

Сіренко А. Г.

## Лекції та задачі з генетики



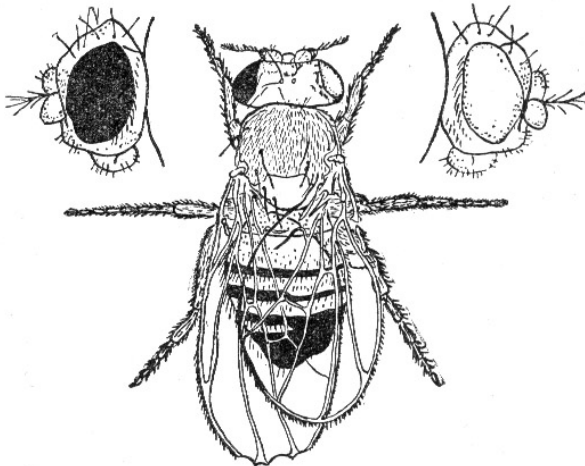
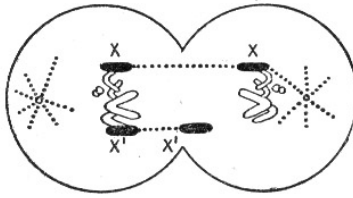
Автор: Сіренко А. Г. – кандидат біологічних наук, доцент кафедри біології та екології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника. Автор низки наукових праць в галузі цитогенетики, онкогенетики, популяційної генетики. У 2000 році захистив дисертацію на тему: «Феномен передчасного розділення центромер метафазних хромосом у хворих на гострий лімфобластний лейкоз дітей».



*Сіренко А. Г.*

Лекції та задачі з

# ГЕНЕТИКИ



Івано-Франківськ  
2018

ББК 28.04

С40

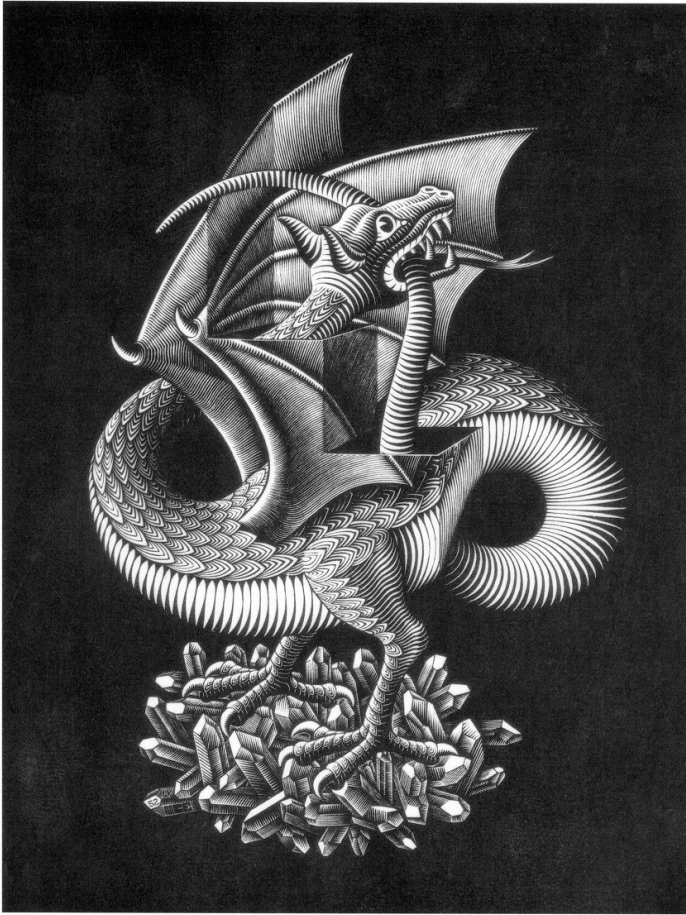
УДК 575

Лекції та задачі з генетики / Сіренко А. Г. – Івано-Франківськ:  
Голіней О. М., 2018. - 300 с.

