйцеклеткой. Хотя нельзя исключить, что для клонирования случайно была взята недифференцированная клетка, присутствующая в донорском эпителии.

Клонирование Долли из ядра дифференцированной клетки и трех других овец из ядер эмбриональных клеток удалось осуществить благодаря переносу ядер из клеток, находящихся в стадии покоя (G0), и, возможно, особенностям эмбриогенеза этого животного. В зиготах овец в течение первых трех делений, занимающих несколько суток, происходит только репликация ДНК, ни один из генов не экспрессируется. Предполагается, что за это время введенная ДНК

освобождается от специфичных для клетки регуляторных белков, а соответствующие гены эмбрионального развития связываются с инициаторными эмбриональными белковыми факторами из цитоплазмы яйцеклетки.

Хотя технологиям клонирования еще очень далеко до совершенствования - клонированная Долли выявляла многие признаки преждевременного старения, это очень многообещающая технология получения трансгенных животных. Даже если имеются различные проблемы с первым поколением, скорее всего, второе поколение не будет иметь недостатков, приобретенных вследствие использования «старого» ядра для яйцеклетки. Основная проблема, которую нужно решить для того, чтобы создание любых трансгенных животных с помощью метода переноса ядер стало реальным, - это сохранение плюрипотентности клеток в непрерывной культуре.

В настоящее время ведутся активные поиски факторов репрограммирования дифференцированных клеток для индукции плюрипотентности. Если это удастся, то генетическое изменение таких клеток и создание трансгенных организмов путем соматического ядерного переноса станет почти рутинной процедурой, а пока это единичные удачные эксперименты.

Искусственные хромосомы как трансгенный вектор.

Большинство трансгенов представляют собой кДНК, небольшие гены (<20 тнп) или фрагменты генов. Зачастую кДНК плохо экспрессируются в клетках млекопитающих, а когда трансгеном служит геномная ДНК, важные геноспецифичные регуляторные последовательности, расположенные до и после гена-мишени, обычно не входят в состав вставки. Кроме того, полноразмерные гены и мультигенные комплексы (>100 тнп) слишком велики для встраивания в обычные векторы.

Учитывая все это, для трансгеноза стали использовать искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), вмещающие фрагменты геномной ДНК длиной от 100 до > 1 000 тнп и искусственные хромосомы человека еще большей емкости. Данные эписомальные векторы имеют еще одно преимущество - позволяют избежать эффект положения гена при экспрессии экзогенной ДНК.

Уровень экспрессии встроенного гена очень зависит от его хромосомной позиции, например, встраивание в неактивный хроматин (гетерохроматин) интактной хромосомы приводит к инактивации гена.

Искусственные хромосомы человека (human artificial chromosome - HAC), содержащие целиком иммуноглобулиновый локус человека с

тяжелыми и легкими цепями, были внедрены в бычьи фибробласты, которые затем использовали для соматического ядерного переноса.

Полученные трансхромосомальные телята экспрессировали иммуноглобулины человека в своей крови. Эта система стала важным шагом в направлении животной продукции терапевтических поликлональных антител человека. Дальнейшие наблюдения за трансгенными животными показали, что рекомбинантные НАСs поддерживались в большинстве особей первого поколения в течение нескольких лет. Будут ли полученные искусственные хромосомы соответствующим образом разделяться в процессе мейоза и наследоваться, еще только предстоит выяснить.

Совсем недавно возникла новая перспективная технология для получения животных с выключенными генами - малые интерферирующие РНК (миРНК, siRNA), которые используют для прицельного выключения генов.

Двухцепочечные малые интерферирующие миРНК в 19-23 нуклеотида специфически связываются с комплементарной последовательностью своей матричной мРНК-мишени, направляя ее по пути деградации.

Для транзientного выключения гена синтетические миРНК трансфецируют в клетки или ранние эмбрионы. Для стабильной генной репрессии последовательность миРНК должна быть инкорпорирована в геном в составе экспрессионной генной конструкции.

В противоположность классической нокаут-стратегии, которая требует длительного скрещивания для получения чистой линии с инактивированным геном в обоих локусах диплоидного генома, миРНК при интеграции могут легко выключить целевой ген в любой имеющейся линии животных.

Несмотря на разработанный широкий спектр методик получения трансгенных животных, в настоящее время пока отсутствует надежная и эффективная технология трансгеноза животных. Самые большие проблемы связаны с беспорядочным встраиванием экзогенной ДНК в геном при использовании большинства существующих методов. Так что дальнейшие качественные улучшения технологии необходимы в области разработки прицельной модификации клеточных генов и точного встраивания экзогенной ДНК в геном.

Тем более что геномы большинства хозяйственно важных организмов к настоящему времени полностью секвенированы и можно планировать будущую структуру трансгенного организма. Сочетание полностью расшифрованных последовательностей геномов с методами

адресной доставки экзогенной ДНК позволит проводить целенаправленное конструирование трансгенных геномов с заранее заданными свойствами.

Вопросы для самоконтроля:

1. Как называются организмы, несущие чужеродные гены?
2. Как называется метод, позволяющий выявить локализацию ДНК-зондов с радиоактивной меткой?
3. Как называются животные, несущие трансген только в одной из пары гомологичных хромосом?
4. При каком методе трансгеноза чужеродная ДНК находится в каждой клетке трансгенного организма?
5. В какой органоид зиготы проводят инъекцию ДНК?
6. Какой процесс предшествует образованию пронуклеусов?
7. Сколько пронуклеусов образуется в яйцеклетке?
8. Каким свойством обладают эмбриональные стволовые клетки?
9. При каком методе трансгеноза чужеродная ДНК находится только в части клеток трансгенного организма?
10. Кто является донором при трансформированных ЭС-клеток?
11. Как называется направление, при котором трансгенных животных используют как биопродукторов лекарственных веществ?
12. Как называется процесс поиска нужной последовательности ДНК среди библиотек генов или клеток и особей, подвергшихся генетической трансформации?
13. Как называется РНК, комплементарная участку или всей м-РНК?
14. Как называется метод лечения, основанный на генетической трансформации клеток или тканей пациента?
15. Куда вводится ДНК при генетической трансформации птиц?

Варианты индивидуальных заданий

Вариант 1.

Задание 1.

Системы для экспрессии белков в животных клетках Векторы экспрессии на основе вирусов животных

Задание 2.

Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно клонировать в бактериофаге λ ?

5'-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3'
3'-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5'

5'-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТЦАЦАТГ-3'
3'-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦ ТТЦГААГТГТАЦ-5'

Вариант 2.

Задание 1.

Клонирование животных. Клонированные дикие, домашние, сельскохозяйственные животные. Значение для сохранения биоразнообразия. Принципиальная схема клонирования. Перспективы.. Этические проблемы.

Задание 2.

Поскольку рестриктаза EcoRI узнаёт последовательность ДНК, состоящую из шести нуклеотидов то она будет разрезать молекулу двухцепочечной ДНК в среднем один раз на 4096 нуклеотидных пар. Можно ли клонировать какие либо фрагменты ДНК дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae* в в фаге λ если они были разрезаны ферментом EcoRI?

Вариант 3.

Задание 1.

Трансгенные лабораторные и сельскохозяйственные животные с генами GFP: мыши, обезьяны, свиньи, курицы и т.д. Возможности хозяйственного использования.

Задание 2.

Гплоидный геном дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae*, состоящий из одной хромосомы, содержит около $13,5 \times 10^6$ нуклеотидных пар ДНК. При создании геномной библиотеки дрожжевого грибка использовали рестрикционный фермент EcoRI. Полученные фрагменты были встроены в вектор и клонированы в *E. coli*.

Сколько различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК *Saccharomyces cerevisiae* составляют геномную библиотеку этого и да?

Вариант 4.

Задание 1.

Создание трансгенных конструкций для получения биологически активных веществ.

Модели трансгенных животных, позволяющих получать необходимые для человека белки, как гормон роста, протеин С, $\alpha 1$ -антитрипсин, сывороточный альбумин, урокиназа. Получение рекомбинантного человеческого лактоферрина от коз.

Задание 2.

Получен интересный фрагмент двухцепочечной ДНК с тупыми концами величиной около 200 нуклеотидных пар. Причем, в этом фрагменте не оказалось сайтов рестрикции для удобных рестриктаз, расщепляющих ДНК с образованием липких концов.

Удастся ли успешно клонировать этот фрагмент ДНК в известных вам плазмидах?

Тема № 6

Молекулярно-генетические методы

Содержание темы:

Молекулярно-генетические методы основаны на анализе нуклеиновых кислот, в первую очередь, молекул ДНК. Применение молекулярно-генетических технологий в селекции крайне широко: от изучения генетического разнообразия и вопросов паспортизации животных до защиты авторских прав селекционеров и продукции животноводства и растениеводства от фальсификации, а также определение её качества и генетической чистоты.

Одной из основных целей этих методов является диагностика мутаций, исследование их ассоциации с наследственными заболеваниями, а также выявление гетерозиготных и гомозиготных носителей мутации. По существу, молекулярная диагностика является наиболее объективным методом верификации наследственных заболеваний. Важно подчеркнуть, что нахождение мутаций в гомозиготном или гетерозиготном состояниях соответственно при рецессивных или доминантных заболеваниях является бесспорным подтверждением диагноза. Однако используемые на практике методы молекулярной диагностики чаще всего не позволяют идентифицировать все возможные мутации в исследуемом гене.

Внедрению молекулярно-генетической методологии в практику способствовала разработка метода *полимеразной цепной реакции (ПЦР)* или *специфической амплификации ДНК*, произошедшая более 20 лет назад. Первооткрыватель этого метода Керри Мулис за свое изобретение был удостоен Нобелевской премии в 1993 году. Метод ПЦР позволяет тестировать состояния генов у отдельных индивидуумов. Его суть заключается в избирательном копировании *in vitro* небольшого фрагмента гена, в котором предположительно может быть локализована мутация, с использованием в качестве матрицы *геномной* ДНК обследуемого. Небольшие размеры копируемого (или амплифицируемого) фрагмента гена в сочетании с их огромным числом позволяют в дальнейшем использовать очень простые методы для анализа этого участка ДНК, выявления его особенностей у обследуемого пациента. Главными из этих методов являются электрофорез *амплифицированной ДНК*, ее окрашивание, разрезание специфическими ферментами – *рестриктазами*, и определение нуклеотидной последовательности этого фрагмента - секвенирование.

ПЦР лежит в основе ДНК-диагностики любых наследственных заболеваний. Данный подход широко используется и для анализа

генетических факторов риска, предрасполагающих к развитию широко распространенных мультифакториальных заболеваний. В случае молекулярной диагностики инфекций амплифицируется фрагмент ДНК, специфичный для определенного возбудителя, а затем с помощью электрофореза и окрашивания на ДНК тестируется наличие этого фрагмента, а значит и самого возбудителя, в том биологическом образце, который был взят для анализа. Использование ПЦР в паспортизации животных основано на амплификации высоко изменчивых областей генома, позволяющих установить точное происхождение животных.

Преимуществом ДНК-диагностики по сравнению с биохимической или иммунологической диагностикой является использование унифицированного набора методов, практически не зависящего от целей проводимого исследования. Это методы выделения ДНК, ПЦР, электрофорез, рестрикция ДНК, гибридизация со специфическими *ДНК-зондами* и секвенирование. Таким образом, в пределах одной лаборатории можно заниматься ДНК-диагностикой широкого спектра заболеваний. Остановимся более подробно на ключевых методах молекулярной диагностики.

Выделение ДНК. Прежде всего, необходимо помнить, что основная масса ДНК находится в ядрах в составе хромосом в суперскрученном состоянии за счет взаимодействия с определенными белками. Таким образом, ДНК можно выделять из любого типа тканей или клеток, в которых содержатся ядра. Существует много модификаций методов выделения ДНК.

ДНК чаще всего выделяют из лейкоцитов крови, для чего производят забор из вены от 1 до 5 мл крови. Кровь нужно собирать в присутствии антикоагулянтов. После отстаивания крови отбирают слой, обогащенный лейкоцитами, и добавляют детергенты для разрушения мембраны клеток. С помощью мягкого центрифугирования осаждают ядра на дно пробирки. Сливают надосадочную жидкость, и к суспензии ядер добавляют детергенты, разрушающие их мембраны, а также протеолитические ферменты, разрушающие белки. Чаще всего используют протеиназу К. Таким образом ДНК выходит в раствор. На следующем этапе необходимо отделить фракцию высокомолекулярных ДНК от низкомолекулярных соединений, таких как фрагменты белков, липиды, углеводы и т.п. Одним из способов такого разделения является

экстракция фенолом. При добавлении фенола и тщательном перемешивании низкомолекулярные соединения перейдут в фенол, который окрасится при этом в бурый цвет за счет присутствия фрагментов гемоглобина, а молекулы ДНК останутся на поверхности фенола, так как не смогут войти в этот плотный раствор. Светлый раствор над фенолом, содержащий ДНК, отбирают и проводят несколько раундов повторных очисток фенолом с добавлением на последних этапах хлороформа. Затем можно осадить ДНК из раствора, добавляя этанол. При 70° спирта ДНК выпадает в осадок в виде аморфного образования. В таком состоянии ее можно длительно хранить при низких температурах.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) или специфическая амплификация ДНК это избирательный синтез *in vitro* большого количества копий (порядка миллиона) небольшого фрагмента ДНК размером, обычно, в сотни нуклеотидов по матричной молекуле ДНК. Для проведения ПЦР необходимо искусственно синтезировать небольшие одонитевые молекулы ДНК размером от 15 до 30 нуклеотидов, комплементарные концам амплифицируемого фрагмента ДНК. Эти молекулы носят название *праймеры*. Они служат «затравкой» для синтеза ДНК и потому определяют его специфичность. ПЦР проводится в специальных одноразовых пробирках в очень небольшом объеме, не превышающем, обычно, 50 мкл. В этот объем определенного буфера добавляют матричную ДНК (ДНК обследуемого), два типа искусственно синтезированных на коммерческой основе праймеров, фермент комплементарного синтеза ДНК – термофильную ДНК-полимеразу, выделенную из термофильных бактерий и потому способную выдерживать высокие температуры, и 4 типа дезокситрифосфатов (dNTP), которые служат в качестве строительного материала для синтеза ДНК.

На первом этапе матричную ДНК переводят в одонитевую форму путем нагревания раствора выше 95° в течение нескольких минут. Затем начинают циклически чередовать три кратковременные процедуры, длящиеся несколько десятков секунд: (1) отжиг или посадка праймеров - это происходит при охлаждении раствора до температуры, оптимальной для образования двунитевой структуры матричной ДНК с праймерами; (2) синтез ДНК, начиная с праймера – это происходит при повышении температуры раствора до значений, оптимальных для работы термофильной ДНК-полимеразы и (3) денатурация

синтезированной ДНК – достигается повышением температуры раствора выше 90° для перехода ДНК в однонитевую форму. Затем все повторяют, начиная с процедуры (1). Таким образом, при каждом цикле смены температур, происходит удвоение участка ДНК, расположенного между праймерами, причем длина этого участка в точности соответствует расстоянию между внешними концами праймеров. После проведения 25-30 подобных циклов количество вновь синтезированных фрагментов ДНК достигает или даже превышает миллион копий. Выбор программы смены температур и длительности каждой из процедур цикла, наряду с выбором праймеров и буфера, зависят от длины и специфики амплифицируемого фрагмента ДНК. Эти параметры и определяют искусство проведения ПЦР, и очень часто они подбираются эмпирически. Циклическая смена температур производится автоматически в приборе, который называется *амплификатор ДНК* или *термоциклер*. Таким образом, ПЦР простой в исполнении, не дорогостоящий, высокоточный и современный метод молекулярной диагностики.

Электрофорез ДНК принципиально не отличается от белкового электрофореза. Амплифицированную ДНК наносят на полиакриломидный или агарозный гель и включают ток. При этом начинается продвижение ДНК в геле от минуса к плюсу, и скорость этого продвижения зависит от длины молекулы и ее конфигурации. Через определенное время молекулы ДНК одинаковой длины сконцентрируются в узких зонах. Количество копий синтезированных в процессе проведения ПЦР ДНК, обычно, бывает достаточным для ее визуализации при использовании рутинного метода окрашивания ДНК этидиумом бромидом. При добавлении этого красителя к гелю полосы ДНК высвечиваются красным цветом при просмотре геля под ультрафиолетовой лампой.

Существует много модификаций ПЦР, удобных для проведения специфических исследований. Так, одномоментно можно амплифицировать не один, а несколько фрагментов ДНК – *мультиплексная* или *множественная ПЦР*. *Асимметричная ПЦР* позволяет вести преимущественный синтез одной цепи ДНК. Вводя специфические красители в праймеры можно оценивать количество копий амплифицированных фрагментов ДНК на автоматическом сканере – *количественная ПЦР*. Очень мощным является метод ПЦР *в реальном времени*. На базе ПЦР разрабатываются методы молекулярной цитогенетики – *PRINS*, *количественная флуоресцентная ПЦР*.

Последний метод, основанный на мультиплексной амплификации повторяющихся хромосом-специфических полиморфных последовательностей ДНК, позволяет оценить количество копий специфических хромосом или их фрагментов, и он очень удобен для проведения пренатальной диагностики анеуплоидий у плода, таких как синдром Дауна, Эдвардса, Патау и др.

Молекулярная диагностика мутаций или ДНК-диагностика. Методы молекулярной диагностики зависят от характера повреждения гена, то есть от типа мутации. Наиболее просто диагностируются структурные внутригенные мутации – делеции и инсерции, так как они изменяют длину, а значит, и электрофоретическую подвижность амплифицируемого фрагмента ДНК. Для диагностики таких мутаций достаточно провести ПЦР с использованием специфических праймеров и электрофорез, а затем сопоставить длину амплифицированного фрагмента ДНК в норме и у больного. У гомозигот по делеции размер амплифицированного фрагмента будет короче на величину делеции, а значит, этот фрагмент при электрофорезе будет двигаться быстрее и расположится ниже нормального. У гетерозигот на электрофореграмме будут два фрагмента – один нормальной величины и другой более короткий. Аналогично диагностируются инсерции, только длина амплифицированного фрагмента у мутантных гомозигот будет больше, а сам фрагмент на электрофореграмме будет располагаться выше нормального. У гетерозигот на электрофореграмме также будут два фрагмента – нормальной величины и длинный, то есть расположенный выше нормального.