Книга являє собою курс лекцій з генетики, що читається у Прикарпатському національному університеті імені Василя Стефаника та збірник задач, які розв'язуються на семінарських та практичних заняттях з генетики. Книга розрахована на науковців, викладачів, аспірантів, студентів, а також усіх тих, хто цікавиться проблемами генетики. Розглядаються основні закони генетики, основні генетичні явища, мутагенез, організація генома, основи генної інженерії, пояснюється основна генетична термінологія.

Затверджено до друку Вченою радою Прикарпатського університету імені Василя Стефаника.

**“Є дві різновидності істини – тривіальна, яку заперечувати безглуздо, і глибока, для якої протилежний вислів – теж глибока істина.”  
(Нільс Бор)**



**«Істина народжується  
як єресь і помирає як  
забобон.»**

**(Томас Гекслі)**

## ВСТУП

Характерна риса сучасної науки – це зростаюча диференціація і спеціалізація знань. Цей процес досяг такої межі, за якою вже відчувається реальна загроза втрати взаєморозуміння навіть між представниками однієї дисципліни. Це особливо стосується сучасної генетики. Генетику можна уявити собі у вигляді дерева, що коріннями йде у закони Менделя, що були викладені на кількох сторінках. Гілки цього дерева – це складні сучасні науки, кожна з яких має свою специфічну термінологію – свою наукову мову. Але наука повинна бути єдиною – тільки тоді вона дає змогу адекватно сприймати, аналізувати оточуючий світ і його закони. Курс лекцій покликаний власне впорядковувати існуючі знання з конкретної наукової дисципліни для цілісного сприйняття. Серед сучасних наук ми навряд чи знайдем якусь іншу дисципліну, яка б так швидко розвивалась як генетика. Кожного року кількість інформації по генетиці подвоюється. Методи і досягнення, які ще вчора вважались чимось фантастичним і нереальним, сьогодні стають рутинними і банальними. Жодна інша сучасна наука не викликає зараз стільки сподівань і стільки побоювань у суспільстві одночасно як генетика. Особливо це стосується таких напрямків і галузей генетики, як гена інженерія та генетична інженерія. У людському суспільстві є значні побоювання щодо розвитку цих дисциплін і дискусії, які стосуються самої можливості застосування цих підходів до живого, самого права на існування цих наук, не дивлячись на те, що застосування генної інженерії зайшло нині настільки далеко, що сучасна цивілізація вже не може відмовитись від них. Це зокрема стосується виробництва інсуліну та багатьох інших медичних препаратів, які було просто неможливо виготовляти іншими способами. Нинішні протести проти самого існування таких наук як гена інженерія часто носять абсолютно спекулятивний і ненауковий характер. Але головне щодо цієї дискусії те, що будь-яку науку і будь-яке відкриття можна використати по різному: все залежить не від самого відкриття, а від того хто, як і з якою метою це відкриття використовує.

Зараз генетика - це наука, якій судилось змінити світ. Чи будуть досягнення сучасної генетики використані на благо чи на зло людству - залежить від суспільства і від людей, а не від науки. Перспективи сучасної генетики справді вражаючі: розв'язання проблем старіння і смерті, онкогенезу, створення ефективних вакцин проти вірусних захворювань, створення екологічно чистих біотехнологій.

У даному курсі лекцій більше уваги приділено класичній генетиці, цитогенетиці, мутагенезу та генній інженерії – галузі, що викликає найбільше суперечок в суспільстві. Молекулярна генетика тут подається оглядово. Це пояснюється тим, що молекулярна генетика викладається окремо під час вивчення курсу молекулярної біології.

Сучасна генетика – це наука, є теоретичною і методологічною базою інших біологічних наук. На сьогодні генетика вважається однією з найактуальніших наук якими оперує людство, вважається наукою, на яку покладається найбільше надій сучасного людства, наукою, в якій очікується черговий прорив людської думки, наукою, яка, можливо, в недалекому майбутньому вирішить кардинальні проблеми людства.

Для оволодіння основами генетики студентам університету в першу чергу необхідно засвоїти основну генетичну термінологію, навчитися здійснювати генетичний аналіз, розв'язувати різні типи задач, використовуючи критерій Пірсона - метод "хі-квадрат" для перевірки висунутої гіпотези про характер успадкування тої чи іншої ознаки, вміти скласти родоводи.

У цій книзі наводяться пояснення основних термінів сучасної генетики – подається короткий словничок основних термінів генетики. Він дозволяє орієнтуватися в тому величезному морі генетичних термінів, кількість яких постійно зростає. Наведені приклади основних типів задач по генетиці різної складності, пояснюється метод "хі-квадрат" за допомогою якого можна перевірити правильність висунутої гіпотези.

Пропонуються задачі по різних темах і розділах генетики – як з класичної менделівської генетики так і з молекулярної генетики. Особлива увага приділяється задачам з генетичного аналізу – визначенню генотипів та складенню генетичних карт. Теорія генетичного аналізу пов'язана з побудовою логічних, математичних, експериментальних моделей, що допомагають зрозуміти суть генетичних процесів і явищ. Предметом вивчення в генетичному аналізі є фенотип організму, його окремі ознаки. Ознакою в генетиці вважається будь-яка властивість, будь-яка особливість, по яким особини можуть відрізнитися одна від одної. Хоча сучасна генетика оперує методами молекулярного аналізу, але класичні підходи схрещування і моделювання успадкування не втратили своєї актуальності.

## **Лекція I. МІСЦЕ ГЕНЕТИКИ СЕРЕД БІОЛОГІЧНИХ НАУК**

### **Предмет генетики**

**Генетика** – це наука про спадковість і мінливість, тобто це біологічна наука, що всебічно вивчає спадковість і мінливість живих організмів. Термін “генетика” походить від латинських слів *geneo* – народжую, *genus* – рід.

**Спадковість** – це властивість живих організмів, яка полягає у здатності батьків передавати свої ознаки нащадкам.

**Мінливість** – це властивість живих організмів, яка полягає у здатності нащадків відрізнитися від батьків.

**Успадкування** – це процес передачі ознак нащадкам.

### **Розділи сучасної генетики**

У сучасній генетиці виділяють наступні розділи:

**Класична (менделівська) генетика** – наука, що вивчає основні закономірності і закони спадковості.

**Цитогенетика** – наука, що вивчає будову хромосом.



**Молекулярна генетика** – наука, що вивчає молекулярні основи спадковості, молекулярну будову генів.

**Генна інженерія** – наука, що вивчає способи маніпуляцій з генами.

**Генетична інженерія** – наука, що вивчає способи маніпуляцій з геномами.

**Генетика рослин.**

**Генетика тварин.**

**Генетика мікроорганізмів.**

**Медична генетика (генетика людини).**

**Популяційна генетика** – наука, що вивчає генетичну структуру і динаміку популяцій.

**Імуногенетика** – наука, що вивчає генетичні механізми імунітету.

**Фармакогенетика** – наука, що вивчає вплив на спадковість і мінливість медичних препаратів.

**Євгеніка** – наука про вдосконалення людини як виду, виведення нової породи людини. Розрізняють негативну євгеніку – науку про елімінацію шкідливих мутацій, і позитивну євгеніку – науку про поєднання корисних мутацій. Зараз подібні дослідження з людиною вважаються негуманними і такого розділу генетики не існує. Проте на початку ХХ століття євгеніка була популярна, особливо у тоталітарних суспільствах.

**Генетика поведінки** – наука про спадковість поведінки і психіки людини і тварин.

**Радіаційна генетика** – наука про вплив на спадковість іонізуючого випромінювання.

### **Методи генетики**

Основним методом генетики є генетичний аналіз. Розрізняють такі його різновидності:

- 1) гібридологічний аналіз – полягає у гібридизації особин з альтернативними ознаками і аналізу співвідношення числа особин з різними ознаками;
- 2) цитологічний аналіз – полягає у приготуванні хромосомних препаратів з послідовним мікроскопічним аналізом;

3) молекулярний аналіз – полягає у використанні методів з використанням рекомбінантних молекул ДНК.