Для диагностики более протяженных внутригенных делеций удобным является метод мультиплексной ПЦР с последующим электрофоретическим разделением амплифицированных фрагментов ДНК.

Молекулярная диагностика точковых мутаций миссенс- или нонсенс-типа более сложна, так как длина амплифицированного фрагмента при этом не меняется. Наиболее распространенным методом диагностики таких мутаций является метод *рестрикционного анализа*. Этот метод может быть использован только в тех случаях, когда мутации случайным образом изменяют последовательности, специфичные для узнавания рестриктазами - эндонуклеазами, катализирующими разрезание двунитевых последовательностей ДНК в местах локализации этих специфических сайтов. Для диагностики таких мутаций достаточно

провести ПЦР, рестрикцию амплифицированного фрагмента ДНК с использованием специфической эндонуклеазы и электрофорез. При наличии в норме сайта рестрикции произойдет разрезание амплифицированного фрагмента и на электрофореграмме будет две полосы, соответствующие фрагментам ДНК, суммарная длина которых равна величине исходного амплифицированного фрагмента. Исчезновение сайта рестрикции в результате мутации приведет к тому, что у мутантных гомозигот разрезания амплифицированного фрагмента не произойдет и на электрофореграмме будет одна полоса, причем характер ее расположения будет аналогичен тому, который можно наблюдать после электрофореза до рестрикции. У гетерозигот выявятся все три полосы, одна из которых соответствует неразрезанному амплифицированному фрагменту, а две – продуктам рестрикции. В настоящее время идентифицировано более 500 различных рестриктаз, и для каждого из этих ферментов существует свой сайт узнавания. Поэтому, как только описывается какая-то новая мутация, сразу же с помощью определенной компьютерной технологии производится анализ окружающей ее нуклеотидной последовательности на предмет выявления сайтов рестрикции. Если этот поиск оказывается успешным, клиническая диагностика подобной мутации проводится методом рестрикционного анализа с использованием специфичной для данного сайта эндонуклеазы. Поскольку метод рестрикционного анализа очень прост и удобен в исполнении, существует много модификаций этого метода, направленных на искусственное введение сайтов рестрикции и т.п.

Универсальным методом диагностики точковых мутаций является метод *аллель-специфических олигонуклеотидов (АСО)*. Этот метод основан на гибридизации амплифицированных ДНК со специфическими *олигонуклеотидными* ДНК-зондами. Он более трудоемок, так как требует синтеза и специфического мечения ДНК-зондов. Однако этот метод поддается автоматизации, и на его базе разрабатываются технологии, позволяющие одновременно тестировать десятки или даже сотни мутаций. При этом используются микрочиповые технологии, то есть меченные олигонуклеотиды в микроколичестве наносятся на твердые носители (чипы), а затем проводится их гибридизация с исследуемыми образцами ДНК.

Сходная технология – «*микроэррей*» – используется для анализа *экспрессионного профиля генов*, то есть множества генов, избирательно экспрессирующихся в специфических тканях или клетках. Техника

«микроэrray» позволяет одновременно анализировать экспрессию десятков тысяч генов.

Секвенирование ДНК является самым объективным методом регистрации мутаций, при котором точно идентифицируется молекулярный характер повреждения. Однако в клинической практике этот метод используется редко в виду его трудоемкости и высокой стоимости.

Вопросы для самоконтроля:

1. Как называется внеклеточный метод клонирования генов?
2. Как называется прибор для клонирования ДНК?
3. Сколько праймеров используется в ПЦР для клонирования гена?
4. Какой фермент, выдерживающий нагревание, используется в ПЦР?
5. Какое вещество составляет углеводную основу терминирующих нуклеотидов?
6. Как называется определение последовательности оснований в молекуле ДНК?
7. Где происходит разделение фрагментов ДНК при секвенировании методом Сэнгера?
8. Как называется наука об исследовании геномов?
9. Как называется процесс вырезания интронов из пре м-РНК?
10. Как называется участок гена, с которого иницируется транскрипция?
11. Как называется участок гена, на котором прекращается транскрипция?
12. Как называется участок ДНК, содержащий последовательность, кодирующую зрелую форму белка?
13. Как называется метод идентификации индивидуума, основанный на определении специфической последовательности ДНК?
14. Какая ДНК наследуется преимущественно по материнской линии?
15. Назовите консервативную последовательность связывания РНК-полимеразы.
16. Как называется процесс образования зрелой формы РНК и некоторых белков?
17. Назовите науку, изучающую качественный и количественный состав белков, синтезируемых в организме?

18. Как называется область науки, разрабатывающая и применяющая вычислительные алгоритмы для анализа, и систематизации генетической информации с целью выяснения структуры и функции макромолекул?
19. Назовите науку, в задачу которой входит реконструкция основных метаболических процессов в организме на основе нуклеотидных последовательностей.
20. Какова стоимость молекулярно-генетических исследований (ПЦР, секвенирование) сегодня и в перспективе?
21. Знаете ли Вы конкретные примеры применения молекулярно-генетических методов в практике хозяйств НСО?

Варианты индивидуальных заданий

Вариант 1.

Задание 1. Молекулярно-генетические методы диагностики. Определения. Основные понятия.

Задание 2.

Была установлена нуклеотидная последовательность короткого фрагмента ДНК состоящий из 30 нуклеотидов. Эта последовательность имела следующий состав:

ТЦАЦТГЦЦЦГЦТТТЦЦАГТЦГГГАААЦЦТГ.

Как будет выглядеть схема радиограммы сиквенса ДНК для этих 30 нуклеотидов?

Вариант 2.

Задание 1. Мутации и полиморфизм. Классификация. Понятия.

Задание 2.

Просеквенированный фрагмент ДНК имеет следующую нуклеотидную последовательность:

ГЦЦАГЦТГЦАТТААТГААТЦГГЦЦААЦЦГ.

Изобразите схему радиограммы сиквенса ДНК для этих нуклеотидов?

Вариант 3.

Задание 1. Основные принципы, на которых базируются молекулярно-генетические методы диагностики. Секвенирование ДНК. Методы секвенирования.

Задание 2.

Ген кодирующий компонент зубной эмали – амелогенин расположен в половых хромосомах X и Y. Причем длина этого гена в X хромосоме составляет 106 нуклеотидных пар, тогда как в Y хромосоме он на 6 пар длиннее.

Как будут выглядеть электрофоретические спектры образцов ДНК, гена амелогенина взятых из костей разной половой принадлежности амплифицированных (размноженных) методом ПЦР, после электрофореза в агарозном геле?

Вариант 4.

Задание 1.

Базовые методы идентификации мутаций. Саузерн-блоттинг. ПЦР.

Задание 2.

Для идентификации удалось получить лишь около 10 копий небольших фрагментов ДНК, содержащих нужный ген. Такое ограниченное количество копий ДНК не позволяет провести секвенирование и электрофоретический анализ гена, что исключает генетическую идентификацию и дактилоскопию.

Каково будет количество копий ДНК нужного гена, если исследователю удастся провести 20 успешных циклов амплификации (размножения) фрагментов ДНК из костных останков, используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)?

Тема № 7

Молекулярно-генетические маркёры

Содержание темы:

Молекулярные маркеры (синоним – ДНК-маркеры) – это генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК. ДНК-маркеры являются третьим поколением генетических маркеров. Им предшествовали белковые маркеры, а еще ранее – классические генетические маркеры. Впервые теоретическое обоснование использованию генетических маркеров («сигналей») дал около века назад А.С. Серебровский: «... сигналами мы называем удобные для менделистических наблюдений альтернативные гены с более или менее известной локализацией, которые, не оказывая воздействия на изучаемый трансгрессирующий признак и влияя достаточно определенным образом, облегчают генетический анализ этого признака, позволяя следить за наследованием того участка хромосомы, в котором эти сигналы расположены» (Серебровский, 1970).

В настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров. Наиболее широко используемые ДНК-маркеры разделяют на три группы, согласно основному методу анализа: маркеры, исследуемые с помощью (1) блот-гибридизации, (2) ПЦР и (3) ДНК-чипов.

Данная классификация отражает процесс «эволюции» ДНК-маркеров. Первая из трех перечисленных выше групп представляет собой первое поколение ДНК-маркеров, получивших широкое распространение в 1980-е годы. В 1990-е годы ключевые позиции заняли ПЦР-маркеры, в 2000-е годы их существенно потеснили молекулярные маркеры, основанные на использовании ДНК-чипов. В последние 2–3 года для анализа полиморфизма ДНК все чаще используют метод прямого секвенирования генома или его отдельных участков.

К молекулярным маркерам наравне с классическими генетическими применяют термины «локус», «аллель», «доминантный», «кододоминантный».

Молекулярные маркеры подразделяют на монолокусные и мультилокусные. Монолокусные маркеры наследуются чаще всего по кододоминантному типу, мультилокусные – по доминантному. Среди молекулярных маркеров различают маркеры с известной локализацией (в определенной хромосоме или участке хромосомы, или вблизи конкретного гена) и маркеры, о локализации которых ничего не известно (как правило, это мультилокусные маркеры). Как те, так и другие находят свое применение в генетических исследованиях и в селекции. Молекулярные маркеры с неизвестной локализацией нельзя использовать для маркирования определенного гена или хромосомы,

зато их успешно применяют в филогенетических исследованиях, для паспортизации сортов растений и пород животных. Некоторые мультилокусные маркеры подходят для создания генетических карт, а так же для геномной селекции.

На выбор ДНК-маркеров подходящего типа для решения конкретной задачи влияют и такие характеристики, как уровень внутривидового полиморфизма и возможность автоматизации процесса анализа полиморфизма ДНК. С внедрением ДНК-маркеров наибольший размах приобрели среди прочих такие направления, как построение молекулярных карт отдельных хромосом и геномов, картирование на них генов и локусов количественных признаков (QTL). В 1980 г. Дэвид Ботштейн совместно с Р. Уайтом, М. Школьником и Р. Дэвисом разработал первые монолокусные генетические маркеры на основе анализа полиморфизма ДНК (а именно полиморфизма длины рестрикционных фрагментов –ПДРФ) и показал, что с их помощью можно проводить построение генетических карт.

За этой пионерской работой последовало создание ПДРФ-карт различных видов животных и растений. Насколько эффективно ПДРФ-маркеры позволили продвинуться в картировании геномов, иллюстрирует следующий пример. Первая ПДРФ-карта генома пшеницы содержала в 1,5 раза больше локусов и была в 1,2 раза длиннее прежней классической генетической карты, ставшей результатом трудов многих исследователей в течение нескольких десятилетий.

Выяснилось, что ПДРФ-маркеры, разработанные для одного вида, могут использоваться для анализа геномов родственных видов и родов. Таким образом, стало возможным сравнительное картирование геномов, благодаря которому внутри отдельных семейств удалось выявить ряды ортологичных генов и проследить преобразования структуры генома отдельных видов в ходе эволюции от общего предка. Результаты этих работ крайне важны для современных исследований в области сравнительной геномики.

Благодаря использованию ПДРФ-карт появилась возможность определять точное положение отдельных генов в геноме и клонировать их последовательности на основе картирования (map-based gene cloning – позиционное клонирование генов). Однако массовое распространение работ по картированию генов, а также локусов количественных признаков (QTL – quantitative trait loci) произошло не в эпоху ПДРФ – маркеров (из-за их высокой стоимости и необходимости использования

радиоактивно меченных проб), а с появлением более дешевых и удобных в применении ПЦР-маркеров.

Различные модификации PCR используются для выявления «нового поколения» ДНК-маркеров, создания насыщенных генетических карт и маркирования QTL. Преимущество ДНК-маркеров в том, что изменения в последовательности ДНК является первопричиной всех последующих изменений организма. Кроме того, они обеспечивают возможность анализа любых последовательностей генома, а не только белок-кодирующих, составляющих от 1 до 10% от всего генома.

С подразделением ДНК на кодирующую и анонимную, а, главное, в связи с наличием генетических вариаций (полиморфизма) в обеих группах ДНК, связано существование двух типов генетических маркеров.

Рассмотрим их основные характеристики.

Маркеры I типа:

1. Последовательности ДНК, кодирующие первичную структуру биополимеров (пептидов и нуклеиновых кислот).
2. Относительно низкий генетический полиморфизм (меньшее количество аллельных вариантов) в сравнении с маркерами II типа.
3. Относительно высокий эволюционный консерватизм.

Несмотря на существование видовых различий в нуклеотидных последовательностях одноименных генов, кодируемый ими продукт у разных видов выполняет одну и ту же функцию. Это позволяет использовать маркеры I типа в различных эволюционных исследованиях генома.

Таким образом, маркеры I – это, в общем случае, гены, контролирующие проявление того или иного признака, полиморфизм которого выявляется либо по фенотипическому проявлению аллелей, либо путем молекулярно-генетических или иных специальных исследований. В качестве примера маркера I можно рассматривать различные мутации окраса у животных, или различные генетически детерминированные аномалии и уродства.

Маркеры II типа:

1. Микросателлиты (ди- три- тетрануклеотидные повторы в последовательности ДНК).
2. Генетическая функция неизвестна.
3. Высокая генетическая изменчивость (до 10 аллельных вариантов).
4. Видоспецифичны: существование одинаковых маркеров

возможно только у близкородственных видов.

В качестве маркеров II типа используются повторяющиеся нуклеотидные последовательности, имеющие высокую степень полиморфизма. Эти последовательности могут быть подразделены на два класса: дисперсные последовательности и тандемные повторы.

Дисперсные последовательности в зависимости от длины делят на два подкласса: длинные интерсперсионные элементы (более 1000 п.о.) и короткие интерсперсионные элементы (менее 500 п.о). Функции этих элементов пока еще до конца не выяснены. Следует отметить, что данные элементы не отличаются консервативностью между видами животных. Так, между SINEs KPC и свиней не выявлено гомологии.

Тандемные повторы – это повторение коротких нуклеотидных последовательностей (мотивов), ориентированных в положении «голова-хвост». Поскольку в них в одном локусе повторяется один и тот же мотив, эти последовательности получили название сателлитов.

Сателлиты представляют собой многократное повторение мотива, фланкированное уникальными (однокопийными) последовательностями..

Разные локусы тандемных повторов отличаются друг от друга нуклеотидным составом фланкирующих последовательностей, величиной, нуклеотидным составом мотивов и их числом. Изначально термин сателлиты являлся техническим обозначением физико-химических свойств означенных фракций, а не отражением их биологических свойств. Им обозначали ту часть генома, которая отделялась при градиентном ультрацентрифугировании и, следовательно, по плотности и по содержанию АТ/ГС должна была отличаться от основной массы ДНК. В дальнейшем выяснилось, что гены рибосомной РНК (рДНК), митохондриальные и хлоропластные ДНК могут образовывать отдельные сателлитоподобные пики в градиенте; с другой стороны, «истинные» сателлиты с GC-составом, идентичным с основной ДНК, невозможно отделить от основной массы ДНК, и они обнаруживаются как «скрытые» сателлиты.

Аллели одного сателлитного локуса отличаются друг от друга числом мотивов. Это еще одно из существенных различий между маркерами I и II типов. В первом случае в основе генетического полиморфизма в подавляющем большинстве лежит замена нуклеотидов (их делеции и вставки очень редки), а во втором – изменение числа нуклеотидов, связанное с вариацией числа мотивов.

Следует четко разграничить термины сателлитные и мини- и микросателлитные ДНК. Основные различия между ними заключаются в следующем:

- (1) мини- и микросателлиты в отличие от сателлитных ДНК обнаруживаются в эухроматине;
- (2) Число копий повторов в мини- и микросателлитах намного меньше по сравнению с сателлитными ДНК.

Длина повторяющейся единицы минисателлитных ДНК составляет 10–100 п.н., а микросателлитных – 6 и менее п.н. Длина повторов сателлитных ДНК не имеет каких-либо ограничений. Она варьирует от 2 п.н. до нескольких сотен.

По размеру мотивов различают моно-, ди-, три-, тетра-, пента- и гексануклеотидные микросателлиты. Так, например, у человека простые последовательности нуклеотидов состоят из повторений А, СА, АААН, ААН, АГ, АС, ТС и т.д. в порядке убывания частоты встречаемости. Наиболее многочисленны в геноме млекопитающих динуклеотидные микросателлитные повторы (TG) $_n$ (CA) $_n$ -от 5 до 10.10⁴ на геном, а поскольку гаплоидный геном в среднем содержит 3.10⁹ п.о., то на каждые 50-100 т.п.о. приходится по микросателлитному блоку поли (TG). Они составляют 57% (в среднем, в зависимости от вида) от общего числа микросателлитных повторов. За ними в нисходящем порядке представлены повторы (CT)/(GA) $_n$ (30%), (TA) $_n$ (12%), (CG) $_n$ (0,7%)

Для каждого типа повторов характерна своя определенная локализация. Так, (TG) $_n$ повторы разбросаны в основном по всему геному.

Результаты гибридизации *in situ* показали, что у человека и свиньи понижена плотность этих повторов в центромерной и теломерной областях, районе ядрышкового организатора и промежуточного гетерохроматина. Число повторяющихся мотивов микросателлитов варьирует от 10 до 30. Средние размеры микросателлитных последовательностей варьируют в зависимости от вида. У крупного рогатого скота размер динуклеотидных повторов сравним с таковым у человека и соответствует 14,89 единицам повтора.

Согласно структуре, микросателлиты разделяются на три типа:

1. Совершенные повторы мотивов (CA) $_n$ или (GT) $_n$, которые не прерываются другими нуклеотидами и не расположены рядом с повторами других последовательностей (непрерывная последовательность одного типа);

2. Несовершенные (неполные) повторяющиеся последовательности с двумя или большим числом блоков (CA)_n, разделенных не более чем тремя следующими друг за другом неповторяющимися основаниями (состоят из одной или нескольких прерывающихся последовательностей одного и того же типа);

3. Сложные повторяющиеся последовательности, у которых блоки (CA)_n отделены от других блоков более чем тремя неповторяющимися основаниями, представлены в виде одинаковых нуклеотидов в количестве 5-10 и более (состоят из совершенных или несовершенных повторов прерывающихся другими простыми последовательностями). На долю совершенных повторов приходится до 70% микросателлитных последовательностей.

Микросателлиты расположены, главным образом, в некодирующих областях, хотя сегодня доказано так же их нахождение (в малой степени) в кодирующих и промоторных областях (Hancock, 1999).