### Історія генетики

У будь-якому, навіть примітивному, первісному суспільстві спадковість і мінливість викликала жагучий, іноді навіть хворобливий інтерес. Чому діти схожі на батьків, але відрізняються від них? Це запитання люди ставили собі завжди. Ще у античні часи були зроблені спостереження про основні закономірності спадковості, було помічено, що існують спадкові захворювання. У деяких античних державах (Спарта) навіть застосовували еugenічні заходи. Перші наукові спостереження, які стосуються спадковості і мінливості, ми знаходимо у працях Арістотеля, Платона, Демокріта, Анаксагора, Гіпократата. Тоді ж була створена теорія **пангенезису**, що, не дивлячись на свою очевидну помилковість, проіснувала більше 2500 років. Згідно цієї теорії в кожній частині організму і в кожному органі утворюються гіпотетичні зачатки – **гемули**, що з кров'ю чи з якимись іншими рідинами організму в гонади, де формується з цих зачатків новий організм. Згідно цієї теорії всі набуті зміни організму успадковуються. Навіть Чарльз Дарвін був прихильником цієї теорії, що створило протиріччя з його теорією еволюції.

У часи середньовіччя не було дослідників, що займалися би цими питаннями чи створювали нові теорії. Новий інтерес до проблем спадковості та мінливості з'явився в часи ренесансу в зв'язку з розвитком сільського господарства в європейській цивілізації.

Досліди по вивченню спадковості різних живих організмів проводились ще у XVIII – на початку XIX століття. Так, досліди по гібридизації рослин в цей період проводили вчені І. Кельрейтер, А. Гертер у Німеччині, О. Сажре, Ш. Ноден у Франції, Т. Найт у Великобританії. Але ці дослідники намагались аналізувати не одну пару ознак, а всі ознаки організму одночасно, що дуже важко, і в результаті прийшли до

помилкових висновків про “повернення нащадків до ознак предків”.



Рис. 1. Грегор Йоган Мендель (1804 – 1884).

У 60-тих роках XIX століття свої знамениті дослідження провів Г. Мендель і, зробивши правильні висновки, відкрив основні закони генетики. Але його відкриття не було визнане – спеціалісти вважали Менделя дилетантом, що зайнявся не своєю справою. Його відкриття були забуті. Проте в кінці XIX століття було зроблено ряд відкриттів, що послужили потім базою для розвитку генетики. Так, Август Вайсман провів низку простих,

але переконливих дослідів, що показали хибність теорії пангенезису (досліди з хвостами мишей). Август Вайсман створив свою теорію спадковості – теорію гамет і соми, він висунув гіпотезу про те, що тіло будь-якої живої істоти ділиться на сому і гамети – клітини зародкової лінії (гоноцити), які і формують наступне покоління і є носіями спадкової інформації. Згідно його теорії існує певна “зародкова плазма”, що міститься у хромосомах клітинного ядра і є носієм спадкової інформації. Подібну теорію висував в той час і К. Негелі, який стверджував, що кожна клітина має “ідіоплазму”, що є носієм спадкової інформації.

У 1871 році швейцарський вчений Фрідріх Мішер відкрив ДНК у спермі рейнського лосося. Але важливість цього відкриття тоді ніхто не усвідомив.

У 1900 році троє вчених у трьох різних країнах - де Фріз, Коренс та Чермак в Голандії, Німеччині та Австрії перевідкрили закони Менделя, здійснюючи гібридизацію рослин. Це і був рік народження нової науки – генетики. Подальший розвиток генетики можна умовно розбити на 6 етапів.

**I етап** – 1900 – 1912 роки. Триумфальний хід менделізму, підтвердження законів Менделя на різних об'єктах. У цей період у 1906 році був запропонований і прийнятий термін “генетика”, були відкриті ознаки, що зчеплені зі статтю. У 1909 році були запропоновані Йогансенем терміни “ген”, “генотип”, “фенотип”. Була створена хромосомна теорія спадковості.

**II етап** – 1912 – 1925 роки – утвердження та доведення хромосомної теорії спадковості. Томас Морган заснував свою школу роботи з дрозофілою – об'єктом, на якому було відкрито величезну кількість закономірностей спадковості. Морган і Вільсон довели наявність хромосомного механізму визначення статі у дрозофіли. Була створена школа Темофеева-Ресовського. Почали працювати такі видатні вчені, як Н. І. Вавілов (генетика сільськогосподарських рослин, генетика кількісних ознак, закон гомологічних рядів спадкової мінливості), Кольцов, Філіпченко, Нільсон-Еле (генетика кількісних ознак, наукові основи селекції).

**III етап** – 1925 – 1942 роки – вперше мутації були викликані штучно (роботи Меллера, Надсона, Філіпова) шляхом опромінення дрозофіл X-променями. Були відкриті фізичні і хімічні мутагени. Над цими проблемами працювали вчені Надсон, Філіпов, Меллер, Серебровський, Четвериков. Ф. Гріффіт у 1928 році продемонстрував у бактерій наявність певної “речовини спадковості”, досліджуючи пневмококи, що викликають смертельну пневмонію у щурів. Серебровський отримав дані, що свідчили про складну будову гена та рекомбінації всередині гена.

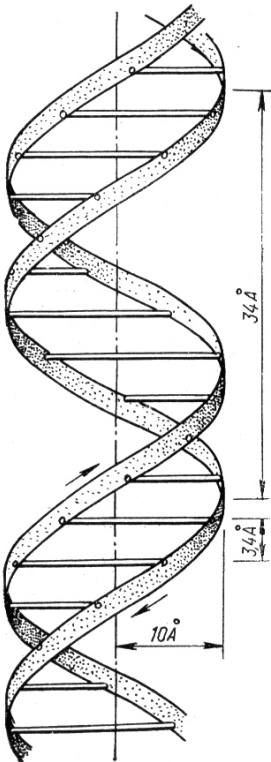


Рис. 2. Модель молекули ДНК.

**IV етап** – 1942 – 1953 роки – почали досліджуватись генетика фізіологічних і біохімічних ознак, генетика мікроорганізмів і вірусів. У 1942 році Освальд Евері продемонстрував, що рречовиною спадковості є ДНК, продовживши досліди Ф. Гріффіта. Але йому ніхто не повірив. Його звинуватили в тому, що його ДНК-аза була не чистою і містила протеїнкінази, що і зруйнували гіпотетичний «білок спадковості». У цей період вперше була

сформована теза «один ген – один фермент» (Дж. Біدل). У 1943 році було продемонстровано Осальдом Евері, що речовиною, яка є носієм спадкової інформації є ДНК. Але йому ніхто не повірив. У 1948 році відбулась фатальна для генетики подія – у

Радянському Союзу відбулась сесія ВАСХНІЛ, на якій було оголошено, що генетика є “буржуазною лженаукою” і протирічить марксизму-ленінізму. Генетика у Радянському Союзі була заборонена, кафедри і лабораторії закриті, вчені репресовані. Це було пов’язано з діяльністю лжевченого і псевдоакадеміка Лисенко, що висував безглузді «теорії» про «перевиховання живих істот», про «самозародження життя», про успадкування всіх набутих ознак. У результаті цього Радянський Союз безнадійно відставав від західних країн щодо розвитку генетики.

**V етап** – 1953 – 1973 роки. У 1953 році Джеймс Ватсон та Френсіс Крік на основі даних по дифракції рентгенівських променів пропущених через ДНК продемонстрували, що ДНК є подвійною спіраллю. Стало ясно, що саме ДНК є носієм генетичної інформації. У 1956 році було доведено, що інформація у ДНК кодується парами нуклеотидів. У 1958 році було доведено, що при реплікації ДНК відбувається розходження комплементарних ланцюгів, була відкрита ДНК-полімераза I. У 1960 році була відкрита РНК-полімераза та мРНК. У 1961 році були розшифровані перші знаки генетичного коду, синтезована перша синтетична мРНК (polyU) (роботи Г. Хорана). У 1965 році були відкриті плазмідні. У 1966 році був повністю розшифрований генетичний код. У 1967 році був виділений фермент ДНК-лігаза, який зшиває ланцюги ДНК. У 1970 році була відкрита перша рестриктаза.

**VI етап** – 1972 – 2000 роки.

1972 рік – вперше фермент ДНК-лігаза був використаний для зшивання фрагментів ДНК, отриманих за допомогою рестриктаз.