Микросателлиты равномерно распределены по всему геному и находятся, главным образом, в аутосомах, хотя предполагается их наличие и в X-хромосоме. ДНК-МС характеризуются высокой степенью полиморфизма и имеют кодоминантный тип наследования

Не принимая во внимание тесное сцепление микросателлитов с определенными локусами, они являются нейтральными в селекционном аспекте. Вместе с тем, следует отметить, что в литературных источниках имеется ряд публикаций, в которых показано сцепление, как предполагают, нейтральных микросателлитов с генами-кандидатами локусов количественных признаков

Микросателлиты нашли свое применение в геномной дактилоскопии для оценки происхождения. Сложность использования микросателлитов связана с тем, что разделение аллелей идет только по молекулярной массе. А это означает, что фрагменты одинаковой массы, но различающиеся фланкирующими последовательностями, т.е. относящиеся к разным локусам, не могут быть точно идентифицированы.

Более широкое применение для выявления генетического полиморфизма нашли микросателлиты. Они активно используются для создания генетических карт. Вследствие их высокой специфичности, микросателлиты являются первоначальным маркером для паспортизации животных, для анализа происхождения. Вероятность несовпадения результата один из миллиона.

Они играют роль в диагностике как маркеры по установлению причины болезни. Т.е., определенные аллели микросателлитов связаны с определенными мутациями в кодирующих регионах ДНК, которые могут быть причиной некоторых болезней. Так, у человека была доказана связь ненормально длинных тринуклеотидных повторов с генами, ответственными за заболевания, такие как миотоническая дистрофия, хорea Хунтингтона, синдром ломкости X-хромосомы. У мышей были выявлены локусы, связанные с регуляцией кровяного давления у мышей с наследственной гипертонией.

В последние годы микросателлиты все больше и больше используются для разъяснения вопросов популяционной и эволюционной генетики, став наиболее распространенным типом маркеров, используемых для этих целей.

Таким образом, среди ПЦР-маркеров наиболее подходящими и востребованными для картирования генов и геномов оказались микросателлитные (SSR) маркеры. Использовать гипервариабельные последовательности, состоящие из простых повторов, в качестве маркеров впервые предложил в 1989 г. немецкий исследователь Дитхард Таутц.

Полиморфизм нуклеотидных последовательностей ДНК способствует созданию любого количества ДНК-маркеров различных типов.

С усовершенствованием и автоматизацией методов секвенирования (расшифровки последовательности нуклеотидов) стало возможным генотипирование животных по тысячам маркеров.

Наиболее эффективной считается технология с применением «микрочипа» (одновременный анализ на специальной платформе экспрессии десятков тысяч генов в нескольких десятках проб), на основе полиморфизма по единичному нуклеотиду (*Single Nucleotide Polymorphism*, **SNP**). Технология микрочипов позволяет получать маркеры, равномерно рассеянные по всему геному. Эти маркеры интенсивно изучаются в геномах человека и животных для выявления ассоциаций и сцеплений с различными QTL, которые могут быть релевантными (действительными) в *любой* популяции.

В среднем один SNP приходится на 400 нуклеотидов. Число SNP на ген колеблется от 0 до 29. Типичный индивидуум в среднем гетерозиготен примерно по 24000-400000 несинонимичных, т.е. изменяющих аминокислоту в кодируемой белке, замен. В геноме человека находится около 1 млн. SNP (можно предположить, что такое же количество у крупного рогатого скота), из которых около 500000 не

кодирующих, 200000 синонимичных кодирующих (молчащих, не изменяющих аминокислотную последовательность кодируемого белка) и 200000 несинонимичных кодирующих SNP.

Мониторинг генома предполагает анализ десятков тысяч генетических маркеров. Компании Illumina и Affymetrix выпустили на рынок чипы, позволяющие типировать 500 тыс. SNP-маркеров; скоро будут доступны чипы с миллионом и более маркеров. Цена такого анализа снижается, и в будущем можно ожидать, что генотипирование нескольких сотен или тысяч животных с помощью этих чипов будет финансово приемлемо. В самой большой базе данных - dbNCNB - содержится более 11 млн. SNP. Именно такие ДНК-маркеры особенно удобны для построения плотных генетических карт или карт сцепления с QTL (интервал между сцепленными маркерами или размер искомого участка QTL может быть сведен к 1-2 и менее сантиморганам, сМ; 1сМ=1% рекомбинантных гамет при кроссинговере).

Таким образом, молекулярные (или ДНК-) маркеры – это новое поколение генетических маркеров, отличающихся от прежних большим количеством и частой встречаемостью в геномах эукариот и основанных на универсальных, а значит широко востребованных и постоянно развивающихся методах анализа. Целесообразным и экономически оправданным оказалось использование ДНК-маркеров в прикладных областях, в частности в селекции, а их применение в фундаментальных исследованиях позволило выйти на новый уровень понимания организации и эволюции геномов изучаемых объектов.

Вопросы для самоконтроля:

1. Молекулярно-генетические маркёры, как инструмент генетического разнообразия.
2. Преимущество молекулярно-генетических маркёров перед морфологическими и биохимическими маркёрами.
3. Основные характеристики молекулярно-генетических маркёров.
4. Молекулярно-генетическое маркирование, основанное на использовании ДНК
5. ПДРФ и ПЦР, как главные методы молекулярно-генетического маркирования.
6. Основные свойства маркеров I и II типов.
7. Классификация маркеров II типа.

8. Наследование маркёров I и II типов.
9. Строение сателлитной последовательности.
10. Строение ДНК-сателлитов.
11. Мини- и микросателлиты.
12. Однонуклеотидные полиморфизмы.
13. Генетический полиморфизм и ДНК-маркеры.
14. Методы выявления полиморфных вариантов
15. Кодированная и анонимная ДНК.
16. Митохондриальные гены.
17. Классические представления о генетике масти
18. Генетика окраса домашних животных.
19. Мутация окраса и ДНК-полтиморфизм
20. Полиморфизм казеинов.
21. Полиморфизм лактоглобулинов
22. Полиморфизм молочных белков и качество молока и молочной продукции.

Варианты индивидуальных заданий

Вариант 1.

Задание 1.

Полиморфизм ДНК Основные типы молекулярно-генетических маркёров. Классификации. Генетические маркёры I и II типа.

Задание 2.

Имеется последовательность из 43 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК сле

дующего состава:

5'-ЦЦТТАГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦАТГ-3'

3'-ГГААТЦЦГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТАЦ-5'

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

Вариант 2.

Задание 1.

Молекулярно – генетические маркёры. ДНК-паспортизация животных. Значение. Преимущества.

Задание 2.

Структурный ген величиной 0,5 кб, выделенный из генома имеет на одном конце сайт рестрикции для фермента рестриктазы EcoR1, а на другом для HindIII. Можно ли клонировать этот ген в E. Coli при помощи плазмиды pUC18?

Вариант 3.

Задание 1. Гены кандидаты. Позиционные гены – кандидаты. Функциональные гены - кандидаты.

Задание 2.

Кольцевая плазида pSC101 несет только один участок расщепления рестриктазой EcoR1. Какой из приведённых ниже фрагментов ДНК можно встроить в данную плазмиду?

5'-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3'

3'-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5'

5'-ЦЦТТАГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦАЦАТГ-3'

3'-ГГААТЦЦГГАЦТТААТТЦГТТАТЦАЦАЦТТАГТГТАЦ-5'

Вариант 4.

Задание 1.

Технологии с применением «микрочипа». Однонуклеотидные полиморфизмы

Задание 2

Поскольку рестриктаза EcoRI узнаёт последовательность ДНК, состоящую из шести нуклеотидов то она будет разрезать молекулу двухцепочечной ДНК в среднем один раз на 4096 нуклеотидных пар.

Можно ли клонировать какие либо фрагменты ДНК дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae* в в фаге λ если они были разрезаны ферментом EcoRI?

Тема № 8

Молекулярно-генетические маркёры в селекции

Содержание темы:

Возможности ДНК-маркеров превосходят потенциал изоферментов и запасных белков. В связи с тем, что применение молекулярных маркеров не зависит от фенотипа животного или растения, возраста животного или этапа вегетационного периода и их использование позволяет напрямую характеризовать генотип, они приобретают все большую ценность при оценке степени генетического разнообразия, а также в исследованиях, направленных на идентификацию генов, участвующих в детерминации хозяйственно-ценных признаков. Актуально использование ДНК-маркеров при идентификации генов устойчивости к заболеваниям.

В 1926 г. акад. А.С. Серебровский и Е.Т. Васина-Попова описали расположение генов в половой хромосоме курицы. В это же время А.С. Серебровский предложил метод «сигнального гена», который был использован для поиска гена, детерминирующего яйценоскость. Вскоре исследования по картированию генов были прерваны и до 90-х годов не возобновлялись/.

В 1940-х годах Ирвинг, Стормонт и Фергюсон положили начало работ по изучению факторов групп крови крупного рогатого скота. В 60-е годы исследования групп крови и белкового полиморфизма зародили надежду применения генетических маркеров в селекции. Большое внимание уделялось поиску ассоциаций с количественными хозяйственно-полезными признаками. В многочисленных сообщениях приводились противоречивые результаты.

В СССР пик иммуногенетических исследований пришелся на 1970-80-е гг.

В 1964 г. была опубликована работа Neiman-Sorensen A., Robertson A. The association between blood groups and several production characteristics in three Danish Cattle Breeds, посвященная выявлению связи между факторами групп крови и девятью количественными признаками. Авторы использовали данные о 2378 первотелках трех пород с датских контрольных станций. Исследования, проведенные на достаточно большом материале, при контролируемых условиях среды и статистически безупречными методами, не выявили связи между факторами групп крови и анализируемыми признаками. Авторы высказали мнение, что оценивать племенную ценность по продуктивным признакам при помощи групп крови не целесообразно - традиционными

методами можно достигнуть большего (что и подтвердила в дальнейшем практическая селекция). Шталь В. с соавторами обобщили публикации по крупному рогатому скоту и резюмировали, что между группами крови и продуктивными признаками ассоциаций, имеющих практическое значение, нет. Rocha сделал анализ более 60 фундаментальных исследований, результаты которых были опубликованы в 1951-82 гг. Учитывались только ассоциации факторов групп крови с признаками молочной продуктивности и типа. В 69 публикациях сообщалось о 3664 статистических тестах, из которых 301 (8,2%) были значимыми. Из них только 3 ассоциации повторялись в нескольких исследованиях (были релевантными), но ни одна не использовалась в практическом разведении молочного скота.

С конца 80-х гг. поток публикаций сократился. Надежда на наличие устойчивой связи количественных признаков с конкретными аллельными вариантами групп крови, белков крови и белков молока стала угасать. Отмечалось, что иммуногенетические исследования не смогли дать однозначного ответа о характере и тесноте связи с хозяйственно-полезными признаками. Кроме того, было установлено, что, если даже взаимосвязи и имеют место, они не являются универсальными. В качестве объективных причин противоречивых результатов указывалось на то, что исследования лимитировались наличием малого числа маркеров и низким уровнем их полиморфизма.

Сегодня факторы групп крови используют, в основном, для первичного мониторинга достоверности происхождения животных.

В начале 1980-х годов были созданы маркерные системы, которые позволили проводить прямое исследование ДНК различных организмов. Разработка этих маркёров была связана с развитием молекулярно-генетических методов диагностики. Именно с ПЦР-маркеров началось широкое внедрение ДНК-маркеров в селекционный процесс.

В качестве генов-маркеров рассматриваются гены, имеющие влияния на биохимические и физиологические процессы в организме, обладающие полиморфизмом (различные аллельные варианты) обусловленным, как правило, точечной мутацией. Мутации могут быть расположены как в кодирующей последовательности — экзоне и приводить к изменению аминокислотного состава белков, так и в регуляторных элементах, влияя тем самым на транскрипцию гена.

Гены-маркеры продуктивности свиней.

В качестве перспективных генов-маркеров продуктивности свиней выделяют гены: RYR-1 (рианодиновый рецептора-1), IGF2

(инсулиноподобный фактор роста 2), MC4R (рецептор меланокортина 4), POU1F1 (гипофизарный фактор транскрипции), ESR (рецептор эстрогена), PRLR (рецептора пролактина), FSHb (фолликулостимулирующий гормон) и др.

Мутация в гене RYR-1 рассматривается как одна из причин стрессчувствительности свиней. Крайнее ее проявление — злокачественный гипертермический синдром, низкое качество мяса. Несмотря на то, что гетерозиготные животные фенотипически устойчивы к стрессу, но именно они являются носителями «нежелательного» аллеля. В связи с чем проведение молекулярной диагностики ремонтного молодняка позволяет полностью избавиться от «нежелательного» аллеля в популяции.

Ген IGF2 выступает в качестве маркера откормочной и мясной продуктивности. Замена нуклеотидов, обеспечивающая полиморфизм гена, расположена в 3-ем интроне. В качестве «желательного» выявлен генотип QQ, который связан с лучшими показателями откормочных и мясных качеств.

Ген MC4R кодирует рецепторы меланокортина 4, которые являются посредниками лептина в регуляции массы тела и пищевого поведения. Рассматривая генотипы гена MC4R в целом можно отметить, что свиньи гомозиготного генотипа AA гена MC4R отличаются лучшими среднесуточными привесами, но и большей толщиной шпика, по сравнению с аналогами генотипа GG. Свиньи генотипа GG, как правило, менее скороспелы, но при этом отличаются лучшими мясными качествами. Эти особенности необходимо учитывать при выборе «желательного» генотипа по гену MC4R.

Ген ESR кодирует альфа рецептор гормонов эстрогенов, которые участвуют в регуляции полового развития, гаметогенеза, роста и поддержания скелета. Для свиней крупной белой породы (КБ) «желательным» по воспроизводительным качествам рассматривается генотип vv. в то же время у свиней породы ландрас гомозиготный генотип BB практически не встречается, а в качестве «желательного» выступает генотип AA.

Ген POU1F1(известный также как Pit -1 или GHF-1) — гипофизарный фактор транскрипции, является регулирующим транскрипционным фактором передней доли гипофиза, который эффективно стимулирует экспрессию генов гормон роста, пролактина и тиреотропного гормона. Рецептор пролактина является специфическим рецептором гормона передней доли гипофиза — пролактина, который в организме

млекопитающих участвует в регуляции роста, метаболизма и размножения. Для свиноматок породы КБ и ландрас «желательным» по воспроизводительным качествам является генотип вв.

Ген FSHB кодирует строение фолликуло-стимулирующего гормона. Изменение аминокислотной последовательности гормона связано с изменением его функциональных особенностей, которые прослеживаются однотипно у свиней вне зависимости от породы или линии. Закрепление «желательного» генотипа ВВ в популяции способствует повышению у свиноматок воспроизводительных качеств.

Гены-маркеры продуктивности крупного рогатого скота (КРС).

В качестве перспективных генов-маркеров продуктивности коров выделяют гены CSN3 (капа-казеина), GH (гормона роста), PRL (пролактина), LGB (лактоглобулина) и др.

Ген капа-казеина (CSN3) — обеспечивает оптимальные технологические свойства молока при производстве сыра, в связи с чем является одним из основных маркеров племенной ценности КРС. Ген каппа-казеина (CSN3) у КРС находится на 6-й хромосоме. Установлена ассоциация В-аллеля гена CSN3 с более высоким содержанием белка в молоке и выходом сыра, а также с лучшими коагуляционными свойствами молока.

Ген гормона роста (GH) — важнейший регулятор соматического роста животных, обладающий, в том числе лактогенным и жиरोмобилизирующим действием. У КРС ген гормона роста локализован на 19-й хромосоме и состоит из пяти экзонов и четырёх интронов. Установлена связь различных полиморфных вариантов гена GH с ростом и молочной продуктивностью (удой, содержание жира и белка в молоке).

Ген пролактина (PRL) — один из самых универсальных гормонов гипофиза. Является потенциальным генетическим маркером признаков молочной продуктивности в животноводстве. У КРС ген PRL расположен на 23-й хромосоме и состоит, как и генbGH, из пяти экзонов и четырёх интронов. Установлена связь RsaI-генотипов гена PRL у КРС с параметрами молочной продуктивности. Функция пролактина — стимуляция развития молочных желез, образования и секреции молока.

Ген лактоглобулина (LGB) — располагается на 11 хромосоме коров и имеет 12 известных вариантов. Лактоглобулин является основным сывороточным белком жвачных животных. Установлена тесная взаимосвязь между технологическими свойствами и биохимическим

полиморфизмом белков молока. Генетические варианты бета-лактоглобулина оказывают влияние на массовую долю жира и белка в молоке, соотношение белковых фракций и сыродельческие свойства молока.

Гены-маркеры продуктивности овец.

В качестве перспективных генов-маркеров продуктивности овец выделяют гены GDF9 (дифференциальный фактор роста), BMPR-IB (рецептора морфогенетического белка костей), BMP-15 (костный морфогенетический белок 15) и др.

Ген дифференциального фактора роста (GDF9) расположен на 5 хромосоме и играет важную роль для поддержания нормального яичникового фолликулогенеза связан с плодовитостью овец.

Ген рецептора морфогенетического белка кости (BMPR-IB) расположен на 6 хромосоме и кодирует рецепторы — протеинкиназы, участвующие в фосфорилировании эндоплазматических веществ и взаимодействующие с генами морфогенетических белков кости. BMPR-IB является одним из основных генов, который может быть использован в качестве ДНК — маркера для раннего отбора высокопродуктивных маток.

Ген костного морфогенетического белка 15 (BMP-15) расположен на 11 хромосоме. BMP15 играют значительную роль в развитие ооцитов и фолликулов и влияют на плодовитость овцематок.

Отбор по генотипу имеет ряд преимуществ по сравнению с отбором по фенотипу. Процесс генотипирования может быть полностью или частично автоматизирован, тогда как методы автоматического фенотипирования развиваются очень медленно. Приборы для автоматического анализа фенотипа отличаются узкой специализацией и очень высокой стоимостью, в то время как устройства, необходимые для анализа генотипа, дешевле их и являются универсальными.

Анализ проявления того или иного признака осуществляется на строго определенной стадии развития. Образцы для генотипирования можно отобрать практически в любой удобный момент. Отбор проб для выделения необходимого количества ДНК на ранних стадиях развития селективируемых организмов позволяет своевременно изымать из селекционного процесса значительное количество материала, не потратив на анализ и уход за ним лишних средств.

На результаты фенотипирования влияют различные факторы окружающей среды. Генотип не зависит от изменения условий среды.