1973 рік – вперше у плазмідну ДНК вбудовані фрагменти чужорідної ДНК – створені химерні плазмідні. Продемонстрована принципова можливість клонування в бактеріях будь-якого гена. Наукові кола і громадськість в різних країнах висловили занепокоєння в зв’язку з небезпекою штучного створення нових небезпечних для людини вірусів і бактерій.

1974 рік – заклик до загального мораторію на дослідження в області молекулярної генетики.

1975 рік – Асіломарська конференція. Введення суворих правил роботи з рекомбінантними ДНК.

1976 рік – розроблені правила Національного інституту охорони здоров'я США щодо роботи з рекомбінантними ДНК. Заклик не присуджувати Нобелівські премії за дослідження в області вивчення ДНК.

1977 рік – створена перша гено-інженерна компанія (“Genetech”) по виробництву медичних препаратів з використанням методик рекомбінантних ДНК. Отримані перші рекомбінантні молекули ДНК, що містили гени ссавців. Відкриті мозаїчні гени. Розроблені методи секвінування ДНК.

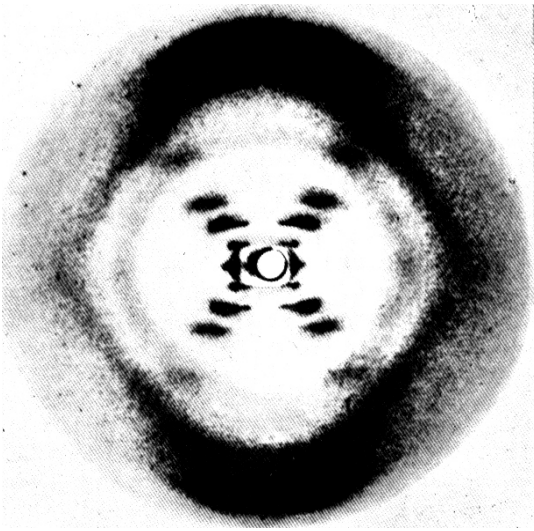


Рис. 3. Перша фотографія дифракційної картини при проходженні рентгенівських променів через ДНК. На основі цієї фотографії була створена дволанцюгова модель ДНК і доведено, що ДНК є речовиною спадковості.

1978 рік – присуджена Нобелівська премія за відкриття рестриктаз. З використанням методів рекомбінантних ДНК отримано перший людський гормон – соматостатин.

1979 рік – пом'якшення правил роботи з ДНК. Початок вивчення вірусних ДНК. ДНК пухлинних клітин використана для трансформації культури нормальних клітин. Початок вивчення ракових генів.

1980 рік – перше промислове виготовлення інсуліну з використанням методів рекомбінантних ДНК. Присуджена Нобелівська премія за створення рекомбінантних ДНК і за розробку методів секвенування ДНК.

1981 рік – населенню запропоновані акції компанії “Genetech”. На Уолл-стріт ці акції були оцінені у 200 млн. доларів. Вперше пренатально було діагностовано спадкове захворювання – серповидноклітинну анемію з використанням методик рестриктазного аналізу ДНК. 1982 рік – доведено, що чужорідні гени, введені у клітини тютюну, успадковуються згідно законів Менделя. Виділено і клоновано в *E. coli* онкоген раку сечового міхура. Показано, що нуклеотидна послідовність гену раку сечового міхура відрізняється від його нормального гомологу єдиною нуклеотидною заміною.

1983 рік – розшифрована повна нуклеотидна послідовність ДНК бактеріофага  $\lambda$ .

1986 – 2000 роки – здійснена програма “Геном людини” – повністю розшифрована нуклетидна послідовність геному людини.