Если отбор ведется на основании анализа фенотипа, то при полном доминировании невозможно отличить доминантные гомозиготы от гетерозигот и, следовательно, выбрать индивидуумы для скрещивания в текущем поколении. С помощью ДНК-маркеров легко справиться с этой задачей.

Анализ ряда важных признаков растений проводится после стадии развития, на которой может быть осуществлена гибридизация, поэтому скрещивание отобранных образцов проводится уже в следующий вегетационный период. При использовании ДНК-маркеров можно подобрать подходящие пары и осуществить гибридизацию в текущем поколении. Это также ускоряет селекционный процесс. Благодаря этим преимуществам применение молекулярных маркеров стало неотъемлемой частью селекционного процесса во многих странах мира

Вопросы для самоконтроля:

1. Использование анонимных маркеров в селекции.
2. Мутации фактора XI у крупного рогатого скота.
3. Анализ полиморфизма гена казеина молока КРС. Полиморфные системы казеина.
4. Характеристика и полиморфизм гена $\alpha_1\text{Cn}$ крупного рогатого скота.
5. Аллельные варианты гена $\alpha_2\text{Cn}$ крупного рогатого скота.
6. Аллельные варианты гена βCn крупного рогатого скота.
7. Частота встречаемости аллелей гена βCn крупного рогатого скота у различных пород корного рогатого скота.
8. Структура и полиморфизм гена κCn крупного рогатого скота.
9. ПЦР-ПДРФ-анализ в диагностике однонуклеотидных полиморфизмов в генах казеина крупного рогатого скота.
10. Характеристика и аллельный полиморфизм гена βLG (β -лактоглобулин) крупного рогатого скота.
11. ПЦР-ПДРФ-анализ в диагностике однонуклеотидных полиморфизмов в генах лактоглобулина крупного рогатого скота.
12. Гены соматотропинового каскада у КРС.
12. Маркеры роста и качества мяса у крупного рогатого скота, свиней и овец
13. ДНК-диагностика мутаций, обуславливающих наследственные заболевания у свиней.
14. Анализ полиморфизма свиней по локусу MC4R

15. Полиморфизм гена H-FABP (белок, связывающий жирные кислоты) у свиней.
16. Генетика стресс-синдрома у свиней. Ген RYR1.
17. Полиморфизм генов эстрогенового пролактинового рецептора у свиней.
18. Селекция свиней на устойчивость к инфекционным заболеваниям.
19. BMPR-1R и BMP 25 - гены плодовитости у овец
20. Гены-кандидаты для повышения многоплодия овец
21. Использование полиморфных вариантов главных генов плодовитости в селекции
22. Применение ДНК - диагностики для выявления летальных рецессивных мутации
23. Врожденный иммунодефицит крупного рогатого скота (BLAD – синдром).
24. Комплексный порок позвоночника (CVM).
25. Генетический контроль в селекции на основе маркеров I и II типа.
26. Генетическая сертификация племенных животных: оценка достоверности происхождения;
27. ДНК-диагностика носительства лейкоза у крупного рогатого скота.
28. ДНК-диагностика носительства туберкулёза у крупного рогатого скота.
29. ДНК-диагностика происхождения и степени родства животных.
28. Набор маркеров при оценке достоверности происхождения животных
28. Международный набор маркеров – панель ISAG.
30. Значение микросателлитов в установлении происхождения и степени родства животных.
31. Нормативные акты, регламентирующие сертификацию племенного дела в РФ.
32. Актуальность генетической паспортизации сельскохозяйственных животных.
33. Митохондриальная ДНК. Возможные перспективы использования митохондриальной ДНК в паспортизации животных

Варианты индивидуальных заданий

Вариант 1.

Задание 1. Молекулярно-генетические маркёры в селекции крупного рогатого скота

Задание 2.

Просеквенированный фрагмент ДНК имеет следующую нуклеотидную последовательность:

ГЦЦАГЦТГЦАТТААТГААТЦГГЦЦААЦГЦГ.

Изобразите схему радиогаммы сиквенса ДНК для этих нуклеотидов

Вариант 2.

Задание 1. Молекулярно-генетические маркёры в селекции свиней

Задание 2.

Была установлена нуклеотидная последовательность короткого фрагмента ДНК состоящий из 20 нуклеотидов. Эта последовательность имела следующий состав:

ТЦАЦТГЦЦЦГЦТТТЦЦАГТЦ

Как будет выглядеть схема радиогаммы сиквенса ДНК для этих 20 нуклеотидов?

Вариант 3.

Задание 1.

Молекулярно-генетические маркёры в селекции овец

Задание 2.

Имеется фрагмент двухцепочечной ДНК следующего состава:

5'-ТАГГАТЦЦАТТАААТАГТГГАТЦЦГТ-3'

3'-АТЦЦТАГГТААТТТАТЦАЦЦТАГГЦА-5'

Можно ли встроить данный фрагмент в плазмиду рBR322? Как подтвердить, что фрагмент чужеродной ДНК встроен в плазмиду рBR322?

Вариант 4.

Задание 1.

Молекулярно-генетические маркёры в практике коневодства.

Задание 2.

В плазмиде рUC18 имеется полилинкерный участок, который содержит сайты рестрикции для 10 различных рестриктаз. Можно ли встроить в эту плазмиду приведённые ниже фрагменты двухцепочечной ДНК?

5'-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГГААТТЦАЦА-3'

3'-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5'

5'-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3'

3'-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦГТТАТЦТТЦГАААГТТАЦ-5'

Тема № 9

MAS-селекция и геномная селекция

Содержание темы:

В 1923 году в журнале «Genetics» была опубликована статья К. Сах'а, в которой автор привел данные по ассоциации размера семени фасоли (количественный признак) и пигментации семенной кожуры (качественный признак). Впервые было показано, как генетические факторы, влияющие на количественный признак, могут быть идентифицированы при помощи маркерного признака. Была представлена концепция поиска локусов количественных признаков с помощью сцепленных с ними маркеров, не получившая развития из-за отсутствия последних.

В начале 1980-х годов были созданы маркерные системы, которые позволили проводить прямое исследование ДНК различных организмов. 1980-90 годы считаются десятилетием создания карт сцепления и поиска локусов количественных признаков - QTL.

Что такое QTL? Большинство хозяйственно-полезных признаков, представляющих интерес для селекции, количественные (комплексные). Они детерминируются многими генами малого эффекта (полигенами) и в значительной степени подвержены воздействию факторов внешней среды. Аддитивная генетическая изменчивость этих признаков ~2-50%. Природа генов, лежащих в основе этой изменчивости, изучена плохо. Кроме того, смена лимитирующих факторов среды влечет за собой смену спектра генов, определяющих фенотипическую изменчивость признаков. Тем не менее, *предполагается* существование отдельных ключевых генов и/или групп сцепленных генов, которые при *любых* условиях приносят свой вклад в формирование количественного признака. Величина этого вклада регламентируется внешней средой. Именно такие генетические локусы принято обозначать термином «локус количественного признака» (*Quantitative Trait Loci*, **QTL**). По терминологии INTERBULL (International Bull Evaluation Service-международная организация, занимающаяся пересчетом племенного индекса одной страны в индекс других стран, Россия не входит в число стран-участниц этой организации), QTL'ли - это локусы, влияющие на фенотипическую вариацию признаков с непрерывной изменчивостью таких, как удой, привес, резвость, настриг шерсти, резистентность и т.д. QTL - это генетический локус, вариабельность которого на базе различных аллелей ведет к *статистически значимым* изменениям фенотипического проявления признака».

В основе картирования QTL лежат хорошо известные биологические явления: сцепление генов, их рекомбинация во время мейоза и полиморфность генома. Если расщепление по генетическому маркеру *статистически значимо* (достоверно) ассоциируется с изменениями количественного признака, то предполагается, что локус маркерного гена сцеплено наследуется с QTL (благодаря близкому расположению на хромосоме гена-маркера и гена-QTL). Картируя ген-маркер можно локализовать прилежащий к нему QTL. Если число маркеров, которые сцеплены с QTL, очень большое и они равномерно распределены по геному, то реально выявить все сайты с локализацией QTL.

Используя молекулярно-генетические методы, можно определить различия между животными по многим участкам генома (сайтам). Эти сайты можно рассматривать как локусы генов-маркеров. Сами по себе они, вероятно, не являются QTL, но могут быть сцепленными с QTL. Тем самым становится возможным картировать QTL, генотипировать животных и отбирать их непосредственно по генотипам, т.е. в рамках традиционных программ селекции проводить *содействующий* (уточняющий и/или дополняющий) отбор животных по генетическим маркерам (*Marker Assisted Selection, MAS*).

В основе картирования QTL лежат хорошо известные биологические явления: сцепление генов, их рекомбинация во время мейоза и полиморфность генома. Если расщепление по генетическому маркеру *статистически значимо* (достоверно) ассоциируется с изменениями количественного признака, то предполагается, что локус маркерного гена сцеплено наследуется с QTL (благодаря близкому расположению на хромосоме гена-маркера и гена-QTL). Картируя ген-маркер можно локализовать прилежащий к нему QTL. Если число маркеров, которые сцеплены с QTL, очень большое и они равномерно распределены по геному, то реально выявить все сайты с локализацией QTL.

Идентификация QTL - это первый этап MAS. Второй - поиск с использованием статистических моделей смешанного типа (например, BLUP-метод) таких QTL, действие которых было бы достаточно сильным, чтобы обусловить *дискретность*, различимую даже на фоне паратипической изменчивости и расщепления генов других локусов. Такие QTL можно изучать менделевскими методами и использовать в схемах MAS.

Например, в традиционных программах селекции ремонтных бычков получают от отцов и матерей быков с наилучшими оценками племенной ценности (*Estimated Breeding Value, EBV*). Ожидаемая EBV потомства

соответствует $\frac{1}{2}$ суммы EBV родителей. Действительная EBV потомства может отклоняться от прогнозируемой из-за недостаточно точной оценки EBV родителей по фенотипическим данным и, главным образом, из-за эффекта *расщепления*. Использование информации по маркерам QTL совместно с оценками EBV родителей дает возможность повысить эффективность заказного спаривания и последующего отбора ремонтных бычков. Однако для этого необходима очень детальная и объективная характеристика идентифицированных QTL как по числу аллелей, так и по их воздействию на количественный признак.

Эффективность MAS зависит от числа QTL и аллелей, их влияния на количественный признак и точности оценки этих эффектов. Для прогноза генотипа животных по количественным признакам и оценки эффектов QTL (аллелей) используются одни и те же фенотипические данные. Это делает возможным одновременное вычисление обоих генетических эффектов и конструирование единого критерия селекции на основе *комбинирования* информации по полигенам и маркерам QTL. Исследования показали, что использование таких критериев может повысить генетический прогресс на 8-30% и более.

На схемы MAS возлагались большие надежды. Ряд стран внедрились MAS для предселекции молодых бычков до их оценки по потомству. Однако результаты картирования QTL были часто неоднозначными. Сцепления, найденные одними авторами на определенном материале, часто не подтверждались другими исследователями при анализе других популяций]. Для промышленного животноводства было идентифицировано небольшое число важных генов. Из-за отсутствия маркеров, сцепленных с экономически важными признаками, коммерческое применение MAS было менее успешно, чем ожидалось.

Совершенствование методов молекулярной биологии и накопление фундаментальных знаний, наличие генетических карт высокой плотности для крупного рогатого скота, относительно дешевая технология микрочипов и развитие методологии генетической оценки животных делают возможной *геномную селекцию* (*Genomic Selection, GS*) в животноводстве.

Под GS подразумевают оценку *тотальной геномной племенной ценности* (*Total Genomic Breeding Value, TGBV*) и её использование при отборе животных.

GS обеспечивает унифицированную концепцию. Так как *весь* геном анализируется *одновременно*, то отпадает необходимость в идентификации QTL или генов. Методология TGBV предполагает, что

весь геном объясняет всю генетическую вариацию признака(-ов). Было показано, что с высокоплотными маркерами GS без фактического знания локализации мажорного (главного) гена так же эффективна, как MAS, в которой известна точная локализация мажорного гена. Поэтому, имея плотные маркерные карты, фенотипические данные и надлежащее аналитическое средство, можно рассчитывать TGBV животных *не идентифицируя* QTL или гены.

Точность отбора в традиционных программах селекции, применяемых на западе, уже, как правило, достаточно высокая. Но т.к. информацию о геноме можно получить у очень молодых животных (даже у эмбриона), то GS может быть мощным фактором воздействия на продолжительность генерационного интервала и, следовательно, на генетический прогресс. Это воздействие считается более важным, чем влияние на точность отбора. Существенное снижение генерационного интервала возможно даже при естественном воспроизводстве.

Чтобы внедрить GS, необходима референтная популяция для картирования QTL. В молочном скотоводстве обычно используют «внучатый проект». Один раз типировав по маркерам животных референтной популяции, GS может быть сразу же применена в базовой популяции по всем признакам. Это большой прорыв по сравнению с традиционной MAS, в которой ключевым является достоверно идентифицированный индивидуальный локус. Общая изменчивость и изменчивость, которая объяснялась идентифицированными QTL, были редуцированными. При GS непосредственно объясняется большая часть изменчивости всех признаков, без затрат времени на поиск QTL.

Таким образом, методы селекции, в которых применяются ДНК-маркеры, разделяют на две основные группы: ОПМ и геномная селекция.

ОПМ– отбор с помощью маркеров (MAS – markerassisted selection); синонимы: МАС (маркерассоциированная селекция) и МОС (маркеропосредованная/ориентированная селекция). Подход в современной селекции растений и животных, позволяющий проводить отбор по генотипу при использовании ДНКмаркеров, тесно сцепленных с селектируемым геном.

Геномная селекция (genomic selection). Метод современной селекции растений и животных, позволяющий при использовании равномерно распределенных по геному ДНК маркеров проводить отбор по генотипу в отсутствие данных о генах, влияющих на признак.

Метод ОПМ предполагает использование ДНК-маркеров, тесно сцепленных с целевым геном, вместо или вместе с фенотипическим анализом. Маркеры, тесно сцепленные с целевым геном, являются надежным инструментом для предсказания фенотипа. Отбор нужного аллеля целевого гена осуществляется на основе тесно сцепленного с ним аллеля соседнего маркерного локуса. Бóльшая точность отбора достигается при использовании пары маркеров, расположенных вблизи гена по разные стороны от него (т. е. маркеров, фланкирующих целевой ген). Если ген отсекуен и выявлены различия нуклеотидной последовательности разных аллелей данного гена, то можно разработать так называемый «внутригенный маркер». Использование такого маркера позволит отбирать нужные генотипы с наиболее высокой точностью. При отсутствии внутригенного или тесно сцепленного с геном ДНК-маркера можно использовать более отдаленные маркеры, однако в таких случаях целесообразно сочетать ОПМ с последующим фенотипированием. Такой комбинированный подход называется «тандемным» отбором (tanvem selection), или маркер-направленным фенотипированием (marker-directed phenotyping).

Для использования ДНК-маркеров в селекции по тому или иному признаку требуется информация о нуклеотидных последовательностях генов, контролирующих данный признак, или, по крайней мере, о локализации их в геноме, а также о тесно сцепленных с ними маркерах. Если исходные данные отсутствуют, то необходимые подготовительные исследования могут занять не один год. С целью экономии времени и средств можно проводить молекулярно-генетический анализ и отбор одновременно. Такой подход, сочетающий метод беккроссной селекции с QTL-анализом и отбором по генотипу.

Снижение стоимости секвенирования нуклеотидных последовательностей и развитие методов высокопроизводительного секвенирования открыли возможность массовой реализации программ полногеномного секвенирования.

Число видов растений и животных, геном которых полностью отсекуен (как модельных, так и тех, что используются в сельском хозяйстве), стремительно возрастает.

Секвенирование и сравнение генома разных представителей одного и того же вида (ресеквенирование генома) позволяют выявлять полиморфные участки генома и разрабатывать маркеры (как правило, SNP), равномерно и плотно покрывающие геном. К настоящему моменту разработаны полногеномные SNP-чипы для автоматического

анализа полиморфизма ДНК некоторых видов животных и растений, имеющих сельскохозяйственное значение. Внедрение методов высокопроизводительного генотипирования сельскохозяйственных объектов открыло путь для применения нового метода селекции, основанного на анализе большого числа ДНК-маркеров, равномерно распределенных по геному, – геномной селекции.

Помимо видов, чей геном уже отсеквенирован, появилась перспектива применения геномной селекции и в отношении тех видов растений и животных, геном которых еще не отсеквенирован или вовсе не изучен. Не так давно на примере пшеницы было продемонстрировано, что в геномной селекции может быть использован другой метод высокопроизводительного генотипирования – DArT-маркеры. DArT отличаются от SNP тем, что для их разработки не требуются данные по секвенированию генома.

Геномная селекция, как и ОПМ, подразумевает использование ДНК-маркеров и отбор по генотипу. Чем же геномная селекция принципиально отличается от ОПМ? Во-первых, для геномной селекции не требуются знания о генах, влияющих на признаки, а значит не нужны многолетние генетические исследования, предшествующие селекционному процессу. Во-вторых, геномная селекция имеет преимущество при отборе по признакам, имеющим сложный полигенный контроль, тогда как метод ОПМ, как правило, эффективен лишь в случае моно- или олигогенного контроля признаков. Тем не менее, если процесс геномной селекции приведет к нежелательной коселекции признаков (например, повышенной молочной продуктивности и предрасположенности к маститу у крупного рогатого скота), избежать дополнительных генетических исследований, подобных тем, что требуются для ОПМ, не удастся.

Процесс геномной селекции включает три этапа: анализ «тренировочных поколений» (training generations) с использованием методов фенотипирования и генотипирования, выявление корреляций между фенотипом и генотипом, дальнейший отбор по генотипу среди «кандидатов на селекцию» (selection candidates). Установлено, что с помощью ДНК-маркеров можно отбирать устойчивые генные сети, сохраняющиеся в поколениях. Однако необходимыми условиями для успешного осуществления геномной селекции являются адекватное количество тренировочных поколений, используемых маркеров и правильное соотношение числа маркеров и исследуемых генотипов. В настоящее время наиболее активно развиваются программы по

геномной селекции свиньи (организации TOPIGS в Нидерландах и INRA во Франции), крупного рогатого скота (INRA во Франции, КазАгроИнновация в Казахстане, Vicing Genetics в Дании и Швеции, LFL-LGL - Zuchtdata в Германии и Австрии, а также ряд компаний в США) и пшеницы (INTRA во Франции, CIMMYT в Мексике).

Экономическую выгоду от геномной селекции хорошо иллюстрируют данные по селекции крупного рогатого скота. Геномная селекция позволяет сэкономить до 92 % средств, затрачиваемых на оценку быков-производителей, и сократить время оценки с 6 лет до 1 года и 9 месяцев.

Геномная селекция – новое слово в селекционной работе с молочным скотом, позволяет получать достаточно точную племенную оценку уже при рождении животного. Это позволяет начать интенсивное использование производителей гораздо раньше и, благодаря сокращению интервала между поколениями, ускорить генетический прогресс.

Особенное значение геномная оценка имеет для показателей здоровья и плодовитости, так как надежность геномной оценки только немного уступает надежности оценки этих показателей по качеству потомства.

Вопреки бытующему мнению, геномная селекция не призвана уменьшить значение оценки дочерей и зоотехнического учета. Конечно, в перспективе в качестве активно используемых производителей все больше будут встречаться быки с геномной оценкой, без собственных дочерей. Что собственно и наблюдается в мире на сегодняшний день. Однако, поскольку геномная оценка проводится на основе племенной оценки, полученной «традиционными методами», учет данных дочерей приобретает иной смысл – пополнение и обновление базы референтной популяции для еще более точной геномной оценки будущих поколений.

Особый интерес представляет тестирование генома маточного поголовья. Геномная оценка телки проводится по тем же параметрам, что и бычка, но по функциональным показателям она будет во много раз более надежной, чем фенотипическая оценка взрослой коровы со многими отелами. Это позволит еще точнее и интенсивнее проводить отбор ремонтных телок и подбор матерей быков. Более того, тестирование маточного поголовья усилит надежность оценки при включении этих данных в референтную популяцию.

Вопросы для самоконтроля:

1. QTL-локусы количественных признаков. Характеристика.
2. Индексы племенной ценности отдельных признаков ЕВР в комплексной

оценке племенных животных.

3. Использование BLUP-индексов. Эффективность BLUP при селекции.
4. Генотипирование по QTL, главным генам и на носительство рецессивных мутаций.
5. Идентифицированные QTL сельскохозяйственных животных.
6. Изучение QTL-менделевскими методами.
7. Принципы традиционной селекции количественных признаков.
8. Маркер-зависимая и ген-зависимая селекция.
9. Основные этапы MAS-селекции.
10. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP).
11. Технология биочипов.
12. ДНК-биочипы. Олигонуклеотидные биочипы. Работы А. Мирзабекова.
13. Белковые, клеточные, тканевые биочипы
14. Рынок биочипов. Применение в зоотехнии.
15. Зарубежные и отечественные производители биочипов: Affimetrix, Bovigen, Illumina, Микрочип.
16. Различия в селекции по ДНК-маркерам и маркерным генам.
17. Преимущества селекции по генетическим маркерам по сравнению с традиционной селекцией.
18. Оценка тотальной геномной племенной ценности.
19. Геномная селекция (GS-Genomic Selection).
20. Точность отбора в традиционных программах селекции и при GS.
21. Анализ генетической структуры стад и контроль селекционного процесса.
22. Создание банка ДНК сельскохозяйственных животных.

Варианты индивидуальных заданий

Вариант 1.

Задание 1.

Локусы количественных признаков у сельскохозяйственных животных.
(Quantitative Trait Loci, QTL)

Задание 2.

Имеются последовательности двух фрагментов ДНК, выделенных из организмов разных видов.

1) 5'-АГЦАТАЦТГТГААТТЦАЦА-3' 2) 5'-АТГААТТЦТТАГЦАТАЦ-3'
3'-ТЦГТАТГАЦАЦТТААГТГТ-5' 3'-ТАЦТТААГААТЦГТАТГ-5'

С помощью каких ферментов можно получить гибридную молекулу ДНК из этих фрагментов? Опишите последовательные этапы получения гибридной молекулы..

Вариант 2.

Задание 1.

Отбор животных по генетическим маркерам (Marker Assisted Selection, MAS).

Задание 2.

Гаплоидный геном содержит около 3×10^9 нуклеотидных пар (н.п.) ДНК. Если вы порежете ДНК рестрикционным ферментом EcoRI, узнающим гексамерную последовательность ГААТТЦ, то сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

Вариант 3.

Задание 1.

Геномная селекция (Genomic Selection, GS). Оценка тотальной геномной племенной ценности

Задание 2.

Рестрикционный фермент HindIII разрезает ДНК по последовательности ААГЦТТ. Насколько часто этот фермент будет разрезать двухцепочечную ДНК? (Иными словами, какова средняя длина фрагментов разрезанной ДНК?).

Вариант 4.

Задание 1.

Использование молекулярно-генетических маркеров при оценке репродуктивных качеств свиней

Задание 2.

Фрагмент бактериальной ДНК длиной 5 килобаз имеет один сайт рестрикции для фермента EcoRI и два сайта для BamI. Как будет выглядеть электрофореграмма после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК обработанной только EcoRI, только BamI, а также смесью этих двух рестриктаз?

Темы докладов, сообщений

1. Генно-инженерные системы бактерий.
2. Генно-инженерные системы дрожжей.
3. Полимеразная цепная реакция. Амплификация ДНК с помощью ПЦР.

4. Полимеразная цепная реакция. Амплификация РНКпомощью ПЦР.
5. Молекулярно клонирование ПЦР-продуктов.
6. Секвенирование ДНК. Методы секвенирования. Использование нерадиоактивных меток при секвенировании.
7. Ферменты рестрикции и получение гибридной ДНК
8. Анализ и использование фрагментов ДНК (ДНКовых последовательностей)
9. Вектора –специальные устройства для доставки чужеродных генов в различные организмы.
10. Фаговые и космидные вектора и создание геномных библиотек
11. Генная дактилоскопия и полный сиквенс (прочтение) нуклеотидных последовательностей ДНК
12. Биологическая природа многоплодия свиней и ее связь с продуктивностью
13. Маркер-зависимая селекция и молекулярно-генетические маркеры
14. Маркер-зависимая селекция и геномная селекция.
15. Биочипы. Классификация. ДНК-овые биочипы.
16. Биочипы. Значение работ А. Мирзабекова в развитии технологии микроэлектроник.
17. Генетические маркеры в селекции животных
18. Молекулярно-генетические маркеры
19. Генетические карты сельскохозяйственных животных
20. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
21. Ген эстрогенового рецептора. Анализ полиморфизма гена эстрогенового рецептора свиней
22. Популяционно-генетический анализ гена эстрогенового рецептора у исследуемых пород свиней
23. Генетические основы стресс-синдрома у свиней.
24. Ген риадинового рецептора . Анализ полиморфизма гена риадинового рецептора свиней
25. Изучение аллельного полиморфизма в родственных группах сельскохозяйственных животных
26. Проблемы получения резистентных к заболеваниям животных
27. Разработка методов трансгеноза генов резистентности к заболеваниям высокопродуктивным животным.

28. Становление принципов маркер-зависимой селекции. Значение работ А.С. Серебровского.
29. BLUP-оценка сельскохозяйственных животных.
30. Эффективность BLUP при селекции производителей по жизнеспособности потомства.

Список вопросов для подготовки к зачету

1. Классическое определение гена.
2. Молекулярная природа гена.
3. Генетический код и его свойства.
4. Строение гена высших животных.
5. Сплайсинг. Механизмы сплайсинга.
6. Понятие оперона.
7. Методы регуляции экспрессии генов у бактерий.
8. Методы регуляции экспрессии генов у высших организмов.
9. Мобильные генетические элементы.
10. Природа генетического полиморфизма.
11. Эффективность искусственного осеменения в селекции животных
12. Инновационные технологии искусственного осеменения
13. Регулирование пола
14. Пересадка эмбрионов
15. Получение генетических мозаиков (химер)
16. Клонирование животных
17. Возможности генной инженерии.
18. Перспективы генной инженерии.
19. Уменьшение риска, связанного с генными технологиями
20. Анализ структуры гена.
21. Молекулярные методы выявления мутаций.
22. Строение хромосомы. Кариотип.
23. Основные типы хромосомных перестроек.
24. Современные методы анализа хромосом.
25. Гибридизация *in situ* в генетических исследованиях.
26. Фенотипическое проявление нарушений хромосомного набора.
27. Этиология хромосомных мутаций.
28. Понятие генетического маркера.
29. Типы маркеров и их характеристика
30. Различия в селекции по ДНК- маркерам и маркерным генам.

- 31.Преимущества селекции по генетическим маркерам перед традиционной селекцией.
- 32.Анализ генетического сходства.
- 33.Генетическая сертификация животных.
- 34.Роль хромосомной теории в маркерной селекции.
- 35.Метод сигналей А.С. Серебровского.
- 36.Понятие маркера.
- 37.Маркирование на основе сцепление генов.
- 38.Условная плеiotропия.
- 39.Аллелосила и алелобаланс.
- 40.Маркирование на основе плеiotропного действия генов.
- 41.Использование главных генов.
- 42.Функциональные и позиционные гены-кадидаты.
43. Маркер-зависимая и ген-зависимая селекция.
44. Геномная селекция

СПИСОК ОСНОВНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чхенкели В.А. Биотехнология : учебное пособие для студентов высших аграрных учебных заведений. - Санкт-Петербург : Проспект Науки, 2014. - 336 с.
2. Сазанов, А. А. Генетика [Электронный ресурс] : учеб. рос. / А. А. Сазанов. - СПб.: ЛГУ им. А. С. Пушкина, 2011. - 264 с. - Режим доступа: <http://www.znanium.com/>.
3. Применение молекулярных методов исследования в генетике: Учебное пособие / Л.Н. Нефедова. - М.: НИЦ Инфра-М, 2012. - 104 с. - Режим доступа: <http://www.znanium.com/>.

СПИСОК ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никульников В.С. Биотехнология в животноводстве: учеб. Пособие для студ. по спец. «Зоотехния»/В.С. Никульников, В.К. Кретин – М.: Колос, 2007. -534 с.
2. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика / И.Ф. Жимулев.– Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003. – 458 с.
3. Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Проблемы биотехнологии и селекции сельскохозяйственных животных// Дубровицы, ВИЖ, 2006, - 316 с.
3. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник для студ. вузов, обуч. по с.-х., естественнонауч. и пед. спец.и магистерским прогр. / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин и др. ; под ред. В. С. Шевелухи. - 2-е изд., перераб. и доп. - М. : Высш. шк., 2003. - 469 с
- Петухов В.Л. и др. Генетика// В.Л. Петухов, О.С. Короткевич, С.Ж. Стамбеков и др.- Новосибирск: СемГПИ, 2007. – 628 с.
- Брем Г., Кройслих Х., Штранцингер Г. Экспериментальная генетика в животноводстве: основы методов в биотехнологии// М.:Россельхозакадемия,, 1996, – 326 с.
6. Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А., Каплинская Л.И., Брем Г., Мюллер М. Методические рекомендации по молекулярно-генетическому анализу овец с использованием микросателлитных маркеров / Е.А.Гладырь [и др.] М.; РАСХН;. 2004, – 31 с.
7. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение /Б. Глик, Д. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
- 8.Биотехнология. Принципы и применение / под ред. И. Хингинса,Д. Беста и Дж. Джонсона. – М. : Мир, 1998. – 480 с.

9. Кахикало, В.Г. Практикум по разведению сельскохозяйственных животных/ В.Г. Кахикало, Н.Г. Педеина, А.В. Степанов, / Курган: ФГБОУ КГСХА, 2010.- 249 с.
10. Кахикало, В.Г. Практикум по племенному делу в скотоводстве/ В.Г. Кахикало, З.А. Иванова, Т.Л. Лещук, Н.Г. Предеина/ СПб.: Издательство «Лань», 2010.- 288 с.
11. Кочнева М.Л. Мониторинг популяций сельскохозяйственных животных в разных экологических условиях/: автореф. дис....д-ра биол.наук.- Новосибирск, 2005. - 41 с.
12. Патрушев, Л. И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. – М. : Наука, 2005. – Т. 1.
13. Сельскохозяйственная биотехнология : учеб. / под ред. В.С. Шевелухи. – М. : Высш. шк., 2003. – 469 с.
14. Сельскохозяйственная биотехнология. Избранные работы / под ред.В. С. Шевелухи. – М. : Евразия+, 2000. – 264 с.
15. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, С. В. Калашникова, Е. З. Кочиева [и др.]. – М. : Высш. шк., 1998. – 416 с.
16. Себежко О.И. Эколого-ветеринарная генетика / О.И. Себежко, В.Л. Петухов. - Новосибирск: НГАУ, 2006. - 187 с.
17. Петухов В.Л. Ветеринарная генетика/В.Л. Петухов, А.И. Жигачёв, Г.А. Назарова. -2-е изд., перераб. и доп. -М.: Колос, 1996. -384 с.
18. Панов Б.Л. Проблемы селекции сельскохозяйственных животных/Б.Л. Панов, В.Л. Петухов и др. - Новосибирск: Наука. Сиб. предпр. РАН, 1997. -283 с.
19. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия / С. Н. Щелкунов ; Новосибир. гос. ун-т. – Новосибирск, 2004. – 496 с.
20. Эрнст, Л. Молекулярно-генетические аспекты в создании и использовании трансгенных сельскохозяйственных животных / Л. Эрнст, Н. Зиновьева // Вестник РФФИ. – 2002. – № 3.
21. Цитогенетический контроль племенных животных: Метод. рекомендации/Новосиб. с.-х. ин-т; сост.: Парамонов Е.В., Петухов В.Л., Горбунов А.М. и др. -Новосибирск, 1989.
22. Эрнст, Л.К. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных/ Л.К. Эрнст, Н.И. Сергеев. – М.: Агропромиздат, 1989. – 302 с.

23. Niemann, H. Transgenic farm animals: an update / H. Niemann, W. Kues
// Reproduction, fertility and development. – 2007. – V. 19. – P. 762–770.

Информационное обеспечение

1. Российская федерация. федеральный закон о племенном животноводстве (Принят Государственной Думой 12 июля 1995года)
<http://www.informika.ru/text/goscom/normdoc/r01/01271.html>
2. Сертификат на продукцию генной инженерии /
http://cmmp.ru/page.aspx?id_page=861
3. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. Молекулярно-генетические аспекты в создании и использовании трансгенных сельскохозяйственных животных / http://www.rfbr.ru/default.asp?doc_id=5805
4. European communities (certification of animals and animal products) regulations, 1999 / <http://faolex.fao.org/docs/texts/ire54449.doc> — правила сертификации продукции животного происхождения Евросоюза
5. Animal Export Certification Application forms, Information and Notes for Guidance to facilitate the export of animals / <http://www.dardni.gov.uk/index/animalhealth/animal-export-certification.htm> — сайт отдела развития сельского хозяйства и сельских регионов Великобритании
6. <http://webfermer.narod.ru/marker.htm> — сайт для фермеров
7. http://humbio.ru/humbio/tarantul_sl/00000c80.htm — база знаний по биологии
8. <http://www.biotech.iastate.edu/publications/mendel/ModuleIIP1.pdf> — биотехнологический образовательный портал государственного университета Айовы.

Словарь терминов.

Аберрация хромосомная – тип мутации, в результате которой происходит нарушение структуры хромосомы.

Авторадиография - метод, позволяющий выявить локализацию ДНК-зондов с радиоактивной меткой с помощью фоточувствительной пластины.

Агрегация морул - метод соматической гибридизации, заключающийся в объединении эмбрионов разных организмов на стадии ранней морулы.

Адаптор – транспорт молекулой тРНК аминокислоты к мРНК, во время трансляции.

Адаптация. Морфологический или функциональный признак организма, позволяющий ему лучше приспособиться к условиям существования; эволюционный процесс, посредством которого организмы приспосабливаются к окружающей среде.

Адаптивное значение. Мера успешности размножения одного организма (генотипа) по сравнению с другими организмами (генотипами); синоним – *селективное значение*.

Адаптивная радиация — возникновение эволюционного разнообразия среди видов, происходящих от общего предка, но расселившихся по разным экологическим нишам.

Аденогипофиз - передняя часть гипофиза, в которой происходит синтез гонадотропного гормона.

Аддитивные гены - Гены взаимодействующие друг с другом при определении признака, но не проявляющие ни доминирования (если они аллельны), ни эпистаза (если они находятся в разных локусах).

Аддитивная варианса. Генетическая варианса, обусловленная действием аддитивных генов.

Аддитивная варианса. Генетическая варианса, обусловленная действием аддитивных генов.

Азотистые основания - основания входящие в состав нуклеиновых кислот.

Акклимация — обратимое изменение в морфологии или физиологии организма, возникающее в ответ на изменение в окружающей среде.

Акросома - органелла в сперматозоиде, расположенная в передней части головки и содержащая ферменты, растворяющие прозрачную оболочку яйцеклетки при оплодотворении.

Аксонема - органелла сперматозоида, расположенная в шейке и обеспечивающая движение хвостика.

Аллель – Одна из двух или большего числа альтернативных форм гена, каждой из которых свойственна уникальная последовательность нуклеотидов. Однако обычно различные аллели данного гена распознают по их фенотипическому проявлению, а не путем сравнения нуклеотидных последовательностей.

Аллоферменты (аллозимы). Альтернативные формы ферментов, кодируемые различными аллелями одного и того же локуса.

Аллотипы – генетически детерминируемые антигенные варианты сывороточных белков, по которым различаются особи одного вида

Аллотетраплоид - особи имеющие диплоидный набор хромосом двух видов.

Амбер-кодон - триплет УАГ в РНК, один из трех бессмысленных кодонов, обуславливающих терминацию белкового синтеза.

Амбер-мутация - любое изменение в ДНК, приводящее к появлению амбер-кодона.

Амейоз (нем. Ameiose; англ. ameiosis) - выпадение мейоза и его замена эквационным делением ядра.

Аминокислоты. Соединения, из которых построены молекулы белков. Всего известно несколько сотен аминокислот, однако в состав белков обычно входит лишь 20 из них .

Амитоз (нем. Amitose; англ. amitosis) (Flemming, 1882 г) - в отличие от непрямого (митоз), прямое деление ядра.

Аммонификация — расщепление белков и аминокислот, при котором в качестве побочного продукта выделяется аммиак.

Амплификатор - прибор для клонирования фрагментов ДНК ПЦР- методом.