### **Розвиток генетики в Україні**

У XIX столітті в Києві працював ботанік І. Ф. Шмальгаузен – єдиний на той час вчений, хто позитивно оцінив роботи Г. Менделя. Пізніше у Київському університеті працював С. Г. Навашин, що відкрив подвійне запліднення у покритонасінних рослин. Його роботи продовжив у XX столітті Г. А. Левицький – всесвітньовідомий генетик, що вивчав цитологічні процеси запліднення, вивчав нехромосомну спадковість, став засновником цитогенетики як науки. Пізніше він був репресований і помер у в’язниці. Також на початку XX століття у Києві працював відомий генетик Ф. Г. Добжанський, що вивчав лінійне розміщення генів у хромосомах, склав карту третьої хромосоми дрозофіли, став одним із засновників популяційної генетики, вивчав генетичні причини стерильності гібридів. У 1928 році його примусили емігрувати і його ім’я на батьківщині замовчувалось. У Києві також працювали видатні



генетики І. І. Клодницький, Г. Д. Карпеченко – співробітник академіка Н. І. Вавілова, що розділив його трагічну долю. У 1948 році генетика в Україні була повністю заборонена, наукові школи знищені. Після відродження генетики у 60-тих роках ХХ століття в Києві працював визначний генетик С. М. Гершензон, що вивчав мутагенез, мутагени, мутагенну дію чужорідної ДНК, передбачив зворотню танскрипцію, вивчав природні популяції.

## Лекція II. ЗАКОНИ МЕНДЕЛЯ

### Досліди Менделя. Моногібридне схрещування

Успіх робіт Менделя визначився тим, що Мендель досліджував успадкування не всіх ознак організму одночасно (що практично неможливо), а однієї або кількох пар альтернативних ознак. Альтернативні ознаки – це ознаки взаємовиключні, наприклад: карликовість або високий ріст гороху, крохмальність або цукристість кукурудзи, стійкість або чутливість до ДДТ у комах, наявність чи відсутність пір'я на ногах у курей, темна або світла райдужна оболонка очей людини.

Мендель, працюючи з рослиною горох, досліджував успадкування таких пар альтернативних ознак:

- 1) сіра або біла насінна оболонка;
- 2) зелений або жовтий стручок;
- 3) довге або коротке стебло;
- 4) здутий або стиснутий стручок;
- 5) гладке або зморшкувате насіння;
- 6) жовте або зелене насіння;
- 7) пазушні або верхівкові квіти.

Аналізуючи результати своїх дослідів, Г. Мендель прийшов до висновку про наявність певних спадкових факторів, які обумовлюють розвиток однієї ознаки, і потім були названі гени. Мендель прийшов до висновку, що в зиготі гени не змішуються, а існують відокремлено один від одного. Цю гіпотезу Менделя пізніше назвали **факторіальна гіпотеза спадковості**. Ці менделівські фактори спадковості пізніше були

названі генами. **Гени** в класичній генетиці розумілись як певні спадкові зачатки, що визначають розвиток певних ознак організму, спадкові властивості організму. Те, що алельні фактори (гени) у гетерозиготі не змішуються і в чистому стані розходяться по гаметах, відомо як **правило чистоти гамет**, сформульоване У. Бетсоном на початку ХХ ст.

Мендель сформулював три основні закони спадковості:

**I закон Менделя** – закон домінування. У першому поколінні гібридів при схрещуванні особин з альтернативними ознаками проявляється тільки одна ознака. Ця ознака була названа домінантною.

**II закон Менделя** – закон розщеплення. У другому поколінні гібридів при схрещуванні особин з альтернативними ознаками відбувається розщеплення у співвідношенні 3:1.

**III закон Менделя** – закон незалежного комбінування. При дигібридному схрещуванні кожна пара альтернативних ознак комбінується незалежно і відбувається розщеплення 9:3:3:1.

Мендель працював методами моногібридного, дигібридного і полігібридного схрещувань.

**Моногібридне схрещування** – це схрещування, при якому батьківські особини відрізняються однією парою подібних контрастуючих (альтернативних) ознак.

Мендель зауважив явище **розщеплення генів** – розходження генів або визначених ними спадкових ознак у нащадків гібриду.

Альтернативні ознаки обумовлюються алельними генами – генами, що визначають моногібридно успадковані ознаки, це гени-партнери, що присутні в зиготі в числі два, а при утворенні статевих клітин завжди розходяться так, що кожна гамета або спора отримує по одному гену цієї пари. Алельні гени – це різні стани одного і того ж гена. Гамети – статеві клітини – несуть тільки один алельний ген.

Простежується явище подавлення одного алеля присутнім разом з ним алелем тої ж пари – це явище називається домінуванням.