Амплификация - образование дополнительных копий хромосомных последовательностей, обнаруживаемых в хромосомной или внехромосомной ДНК, увеличение числа копий определённого фрагмента ДНК.

Ампуло-истмическое соединение - место в яйцеводе, где происходит встреча яйцеклетки и сперматозоида и оплодотворение.

Анализирующее скрещивание - скрещивание с рецессивной родительской формой (*aa*)

Андрогенез - мужской партеногенез. После оплодотворения яйцеклетки материнское ядро элиминируется, и возникающий гаплоидный организм, который называется андрогенетическим, содержит только хромосомный набор отца.

Андрогены

Антигены - инородные вещества проникшие в организм, которые вызывают иммунный ответ (реакцию) синтез антитела.

Антикодон - триплет, занимающий определенное и постоянное положение в структуре молекулы тРНК; комплементарно взаимодействует с кодоном (или кодонами) мРНК.

Антитело. Белок, вырабатываемый иммунной системой высших организмов, который специфическим образом связывает молекулы чужеродных веществ (антигены). Синтез антител начинается в ответ на появление в организме антигенов.

Антимутагены - агенты, обладающие способностью понижать частоту спонтанных или индуцированных мутаций.

Антисмысловая РНК - участок РНК, комплементарный участку или всей м-РНК вируса и служащий для блокирования трансляции.

Анеуплоидия – изменение числа хромосом, не кратное гаплоидному набору, вследствие утраты или добавления одной или нескольких хромосом.

Антральный фолликул - фолликул, имеющий полость (антрум) и способный усваивать фолликулостимулирующий гормон гипофиза.

Ассортативное (преимущественное) скрещивание. Неслучайный выбор брачного партнера в отношении какого-то одного или нескольких признаков. Ассортативное скрещивание положительно (отрицательно), когда частота скрещиваний между сходными (различающимися) особями больше, чем можно было бы ожидать при случайном выборе (ср. *Случайное скрещивание*)

Атрезия - процесс дегенерации, прекращения развития фолликула

Аутбридинг. Скрещивание между генетически различными, а не близкородственными особями.

Аутосомы – все хромосомы, кроме половых; в диплоидной клетке имеется по две копии каждой аутосомы.

Базиген – нормальный аллель серии множественных аллелей.

Бактериофаги (фаги) – вирусы, инфицирующие бактерии.

Белок. Полимер, состоящий из одной или нескольких полипептидных субъединиц и обладающий характерной трехмерной структурой, определяемой последовательностью входящих в его состав аминокислотных остатков.

Белковая инженерия — направление в генетической инженерии, которая занимается созданием неприродных форм белков на основе видоизмененных генов.

Белок-репрессор – способен связываться с оператором на ДНК или с РНК, предотвращая соответственно транскрипцию или трансляцию.

Бессмысленный кодон – один из трех триплетов, УАГ, УАА, УГА, вызывающих терминацию синтеза белка (УАГ известен как amber-кодон, УАА – как ochre-кодон, УГА – как opal-кодон).

Библиотека генома – набор клонированных фрагментов ДНК, содержащий весь геном.

Биоинформатика - область науки, разрабатывающая и применяющая вычислительные алгоритмы для анализа, и систематизации генетической информации с целью выяснения структуры и функции макромолекул.

Биометрия – наука о приложении математических методов для изучения живых организмов.

Биоразнообразие – все виды растений, животных, микроорганизмов, а также экосистемы и экологические процессы, частью которых они являются.

Биотехнология – комплексная многопрофильная область научно-технического прогресса, включающая разнообразный микробиологический синтез, генетическую и клеточную инженерию, инженерную энзимологию,- использование знаний условий и последовательности действия белковых ферментов в организме растений, животных и в промышленных реакторах.

Бла I, II, III, IV.- обозначение стадии бластоцисты эмбриона в возрасте от 7 до 12 дней.

Бластомеры - клетки ранних эмбрионов.

«Бутылочное горлышко». Период, когда популяция состоит всего из нескольких особей.

Варианса (дисперсия). Мера изменчивости, вычисляемая по сумме квадратов разностей между индивидуальными значениями признака и средним по выборке.

Васкуляризация - процесс прорастания кровеносных капилляров в клеточной массе желтого тела.

Ведущая цепь – цепь ДНК, синтезирующаяся непрерывно в $5' \rightarrow 3'$ направлении.

Вектор для клонирования – любая плаزمиды или фаг, в которые может быть встроена чужеродная ДНК с целью клонирования.

Вектор интегративный - вектор, способный встраиваться в геном клетки-реципиента.

Веретено – структура, образующаяся в процессе деления эукариотической клетки; после растворения ядерной оболочки к веретену с помощью микротрубочек прикрепляются хромосомы.

Ветеринарная генетика – наука, изучающая наследственные аномалии и болезни с наследственной предрасположенностью, разрабатывающая методы диагностики, генетической профилактики и селекции животных на устойчивость к болезням.

Вид — группа фактически или потенциально скрещивающихся между собой популяций, которые репродуктивно изолированы от всех других организмов.

Видообразование. Процесс образования видов.

Вирулентность – степень патогенности в отношении животных определенного вида.

Витальное окрашивание — метод оценки качества эмбрионов с помощью красителей.

Витрификация - переход жидкости в стеклообразное состояние без образования кристаллической решетки при сверхбыстром охлаждении

Внутривидовая конкуренция — конкуренция между особями, принадлежащими к одному и тому же виду.

Водородные химические связи – химической связи между комплементарными азотистыми основаниями в молекуле ДНК, образующие вторичную структуру ДНК.

Воздушный баллончик- устройство на катетере для вымывания эмбрионов, с помощью которого происходит фиксация катетера в роге матки.

Восприимчивость – предрасположенность организма к действию физических, химических и биологических факторов, приводящих к патологическому состоянию.

Время генерации — средний возраст, в котором самка приносит потомство.

Врождённая аномалия – отклонение, имеющееся при рождении.

Вставки (инсерции) – обнаруживаются благодаря присутствию в ДНК дополнительных пар оснований.

Второе мейотическое деление яйцеклетки — происходит в момент оплодотворения яйцеклетки, в результате чего овоцит второго порядка делится на зрелую яйцеклетку и второе направительное тельце

Вторичное отношение полов. См. *Отношение полов.*

Второе направительное тельце - клетка в тетраде женских гамет, образующаяся в результате деления овоцита второго порядка

Выживаемость — доля новорожденных особей, доживших до определенного возраста.

Вырожденность генетического кода – соответствие нескольких кодонов одной аминокислоте. Замена в третьем основании кодона не всегда приводит к замене аминокислоты.

Выщелачивание — вымывание растворимых соединений из органических остатков или из почвы.

Гамета – Зрелая репродуктивная клетка, способная при слиянии с аналогичной клеткой другого пола образовать зиготу и содержащая гаплоидный набор хромосом.

Гаметогенез – процесс развития половых клеток.

Гаплоидный набор хромосом – содержит по одной копии каждой аутосомы и одну половую хромосому; гаплоидное число хромосом (n) является характеристикой гамет.

Гаплотип – совокупность сцепленных генов одной хромосомы, контролирующей аллогруппу.

Гемизиготность – наличие в хромосомном наборе особи только одной аутосомы из пары гомологичных аутосом, одной половой хромосомы (ХО) или пары разных половых хромосом (ХУ).

Гемизиготный ген. Ген, присутствующий в генотипе лишь в одном экземпляре (копии).

Гемизиготные особи - организмы имеющие ген, аллель только в одной из пары гомологичных хромосом, в частности, трансгенные животные первого поколения, при введении трансгена в пронуклеус зиготы.

Ген - Последовательность нуклеотидов в геноме организма, которой может быть приписана определенная функция, иными словами, ген – это нуклеотидная последовательность, либо кодирующая полипептид, либо определяющая ту или иную транспортную РНК, либо необходимая для правильной транскрипции какого-то другого гена.

Генеративные мутации – мутации, происходящие в половых клетках.

Генетика – наука о наследственности и изменчивости живых организмов.

Генетическая аномалия - морфофункциональное нарушение в организме животного, возникающее в результате генных или хромосомных мутаций.

Генетическая варианса. Доля фенотипической вариансы, обусловленная различиями в генетической организации особей в популяции.

Генетический груз - совокупность вредных генных и хромосомных мутаций.

Генетический дрейф. См. *Случайный генетический дрейф*.

Генетический код - совокупность кодонов (триплетов), кодирующих аминокислоты.

Генетический полиморфизм - долговременное существование в популяциях двух и более генотипов с частотой (1% и более), превышающих вероятность возникновения повторяющихся мутаций.

Генетическая трансформация - явление переноса генетической информации от одной клетки к другой у микроорганизмов.

Ген-модификатор. Ген, который при взаимодействии с другими генами изменяет их фенотипическое проявление.

Генная инженерия - раздел биотехнологии, связанный с целенаправленным конструированием *in vitro* новых комбинаций генетического материала, способного размножаться в клетке и синтезировать определенный продукт.

Генные (точковые) мутации - изменения в структуре ДНК.

Генный баланс - соотношение и взаимодействие всех генов, влияющих в той или иной степени на признак.

Геном - 1. Полный гаплоидный набор генов или хромосом клетки или организма. 2. Весь генетический материал клетки, организма.

Геномика – раздел молекулярной генетики, изучающий геном, индивидуальные гены на молекулярном уровне, структуру (сиквенс) гена, его экспрессию и механизм редукции активности, клонирование генов и использование их в генно-инженерных целях

Геномные мутации – мутации, обуславливающие изменения числа хромосом в кариотипе.

Геномная дактилоскопия - метод идентификации индивидуума, основанный на определении специфической последовательности его ДНК

Генотерапия - метод лечения, основанный на генетической трансформации клеток или тканей пациента последовательностью ДНК, компенсирующей врожденное нарушение

Генотип - Вся генетическая информация, содержащаяся в организме; генетическая организация особи в одном или нескольких рассматриваемых локусах (ср. *Фенотип*); совокупность генов организма.

Генотипическая среда - комплекс генов организма, в котором происходит действие изучаемого гена.

Генофонд - совокупность аллелей (генов) одной популяции (породы и т.д.), характеризующихся определенной частотой.

Гены-модификаторы - гены, не проявляющие собственного действия, но усиливающие или ослабляющие эффект действия других генов.

Ген-эквивалент - участок ДНК, содержащий последовательность, кодирующую зрелую форму белка.

Гермафродит - особь, имеющая гонады и (или) половые органы противоположного пола.

Гетерогаметный пол - Пол, образующий гаметы двух типов, в которых содержится по одной из двух различных половых хромосом; характеризуется хромосомным набором $2A+XY$.

Гетерогамные скрещивания. Скрещивания между особями, взятыми из различных популяций вида.

Гетерозигота - диплоидный организм, в гомологичных хромосомах которого находятся две разные аллели данного гена (Aa).

Гетерозиготность. Доля особей, гетерозиготных по данному локусу, или доля гетерозиготных локусов в генотипе особи.

Гетерозис - гибридная мощность, превосходство гибридов в отношении какого-то одного или по ряду признаков над обеими родительскими формами; синонимы: *гибридная сила* и *гибридная мощность*.

Гибридизация нуклеиновых кислот — метод поиска нужных генов ил и фрагментов ДНК в библиотеке с помощью ДНК-зонда, основанный на свойстве денатурации-ренатурации ДНК.

Гетерохроматин - генетически неактивные участки хромосом постоянно находятся в конденсированном состоянии.

Гибридизация - процесс взаимодействия комплементарных цепей РНК и ДНК, образующих гибрид РНК – ДНК.

Гибридома - клеточный гибрид, получаемый слиянием нормального лимфоцита, продуцирующего антитела, и опухолевой клетки; обладает способностью синтезировать моноклональные антитела.

Гиперактивация - процесс увеличения двигательной активности сперматозоидов.

Гипофиз - железа внутренней секреции, расположенная в головном мозге, в которой происходит образование гонадотропного и соматотропного гормонов.

Гистоны - белки, образующие в комплексе с ДНК нуклеосомы – структурные единицы хроматина в ядрах эукариот.

Гликопротеиды - сложные белки, содержащие углеводные компоненты.

Гомеостаз - внутреннее постоянство организма.

Гомогаметный пол - характеризуется хромосомным набором 2А + XX.

Гомогамные скрещивания. Скрещивания между особями одной и той же популяции или вида.

Гомозигота - Клетка (или организм), содержащая в данном локусе гомологичных хромосом одинаковые аллели. (АА, аа).

Гомологи - хромосомы, имеющие одинаковые генетические локусы; диплоидная клетка обладает двумя копиями каждого гомолога, по одной от каждого родителя.

Гомозиготность. Доля особей, гомозиготных по данному локусу, или доля гомозиготных локусов в генотипе особи.

Гомологичные хромосомы. Хромосомы или участки идентичные в отношении последовательности локусов и видимой структуры; в процессе эволюции возникают также гомологичные гены и различные структуры, сходные между собой в силу их происхождения от общего предка.

Граафов пузырь - конечная преовуляторная стадия развития фолликула.

Гоносомы – половые хромосомы (Х или Y).

Гормезис – эффект действия радиации в малых дозах, проявляющийся в адаптивном ответе, стимуляции пролиферации, активации разных биологических процессов.

Гранулеза - внутренние клетки фолликула, синтезирующие эстрогены.

График серийного замещения — график, выражающий исход конкуренции между двумя видами в экспериментах, в которых изначальное соотношение этих видов было различным.

Дарвиновская приспособленность. Относительная приспособленность одного генотипа по сравнению с другим, оцениваемая по его вкладу в следующие поколения.

Двунаправленная репликация - репликация, при которой две репликационные вилки движутся в противоположных направлениях от общего старта.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Полинуклеотид, содержащий в качестве углеводного остатка дезоксирибозу; представляет собой основной генетический материал всех клеток.

Делеция – хромосомная мутация, в результате которой определенная последовательность нуклеотидов утрачивается (ср. *Дупликация*).

Дезоксирибонуклеотид - химическое вещество, являющееся мономером полимерной молекулы ДНК. Существует 4 типа нуклеотидов, входящих в состав ДНК

Денатурация ДНК или РНК - переход этих молекул из двухцепочной формы в одноцепочную; разделение цепей наиболее часто достигается нагреванием.

Дендриты - кристаллы льда разветвленной, древовидной формы, образуются при медленном охлаждении жидкости?

Дидезоксисеквенирующий гель - гелевая пластина, в которой происходит разделение фрагментов ДНК методом электрофореза при секвенировании методом Сэнгера.

Дигибридное скрещивание - скрещивание, при котором у родителей учитывается два признака, контролируемых двумя локусами.

Диплоид – организм или клетка с двойным ($2n$) набором хромосом.

Дискордантность - проявление признака только у одного из близнецов.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) – биологическая макромолекула, носитель и хранитель генетической информации. См. *Дезоксирибонуклеиновая кислота*.

Динеин - белок, расположенный в шейке сперматозоида, обеспечивающий его двигательную функцию.

Дисекция - метод клонирования, заключающийся в разделении эмбрионов на половинки.

Диэструс - стадия полового цикла самок при которой в яичнике функционирует желтое тело, в эту же стадию полового цикла проводится суперовуляторная обработка коров-доноров.

Диэструс - стадия полового цикла, при которой в яичнике функционирует желтое тело.

Домен в молекуле белка - участок аминокислотной последовательности, связанной с определенной функцией.

Доминирование - проявление действия лишь одного из аллелей у гетерозиготного организма.

Дрейф генов (генетико-автоматические процессы) - изменение генетической структуры численно ограниченной популяции в результате действия случайных причин.

Дупликация – абберация, при которой удвоен какой-либо участок хромосомы.

Дыхание — использование кислорода для метаболического разрушения органических соединений с целью извлечения заключенной в них химической энергии.

ДНК-зонд - короткий фрагмент ДНК с радиоактивной меткой, комплементарный участку какого-либо гена, служащий для поиска нужной последовательности ДНК.

ДНК-полимераза - фермент, способствующий синтезу цепи ДНК на ДНК-матрице, обеспечивает функцию репликации и репарации в клетке.

Доминантный фолликул - крупный растущий фолликул, улавливающий большее количество ФСГ.

Донор - самка, от которой получают эмбрионы.

Естественный отбор — изменение частоты генетических признаков в популяции в результате избирательного выживания и размножения особей, обладающих этими признаками.

Жизненная форма — характерное строение животного или растения.

Заболеваемость - частота заболеваний в популяции или болезненность, болезненное состояние.

Заболевание – возникновение болезни.

Зависящие от плотности факторы — факторы, влияние которых на особей, составляющих популяцию, изменяется с изменением плотности популяции.

Закон Харди-Вайнберга. Принцип, согласно которому частоты генотипов могут быть предсказаны по частотам аллелей при условии случайного скрещивания.

Зигота - оплодотворенная яйцеклетка; образуется в результате слияния двух гамет. Диплоидная клетка.

Желтое тело- Железа внутренней секреции, образующаяся на месте фолликула после овуляции, вырабатывает ряд гормонов, обеспечивающих имплантацию эмбриона, течение беременности.

Зародышевый диск- скопление эмбриональных клеток на желтке яйца у птиц из которых развивается эмбрион и куда вводится ДНК при генетической трансформации птиц.

Зигота - оплодотворенная яйцеклетка.

Зона пеллюцида (прозрачная оболочка)- оболочка, окружающая яйцеклетку и эмбрион на ранних стадиях развития.

Идентичные по происхождению гены. Два гена, имеющие одинаковые нуклеотидные последовательности в силу того, что оба происходят от общего предка.

Идиотипы - антигенные различия между антителами, принадлежащими к одному классу, субклассу и аллотипу у отдельных особей.

Идентичные по структуре гены. Два гена, имеющие одинаковые нуклеотидные последовательности независимо от того, происходят они от общего предка или нет.

Индифферентные методы оценки - группа методов оценки качества эмбрионов, не оказывающих влияние на его жизнеспособность, в частности, морфологическая оценка качества эмбрионов.

Изменчивость – свойство живых систем приобретать новые признаки, отличающие их от родительских форм.

Изотип - группа близкородственных иммуноглобулиновых цепей.

Иммунитет - невосприимчивость организма к инфекционным агентам и генетически чужеродным веществам антигенной природы.

Иммунная реакция - адаптивный ответ организма, вызывающий разрушение, нейтрализацию, отторжение или уничтожение генетически чужеродных веществ (бактерии, вирусы, простейшие и т.д.).

Иммунная система организма - совокупность всех лимфоидных клеток, обеспечивающих реализацию реакции иммунитета.

Иммунный ответ (иммунологическая реактивность) - высокоспецифическая форма реакции организма на чужеродные вещества (антигены).

Имуногенетика - наука, изучающая генетический контроль иммунного ответа, генетику несовместимости тканей при их пересадках, закономерности наследования антигенной специфичности, проблему поддержания генетического гомеостаза соматических клеток организма.

Имуноглобулины (Ig) - сложные белки, специфически связывающиеся с чужеродными веществами-антигенами.

Иммунологическая память - способность при повторном контакте с антигеном узнавать и отвечать на него иммунологической реакцией.

Инбредная депрессия - явление снижения жизнеспособности и продуктивности, ухудшение воспроизводительной функции в результате инбридинга.

Инбридинг - спаривание (подбор) близкородственных особей.

Инверсия – абберрация, при которой происходит отрыв участка хромосомы, поворот его на 180^0 и присоединение на прежнее место.

Инженерная энзимология - отрасль биотехнологии по использованию ферментов для получения химических веществ и в химических процессах.

Индуктор - небольшая молекула, включающая транскрипцию гена за счет связывания с регуляторным белком.

Индукцированные мутации - возникают под действием мутагенного фактора.

Интерфаза - фаза клеточного цикла между митотическими делениями клетки; подразделяется на G1, и S, G2.

Интерференция - торможение кроссинговера на одном участке кроссинговером на другом.

Интерфероны - группа белков, образующихся в клетках при вирусных инфекциях и обеспечивающих неспецифический противовирусный иммунитет.

Интроны - последовательности внутри структурного гена, которые не участвуют в кодировании белкового продукта гена. После транскрипции гена последовательности, соответствующие интронам, удаляются из мРНК в процессе сплайсинга.

Ион — диссоциированные части молекулы, каждая из которых несет электрический заряд.

Искусственный отбор. Отбор человеком из поколения в поколение животных и растений, основанный на одном или нескольких наследуемых признаках.

Инъекция в пронуклеус зиготы - метод трансгеноза, при котором чужеродная ДНК вводится в пронуклеус и находится в каждой клетке трансгенного организма.

Инъекция трансформированных бластомеров в бластоцисту - методе трансгеноза, при котором чужеродная ДНК находится только в части клеток трансгенного организма?

Ипсилатеральный - рог матки реципиента, который находится на одной стороне к яичнику, в котором произошла овуляция и сформировалось желтое тело

Капацитация - комплекс изменений в сперматозоидах, в результате которого они приобретают способность к оплодотворению яйцеклеток.

Капсид - белковая оболочка вируса.

Кариотип - набор хромосом соматической клетки организма, характерный для вида по числу, форме и величине.

Карта хромосом - план расположения генов в хромосоме

Катион — часть диссоциированной молекулы, несущая положительный электрический заряд, обычно в водном растворе (например, Ca^{2+} , Na^+ , NH^+).

Катетер - инструмент предназначенный для проведения в естественные каналы организма (матка, сосуды, уретра и др.). Конструкция катетера определяется его назначением (катетер для вымывания эмбрионов, для осеменения и проч.).

Клеточная инженерия - метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции.

Клонирование - метод получения генетически одинаковых клеток, организмов.

Климодиаграмма — диаграмма, на которую нанесен годичный цикл температуры и количества осадков для данной местности.

Клина. Постепенное изменение (градиент) частоты генотипов или фенотипов у ряда смежных популяций.

кДНК - одноцепочная ДНК, синтезированная обратной транскриптазой на матрице РНК.

Клон - совокупность клеток или особей, произошедших от общего предка путем бесполого размножения.

Компактизация - явление тесного сцепления между собой клеток морулы.

Кодирующая цепь - та цепь ДНК, последовательность которой идентична мРНК.

Кодоминантные аллели - аллели, совместно проявляющиеся в гетерозиготе. Ни один не доминирует над другим.

Кодон - Группа из трех смежных нуклеотидов в молекуле мРНК, либо кодирующая определенную аминокислоту, либо обозначающая конец синтеза полипептидной цепи.

Компетентность - состояние бактериальной клетки, при котором она способна воспринимать экзогенную ДНК.

Количественный признак. Признак, имеющий количественное выражение.

Кольцо Бальбиани - гигантский пучок на меченой хромосоме.

Комбинативная изменчивость — наследственная изменчивость, возникающая в потомстве в результате новых сочетаний признаков и свойств при скрещиваниях.

Комплементарная ДНК - ДНК, синтезированная на РНК-матрице с помощью обратной транскриптазы.

Комплементарная цепь - одна из цепей ДНК, используемая в качестве матрицы для синтеза РНК и комплементарная ей.

Конвергентная эволюция — развитие признаков, несущих одинаковые функции, у неродственных видов, которые обитают в среде одинакового типа.

Конкордантность - присутствие болезни у обоих близнецов.

Космиды - плазмидные векторы, содержащие сайты, ответственные за упаковку ДНК фага в белковую оболочку.

Конъюгация - один из способов обмена генетическим материалом у бактерий.

Криоконсервация - процесс глубокого замораживания живых организмов.

Коэффициент инбридинга. Вероятность того, что два гена (аллеля) в данном локусе идентичны по происхождению.

Коэффициент отбора. Интенсивность отбора, оцениваемая по относительному вкладу гамет в генофонд следующего поколения.

Кроссинговер - Обмен между гомологичными хроматидами, происходящий в процессе мейоза и лежащий в основе генетической рекомбинации.; если хроматиды имели разные наборы аллелей, то кроссинговер может быть выявлен по образованию генетически рекомбинантных хроматид.

Криопротекторы - вещества, предотвращающие клетки живых организмов от повреждений при замораживании.

Леталь. Ген (или хромосомная мутация), вызывающий гибель организма до достижения им половозрелости; если леталь доминантна, то погибают все ее носители, если же она рецессивна, то погибают только гомозиготы.

Летальные гены - гены, вызывающие гибель организма в 100% случаев.

Летальные мутации — мутации, несовместимые с жизнью.

Лигаза - фермент, способный устранять разрывы в молекуле ДНК, восстанавливая ковалентные связи между 5¹ - и 3¹ — концами молекул.

Лизогения - способность фага существовать в бактерии в виде профага, являющегося компонентом бактериального генома.

Лимфоциты-В - вид лейкоцитов, которые синтезируют и секретируют иммуноглобулины.

Лимфоциты –Т - вид лейкоцитов, которые выполняют различные функции в ходе иммунного ответа.

Линкер- короткий фрагмент ДНК, содержащий сайт узнавания какой-либо рестриктазы

Липкие концы - концы фрагментов ДНК, полученные при несимметричном расщеплении сайта рестрикции.

Лютеинизирующий гормон - гормон, входящий в состав гонадотропина, накапливается в клетках фолликула на конечной преовуляторной стадии развития.

Лютеиновая фаза - фаза полового цикла самок животных, при которой в яичнике находится желтое тело

Локус - место в хромосоме, в котором картируется ген, отвечающий за определенный признак; локус может быть представлен любым аллелем данного гена.

Макроэволюция. Эволюция на уровне более высоких систематических категорий, чем вид; приводит к возникновению новых родов, семейств и других таксонов более высокого ранга.

Маркер (генетический) - любой аллель, используемый в эксперименте.

Матка - орган размножения самок млекопитающих, в котором происходит процесс развития плода.

Мейоз - два последовательных деления клетки (I и II мейотические деления), в результате которых образуется исходное гаплоидное число хромосом в каждой из четырех образовавшихся клеток. Эти клетки созревают и превращаются в гаметы (сперматозоиды и яйцеклетки).

Менделевская популяция. Группа скрещивающихся между собой организмов, образующая единый генофонд.

Метабономика - наука, в задачу которой входит реконструкция основных метаболических процессов в организме на основе знания нуклеотидных последовательностей

Метэструс - стадия полового цикла, при которой в яичнике формируется желтое тело.

Метафаза – стадия митоза и мейоза, при которой хромосомы выстраиваются на экваторе клетки, образуя метафазную пластинку.

Мини-сателлитные последовательности (повторы) – простые tandemно повторяющиеся нуклеотидные последовательности генома эукариот с длиной повторяющейся части от 1 до 7 нуклеотидов.

Микросателлиты – присутствующие в эухроматине короткие tandemно повторяющиеся последовательности ДНК

Митоз - деление эукариотической соматической клетки.

Митохондриальные ДНК - небольшие кольцевые молекулы ДНК, присутствующие в митохондриях; кодируют некоторые компоненты митохондрий.

Модификационная изменчивость - ненаследственная фенотипическая изменчивость, возникающая под влиянием условий среды и не изменяющая генотип.

Мозаицизм - присутствие в организме клеток (точнее клонов) разного генотипа.

Молчащие мутации - не изменяют продукта, кодируемого геном.

Моногибридное скрещивание - скрещивание, при котором у родителей учитывается один признак, контролируемый одним локусом.

Моноцистронный оперон - кодирует один белок.

Мультимерные белки - состоят более чем из одной субъединицы.

Мутагенез – процесс возникновения мутаций.

Мутагены - факторы, увеличивающие частоту возникновения мутаций, вызывая изменения в ДНК.

Мутация – скачкообразное, стойкое изменение в структуре ДНК и кариотипе.

Морула - стадия развития, на которой эмбрион находится в виде недифференцированных клеток-бластомеров тесно сцепленных друг с другом (возраст: 4- 6 дней у крупного рогатого скота). В зависимости от возраста различается ранняя морула (М I) и поздняя морула (М II).

Наследование - процесс передачи наследственной информации от одного поколения другому.

Наследственность - свойство организмов обеспечивать материальную и функциональную преемственность между поколениями, а также обеспечивать специфический характер онтогенеза в определенных условиях среды.

Наследственные болезни - болезни, вызываемые мутацией генов одного или нескольких локусов и сопровождающиеся появлением аномалий, уродств и т.д.

Наследуемость - в широком смысле – доля общей фенотипической вариации, остающаяся после исключения вариации, определяемой внешними условиями. В узком смысле – отношение аддитивной генетической вариации к общей фенотипической вариации.

Нехирургический метод вымывания эмбрионов - метод вымывания эмбрионов из самки-донора с использованием инструментария, позволяющего проникать в полость матки через естественный половой тракт. Применим только у крупных животных.

Непрерывная изменчивость. Изменчивость в отношении признака, по которому особи лишь слегка отличаются друг от друга, но не распадаются на четко очерченные классы.

Неравновесность по сцеплению. Неслучайное распределение частот аллелей, принадлежащих разным локусам.

Нерасхождение - неспособность хроматид (дублированных хромосом) расходиться к противоположным полюсам во время митоза или мейоза.

Неслучайное скрещивание. Система скрещивания, при которой частота скрещиваний различных типов между носителями каких-либо признаков отличается от частоты, ожидаемой при случайном скрещивании.

Нехватка - утрата концевых участков хромосом.

Новообразование - тип взаимодействия неаллельных генов, когда при их сочетании в одном организме развивается новая форма признака.

Норма реакции - генотипически определяемая способность организма изменять степень выраженности признаков в определенных пределах в зависимости от условий среды.

Нуклеоид - ядерная зона в прокариотической клетке; она содержит хромосому, но не окружена мембраной. Компактное образование у бактерии, содержащее ДНК.

Нуклеосома - основная структурная единица хроматина, состоящая из ~ 200 нуклеотидных пар ДНК и октомера гистоновых белков.

Обратная транскриптаза - РНК-зависимая ДНК-полимераза – фермент, осуществляющий синтез ДНК на матрице РНК.

Овоцит первого порядка - премейотическая стадия развития яйцеклетки в фолликуле.

Овуляция - выход яйцеклетки из фолликула.

Однонаправленная репликация - единственная репликационная вилка движется от определенной точки, называемой местом начала репликации.

Однонуклеотидные замены (полиморфизмы) – генные мутации, затрагивающие один нуклеотид.

Онтогенез - индивидуальное развитие организма от оплодотворения яйцеклетки до естественной смерти.

Ооцит - женская половая клетка до оплодотворения.

Оперон - единица транскрипции и регуляции у бактерий, состоящая из структурных генов, регуляторного гена (генов) и контролирующих элементов, узнаваемых продуктами регуляторного гена.

Оплодотворение - процесс слияния половых клеток: яйцеклетки и сперматозоида.

Осмоз — диффузия веществ, растворенных в воде, через клеточную мембрану.

Отбор. См. *Естественный отбор* и *Искусственный отбор*.

Отношение полов. Отношение числа мужских особей к числу женских (выражаемое иногда в процентах) сразу после оплодотворения (первичное отношение полов), у новорожденных (вторичное отношение полов) и при достижении половозрелости (третичное отношение полов).

Охота - особое поведение самки, свидетельствующее о ее готовности к оплодотворению, день охоты считается нулевым днем полового цикла

Оценка по сестрам - ускоренный метод оценки генотипа производителя с использованием трансплантации эмбрионов.

Палиндром - последовательность ДНК, которая остается неизменной, если на одной из цепей ДНК ее читать справа налево; состоит из прилежащих друг к другу инвертированных поворотов.

Панмиксия - свободное скрещивание.

Партеногенез -. Развитие организма из гамет самки без участия гаметы самца.

Патогенность - способность паразитировать в организме животного.

Пенетрантность - частота, с которой доминантный или рецессивный ген в гомозиготном состоянии проявляется фенотипически.

Первое направительное тельце - Клетка из тертады женских гамет, образующаяся в результате деления овоцита первого порядка

Перивителлиновое пространство - пространство под прозрачной оболочкой эмбриона, в котором находятся клетки эмбриона.

Персистентное желтое тело - желтое тело, задержавшееся на стадии секреции дольше положенного срока.

Плазмида - кольцевая внехромосомная ДНК, способная к автономной репликации.

Плейотропия - влияние одного гена на развитие двух или более признаков.

Плодовитость — скорость, с которой особь продуцирует потомков (обычно применительно к самкам).

Полигенный признак - Признак, определяемый многими генами, каждый из которых оказывает лишь небольшое влияние на проявление этого признака.

Полимерия - такой тип взаимодействия, при котором на один признак влияет несколько разных, но сходно действующих неаллельных генов.

Полиморфизм - одновременное присутствие в популяции двух или более аллелей с частотой больше 0,01.

Полиморфность. Доля полиморфных локусов в популяции.

Полипептид. Последовательность аминокислот, связанных между собой ковалентными пептидными связями; белок.

Полиплоид. Клетка, ткань или организм с тремя или более полными хромосомными наборами.

Полиплоидия - увеличение числа хромосом, кратное гаплоидному набору.

Полифакторный признак - признак, обусловленный многими локусами.

Половые хромосомы. Хромосомы, участвующие в определении пола и различающиеся у представителей разных полов (ср. *Аутосомы*).

Популяционная генетика - раздел генетики, изучающий генетическую структуру и генетические процессы, происходящие в популяциях.

Популяция - совокупность особей одного вида, обитающих на определенной территории и свободно скрещивающихся между собой

Пороговый признак - признак, распределение которого при расщеплении происходит прерывисто, но наследуется он полифакторно.

Провирус - двухцепочная последовательность ДНК, встроенная в хромосому эукариот и соответствующая геномной РНК ретровирусов.

Промотор - участок ДНК, ответственный за связывание РНК-полимеразы, инициирующей транскрипцию.

Процессинг - совокупность реакций, ведущих к превращению первичных продуктов транскрипции и трансляции в функционирующие молекулы.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) – амплификация ДНК в условиях *in vitro* (в пробирке).

Полипотентность - свойство эмбриональных клеток давать начало новому организму, сохраняется у млекопитающих до стадии 4 – 8 клеток.

Половой цикл - циклические изменения в организме самок, связанные с созреванием яйцеклеток.

Праймер - олигонуклеотид, комплементарный 3'-концу ДНК-матрицы и служащий затравкой для синтеза комплементарной цепи молекулы ДНК

Примордиальный фолликул - самая ранняя стадия развития фолликула.

Прогестагены - синтетические аналоги гормона прогестерона, используются для пролонгации лютеиновой фазы полового цикла.

Прогестерон - гормон вырабатываемый желтым телом, служащий для имплантации эмбриона в матку

Пролиферация - процесс разрастания клеточной массы желтого тела.

Пронуклеус - предшественник целостного ядра зиготы, образующийся из ядер половых клеток: яйцеклетки и сперматозоида.

Простагландин F2 α - гормон, образующийся в фолликуле под действием ЛГ, обладающий сократительным действием на гладкую мускулатуру, способствует овуляции, лютеолизису

Протеомика - наука, изучающая качественный и количественный состав белков, синтезируемых в организме

Процессинг - процесс образования зрелой формы РНК и некоторых белков.

Проэструс - стадию полового цикла самок, предшествующая эструсу (охоте), характеризуется ростом фолликула, синтезом эстрогенов, течкой.

Прыгающие гены - последовательность ДНК, способная переносить себя в различные новые сайты локализации в пределах генома, например, транспозоны, инсерционные последовательности.

Радиоиммуноанализ белков - метод поиска нужного гена в библиотеке генов, основанный на его экспрессии в клетках.

Регуляторный ген. В широком смысле – любой ген, регулирующий или модифицирующий действие других генов. В узком смысле – ген, кодирующий аллостерический белок, который (самостоятельно или в сочетании с корепрессором) регулирует генетическую транскрипцию структурных генов в опероне, связываясь с оператором (ср. *Ген-модификатор*, *Структурный ген*).

Расщепление - образование в потомстве гибридов особей с различными признаками.

Резистентность - устойчивость организма к действию физических, химических и биологических агентов, вызывающих патологическое состояние.

Рекомбинантная ДНК - искусственно полученная молекула ДНК.

Рекомбинация. Образование новых сочетаний отдельных участков молекул ДНК (хромосом).

Рекон - минимальная часть гена, которая может быть обменена путем кроссинговера с другим гомологичным участком аллельного ему гена, находящегося в другой хромосоме.

Рекристаллизация - Явление, которое может наблюдаться при медленном оттаивании эмбриона и заключается в переходе кристаллов льда из формы сферулитов (неповреждающей) в форму дендритов (повреждающую).

Релаксин - гормон желтого тела, расслабляющий связочный аппарат тазовых костей, облегчающий процесс рождения плода.

Ренатурация - процесс восстановления вторичной структуры ДНК.

Репарация – восстановление повреждённой структуры ДНК.

Репрессор - ген, подавляющий действие другого гена.

Репликон – часть молекулы ДНК, в которой осуществляется синтез новой ДНК в одноцепочечной форме.

Репликация - процесс самовоспроизведения нуклеиновых кислот, обеспечивающий точное воспроизведение генетической информации.

Репликационная вилка - точка, в которой цепи родительской двухцепочной ДНК расходятся для того, чтобы могла произойти репликация.

Репликационный глазок - область реплицирующейся ДНК внутри протяженного нереплицирующегося района.

Репродуктивная изоляция. Неспособность организмов скрещиваться друг с другом вследствие биологических различий между ними.

Репродуктивные изолирующие механизмы. Любые биологические особенности организма, препятствующие скрещиванию его с представителями других видов.

Рестриктазы - ферменты, способные расщеплять молекулу ДНК на фрагменты

Рестрикция - процесс разрезания молекулы ДНК ферментами – рестриктирующими эндонуклеазами.

Ресурс — вещество или объект, необходимый организму для поддержания нормального существования, роста и размножения. Если количество данного ресурса мало по сравнению с потребностью в нем, то его называют ограничивающим ресурсом. Невозобновляемые ресурсы (например, пространство) существуют в фиксированных количествах и могут быть полностью использованы; возобновляемые ресурсы (например, пища) производятся со скоростью, которая может частично определяться их использованием.

Реципиент - самка, которой пересаживают эмбрионы для получения приплода.

Рецепторы - макромолекулярные структуры клеточной поверхности, с помощью которых клетки узнают антигены.

Рецессивность - отсутствие проявления одного из аллелей в гетерозиготе.

Рецессивный аллель. Аллель (или соответствующий признак), проявляющийся лишь в гомозиготном состоянии.

Рецессивный ген - ген, влияющий на развитие признака только в гомозиготном состоянии.

Рибоза (дезокси - дидезокси -) - вещество, составляющее углеводную основу нуклеотидов

Рибонуклеиновая кислота (РНК). Полинуклеотид, содержащий в отличие от ДНК урацил вместо тимина и сахар рибозу вместо дезоксирибозы

Рибосома - органоид цитоплазмы, с участием которого происходит синтез белка в клетке.

мРНК – матричная, информационная РНК (иРНК), кодирующая белки.

РНК – одноцепочечные полимерные молекулы нуклеиновых кислот, участвующие в процессах биосинтеза белка и выполняющие разные функции (мРНК, тРНК, рРНК).

Сайт – место, занятое точковой мутацией внутри цистрона, т.е. любая пара нуклеотидов в двухцепочечной молекуле ДНК

Сайт узнавания - участок ДНК, узнаваемый рестриктазой.

Самооплодотворение. Образование зиготы из мужских и женских гамет, продуцируемых одним и тем же организмом.

Сверхдоминирование. Явление, при котором какой-либо признак (обычно приспособленность) проявляется в гетерозиготе сильнее, чем в обеих гомозиготах.

Секвенирование – определение нуклеотидной последовательности ДНК

Сексдукция - перенос у бактерий фактором F генетического материала из одной клетки в другую

Селективный сдвиг. При искусственном отборе разность между средними значениями признака у потомства отобранных родителей и в родительском поколении в целом.

Селекционный дифференциал. При искусственном отборе разность между средними значениями признака у особей, отбираемых в качестве родителей следующего поколения, и в целой популяции.

Серия — последовательный ряд стадий изменения сообщества в определенной области, ведущий к устойчивому состоянию. См. также *Сукцессия*.

Синхронизация - называется процесс одновременного вызывания половой охоты у нескольких самок

Синапсис - конъюгация двух пар сестринских хроматид гомологичных хромосом, происходящая во время мейоза; образующаяся структура называется бивалентом.

Системы групп крови - совокупность антигенов, контролируемых одним локусом.

Система скрещивания. Характер выбора брачного партнера в популяциях, размножающихся половым путем; принято различать случайное и ассортативное (предпочтительное) скрещивание.

Случайная выборка. Выборка, организуемая таким образом, что каждая особь популяции или каждый ген в геноме обладает равной с другими вероятностью попасть в нее.

Случайное скрещивание. Случайный выбор брачного партнера по отношению к какому-то одному или нескольким признакам. Синоним: панмиксия (ср. *Ассортативное скрещивание*).

Скрининг - процесс поиска нужной последовательности ДНК среди библиотек генов или клеток и особей, подвергшихся генетической трансформации

Случайный дрейф генов. Изменение частот генов в ряду поколений, происходящее в результате случайных флуктуаций.

Соматические клетки. Все клетки тела, за исключением гамет и тех клеток, из которых развиваются гаметы.

Соматическая гибридизация - метод, позволяющий объединять зародышевые клетки разных организмов

Сосуд Дьюара - емкость для хранения сжиженных газов, в частности жидкого азота.

Сплайсинг - процесс удаления интронов и объединения экзонов в мРНК.

Стабилизирующее скрещивание - скрещивание, восстанавливающее соотношение генотипов в популяции в соответствии с формулой Харди-Вайнберга.

Суперовуляция - процесс овуляции более 3-х фолликул за один цикл у самок малоплодных видов

Структурный ген - кодирует РНК или белок.

Субвита́льные гены - гены, вызывающие гибель менее 50% особей.

Сублетальные гены (полулетальные) - гены, обуславливающие гибель 50-99% особей.

Суперген. Участок ДНК, содержащий несколько тесно сцепленных генов, влияющих на один признак или на ряд взаимосвязанных признаков.

Сцепление. Мера независимости с которой аллели двух генов расходятся в разные клетки в мейозе или при скрещиваниях.

Сцепленность - свойство генов одной хромосомы наследоваться совместно; измеряется в процентах рекомбинации между локусами.

Сцепление с полом - способ наследования, характерный для генов, находящихся в половых хромосомах (обычно в X-хромосоме).

Сцепленность с полом. Сцепление генов, находящихся в половых хромосомах.

Сферулиты. - кристаллы льда округлой формы, образующиеся при быстром охлаждении жидкости.

Теломера - естественный конец хромосомы.

ТАТА - консервативная последовательность на промоторе для связывания РНК-полимеразы

Текальные клетки - фолликулярные клетки, расположенные на периферии фолликула.

Тератология - наука, изучающая уродства.

Терминатор - последовательность ДНК, находящаяся на конце транскрипта и ответственная за прекращение транскрипции.

Терминальная трансфераза - фермент, присоединяющий отдельные нуклеотиды к 3'-концу молекулы ДНК.

Терминирующий кодон - один из трех триплетов УАГ, УАА или УГА, вызывающих терминацию синтеза белка; их также называют бессмысленными кодонами.

Тотипотентность - способность любой соматической клетки дать начало новому организму.

Точка начала репликации (ori) - последовательность ДНК, в которой происходит инициация репликации.

Точковые мутации - изменение одной пары оснований.

Трансгеноз - экспериментальный перенос генов, выделенных из определенного генома или искусственно синтезированных, в другой геном.

Трансгенные организмы - организмы, несущие чужеродные гены.

Трансдукция - перенос генов из одной бактериальной клетки в другую при помощи бактериофага.

Транскрипция - процесс синтеза РНК на ДНК-матрице.

Транслокация - перемещение гена или участка хромосомы из одного локуса в другой.

Трансляция - процесс синтеза белка на матричной мРНК.

Трансмиссибельная геномная нестабильность (transmissible genomic instability) (или НСГ клеток полового пути, или «половая» НСГ-индуцирование (и/или передачи) состояния НСГ в ряду клеточных генераций или поколений на организменном уровне, от родителей к потомкам, т.е. из генома родительских гамет в соматические клетки организма потомков).

Трансплантация эмбрионов - метод ускоренного воспроизводства высокопродуктивных животных (доноров) путем получения и пересадки эмбрионов менее ценным животным (реципиентам).

Транспозон - последовательность ДНК, способная реплицироваться и внедрять одну из копий в новое место генома.

Трансформация бактериальных клеток - приобретение нового генетического маркера в результате включения экзогенной ДНК.

Трансформация эукариотических клеток - переход в состояние неконтролируемого роста; имеет много общего или совпадает с опухолевым перерождением клеток.

Триплет - набор трех нуклеотидов (синоним кодона).

Трисомия — наличие добавочной хромосомы в кариотипе диплоидного организма.

Трофобласт- клетки эмбриона, из которых развиваются плодные оболочки

Тупые концы - концы фрагментов ДНК, полученные при симметричном расщеплении сайта рестрикции

Упаковочный коэффициент - отношение длины ДНК к длине структуры, которая ее содержит.

Усилители транскрипции (enhancer) - участки ДНК (50-100 п.о.), усиливающие транскрипцию с ряда эукариотических промоторов, находящихся по отношению к ним в **цис**-положении, эти элементы оказывают свое действие независимо от того, с какой стороны промотора они располагаются.

Условно летальные мутации - вызывают гибель клетки или вируса только в определенных (непермиссивных) условиях, но не проявляют своего летального действия в других условиях.

Устойчивость — внутренне присущая системе способность противостоять изменениям.

Участки сплайсинга - последовательности, непосредственно окружающие границы между экзонами и интронами.

Фаг (бактериофаг) - бактериальный вирус.

Факторы инициации (IF) - белки, которые специфически связываются с малой субчастицей рибосомы на стадии инициации белкового синтеза.

Фазмиды - векторы на основе гибридов между плазмидами и бактериофагами.

Факторы элонгации - белки, циклично ассоциирующие с рибосомой в соответствии с включением каждой новой аминокислоты в полипептидную цепь.

Фактор-F - фактор фертильности — эписома, контролирующая способность бактерий к конъюгации.

Факторы-R - эписомы, обеспечивающие устойчивость бактерий к лекарственным препаратам.

Фарминг - направление, при котором трансгенных животных используют как биопродуцентов лекарственных веществ –белков человека.

Феногруппа - совокупность антигенов, которые наследуются как единое целое.

Фенокопия - изменение признака под влиянием внешних факторов, ведущее к копированию признаков, обусловленного генотипом.

Фенотип. Совокупность всех доступных наблюдению признаков организма, возникающих в результате взаимодействия между генотипом и окружающими условиями, в которых происходит развитие организма.

Фенотипическая варианса (дисперсия). Дисперсия частоты распределения особей по какому-либо признаку или совокупности признаков (ср. *Генетическая варианса*).

Ферменты, энзимы - биологически активные вещества, катализирующие химические реакции в живых организмах.

Ферменты рестрикции - узнают определенные короткие последовательности в ДНК и расщепляют ее иногда в месте связывания, а иногда в каком-либо другом месте (это зависит от типа фермента).

Филогенез - история развития вида.

Флуоресценция – специфическое свечение, возникающее в результате применения специфических флюоресцентных красителей.

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) - гормон гипофиза, под действием которого гормона происходит рост фолликулов в яичнике самок а также образование эстрогенов в фолликуле.

Фрагменты Оказаки - короткие фрагменты ДНК длиной несколько тысяч (бактерии) или несколько сотен (эукариоты) нуклеотидов образуется в результате прерывистой репликации; впоследствии ковалентно соединяются в непрерывную цепь.

Фосфодиэфирная связь - химическая связь, соединяющая нуклеотиды в одноцепочечную молекулу ДНК

Фрагмент Кленова - домен ДНК-полимеразы с 5'- 3' полимеразной активностью.

Хиазма - петля, образуемая хромосомами при конъюгации хромосом в период редукционного деления.

Химеры - растения или животные со смешанными тканями двух организмов.

Хипп Вальтер - шотландский зоолог, впервые осуществивший успешную пересадку эмбрионов на кроликах, предложивший классификацию стадий полового цикла самок

Холестерин - вещество, являющееся предшественником стероидных гормонов.

Хроматиды - хромосомные копии, образующиеся при репликации.

Хромомера - интенсивно окрашиваемая гранула; ее можно различить как составную часть хромосомы при определенных условиях (особенно на ранних стадиях мейоза).

Хромосомы - Нитевидная структура в ядре клетки, содержащая гены, расположенные в линейной последовательности; молекула ДНК, представляющая весь геном прокариотических клеток; молекула ДНК в комплексе с гистонами и другими белками в эукариотических клетках.

Хромосомная мутация (перестройка). Изменение структуры или числа хромосом в наборе.

Хромосомный набор. Совокупность всех хромосом в ядре нормальной гаметы или зиготы. Каждый тип хромосом может быть представлен в одном экземпляре (моноплоидный или гаплоидный набор) или в большом числе экземпляров (полиплоидный набор).

Хромосомная нехватка - потеря в результате мутации конца хромосомы.

Хромосомный полиморфизм. Популяционный полиморфизм по хромосомным перестройкам.

Центровая теория гена - теория о том, что ген состоит из отдельных функциональных участков – центров, которые могут независимо изменяться при мутациях.

Центромера - область хромосомы, в которую входит участок прикрепления к митотическому или мейотическому веретену.

Цианобактерии - группа фототрофных прокариотических организмов (традиционное название – синезеленые водоросли).

Цитогенетика - раздел генетики, изучающий строение клетки и ее органоидов и изменение их при возникновении мутаций.

Цистрон - генетическая единица, выявляемая путем комплементационного теста; эквивалентна гену и означает единицу ДНК, кодирующую белок.

Цитоплазматическое наследование - характерно для признаков, определяемых митохондриальными генами, и генами, локализованными в хлоропластах.

Частотно-зависимый отбор. Естественный отбор, направление и (или) интенсивность которого зависит от частоты генотипов или фенотипов в популяции.

Числовые мутации - изменение числа хромосом в кариотипе.

Чистая скорость размножения — ожидаемое число потомков, которое самки могут произвести в среднем за всю свою жизнь.

Чистые линии - организмы, гомозиготные по изучаемым признакам.

Эвтектическая температура - температура замерзания насыщенного раствора.

Эволюция - процесс исторического развития живой природы на основе изменчивости, наследственности и отбора.

Экзонуклеазы.- ферменты, отщепляющие концевые нуклеотиды от молекулы ДНК

Экзон - любой отдельный фрагмент прерывистого гена, который сохраняется в зрелой РНК.

Экзонуклеазы - ферменты, последовательно отщепляющие нуклеотиды с концов полинуклеотидной цепи; могут быть специфичными в отношении 5¹ – или 3¹ – концов ДНК или РНК.

Экзоны - участки гена, в которых зашифрована информация о строении белка

Экспрессивность - влияние данного аллеля на степень выраженности признака.

Экспрессия гена — активизация транскрипции гена, в процессе которой на ДНК образуется мРНК.

Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) - совокупность методов, позволяющих осуществлять оплодотворение в искусственных условиях.

Электропорация - метод внесения ДНК в клетки помощью электрического поля.

Электрофорез фрагментов ДНК – процесс, обеспечивающий разделение фрагментов ДНК на поверхности геля. Фрагменты движутся в геле, помещённом в постоянное электрическое поле, от отрицательного полюса к положительному в зависимости от размеров (чем больше относительная молекулярная масса фрагмента, тем медленнее он движется).

Электрофорез. Метод разделения молекул, основанный на их разной подвижности в электрическом поле.

Электроморфы. Аллоферменты, выявляемые с помощью электрофореза.

Эмбриобласт - клетки эмбриона, из которых впоследствии развиваются органы и ткани.

Эмбриогенетическая инженерия - активная перестройка генома животных путем вмешательства в их развитие на самых ранних стадиях онтогенеза.

Эндонуклеазы - ферменты, расщепляющие связи полинуклеотидной цепи нуклеиновых кислот; могут быть специфичны в отношении РНК одноцепочных или двухцепочных ДНК.

Энзимы – ферменты, вещества белковой природы, участвующие в биохимических реакциях.

Эпигенез – сумма всех взаимодействий между генами и средой, их функционирования, проявляющихся в процессе онтогенеза и в ряду дифференцированных клеток

Эпигенетическая изменчивость – наследуемое, но обратимое функциональное состояние гена не сопровождающееся изменением его нуклеотидной последовательности

Эпигенотип – генотип, развившийся в процессе контакта с внешней средой, т.е. фенотип как продукт взаимодействия конкретного генотипа с внешней средой при формировании каждого признака в рамках его нормы реакции

Эписома - плазида, способная интегрировать в бактериальную ДНК.

Эпистаз - тип взаимодействия, при котором один ген подавляется другим, неаллельным геном.

Эстрогены - женские половые гормоны, образующиеся в клетках фолликула и оказывающие широкое влияние на организм самки.

Эструс - самая первая стадия полового цикла самок животных, характеризуется охотой и овуляцией.

Эухроматин - представляет собой весь генетический материал интерфазного ядра, за исключением гетерохроматина.

Эффект основателя. Генетический дрейф, обусловленный тем, что исходно популяция состоит из очень небольшого числа особей.

Эффект положения - влияние положения гена в хромосоме на его действие.

Ядерный матрикс - сплетение фибрилл, окружающих и пронизывающих ядро.

Ядро – жизненно важный органоид клеток эукариот, содержащий ДНК.

Ядрышко - обособленная область ядра, образуемая при транскрипции генов рРНК.

Яичник - орган размножения самок, в котором происходит созревание яйцеклеток.

Яйцевой фолликул - небольшой мешочек из клеток в яичнике млекопитающих, внутри которого находится созревающее яйцо.

Яйцеклетка - женская репродуктивная клетка, из которой после оплодотворения ее сперматозоидом развивается новая особь того же вида.

Содержание

	Стр.
Введение	3
Цели и задачи дисциплины	4
Содержание тем, вопросы для подготовки к занятиям и варианты индивидуальных заданий по темам	6
Тема 1. Предмет, методы и значение биотехнологических методов в селекции	6
Тема 2. Генная и клеточная инженерия	12
Тема 3. Перспективы и возможности генной инженерии в животноводстве	22
Тема 4. Биотехнология в воспроизводстве	29
Тема 5. Трансгенные животные а биотехнологии	43
Тема 6. Молекулярно-генетические методы	54
Тема 7.Молекулярно-генетические маркёры	63
Тема 8. Молекулярно-генетические маркеры в селекции	73
Тема 9. MAS-селекция и геномная селекция	81
Темы докладов, сообщений	90
Список вопросов для подготовки к зачету	92
Рекомендуемая литература	94
Словарь терминов	97

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии
Составитель
Себежко Ольга Игоревна

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ

Методические указания к практическим занятиям

В авторской редакции

Компьютерная вёрстка О.И. Себежко

Формат 210x297 15,02 усл. печ. л.