Тобто, серед пари різних алелей один алель є **домінантним** – алелем, що проявляється у гібридній особини, другий алель є **рецесивним** – алелем, прояв якого подавлено у гібридній особини.

Мендель зіштовхнувся з явищем **повного домінування** – явищем, при якому прояв одного алелю повністю подавлено іншим алелем. Прикладом повного домінування може бути успадкування плямистості шерсті кроликів – ген суцільного забарвлення хутра повністю домінує над плямистим забарвленням.

Р: ♀ AA X ♂ aa  
 сіра плямистий  
 F1: Aa – сірі  
 F2:

	A	a
A	AA сірі	Aa сірі
a	Aa сірі	aa плямисті

Розщеплення 3:1

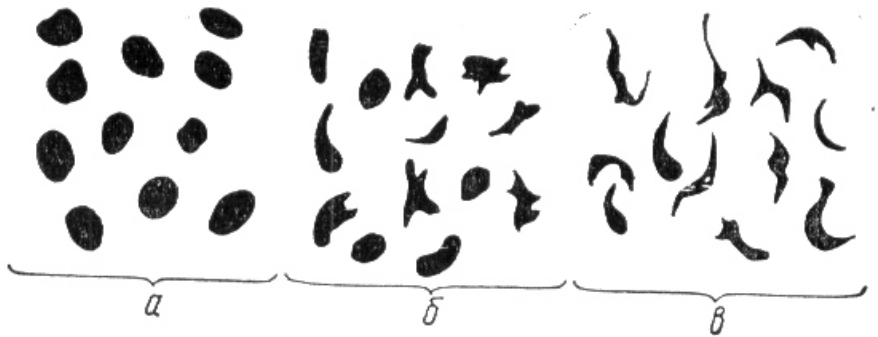


Рис. 4. Форма еритроцитів людини при низькому тиску кисня. А – нормальні, б – у гетерозигот по гену серповидно

клітинної анемії, в – у гомозигот по гену серповидно клітинної анемії.

У моногібридному схрещуванні, крім повного домінування, існують ще явища:

**Неповне домінування** – явище, при якому гібридна особина більше схожа на домінантну батьківську особину, але відрізняється від неї. Прикладом неповного домінування може бути серповидноклітинна анемія – спадкове захворювання, при якому еритроцити мають змінену форму – форму серпа. Захворювання моногенне, рецесивне. У гетерозигот форма еритроцитів нормальна, але при низькому тиску еритроцити змінюють свою форму, наближаючись до серповидних.

**Проміжне успадкування** – явище, при якому у парі алелей домінування взагалі відсутнє. У гібридній гетерозиготній особини ознака по своєму характеру займає середнє положення. Прикладом проміжного успадкування може бути успадкування масті у шортгорнської породи великої рогатої худоби (ВРХ). РР – червона масть, рр – біла масть, Рр – чала масть – проміжна між білою і червоною.

**Кодомінування** – явище, при якому обидва алелі повністю проявляються у гібридній гетерозиготній особини, так що гібридна особина має обидві батьківські ознаки. Прикладом кодомінування може бути успадкування груп крові у людини. Система груп крові АВО визначається трьома алелями –  $I^0$ ,  $I^A$ ,  $I^B$ . Алелі  $I^A$ ,  $I^B$  проявляють повне домінування над алелем  $I^0$ , але алелі  $I^A$ ,  $I^B$  один до одного проявляють кодомінування – повністю проявляються у гетерозиготи, утворюючи четверту групу крові. Загалом, групи крові визначаються такими генотипами:

	Групи крові по системі АВО			
	I (0)	II (A)	III (B)	IV (AB)
Генотипи	$I^0 I^0$	$I^A I^A$ $I^A I^0$	$I^B I^B$ $I^B I^0$	$I^A I^B$

**Наддомінування** – явище, при якому у гібридній гетерозиготній особині домінантна ознака проявляється у більшій степені, ніж у гомозиготі. Як правило, під наддомінуванням розуміють більшу пристосованість гетерозигот до факторів зовнішнього середовища у порівнянні з обома гомозиготами. Тоді прикладом наддомінування може бути система збалансованих леталей у дрозофіли Curly-Plum (Cy-Pm).

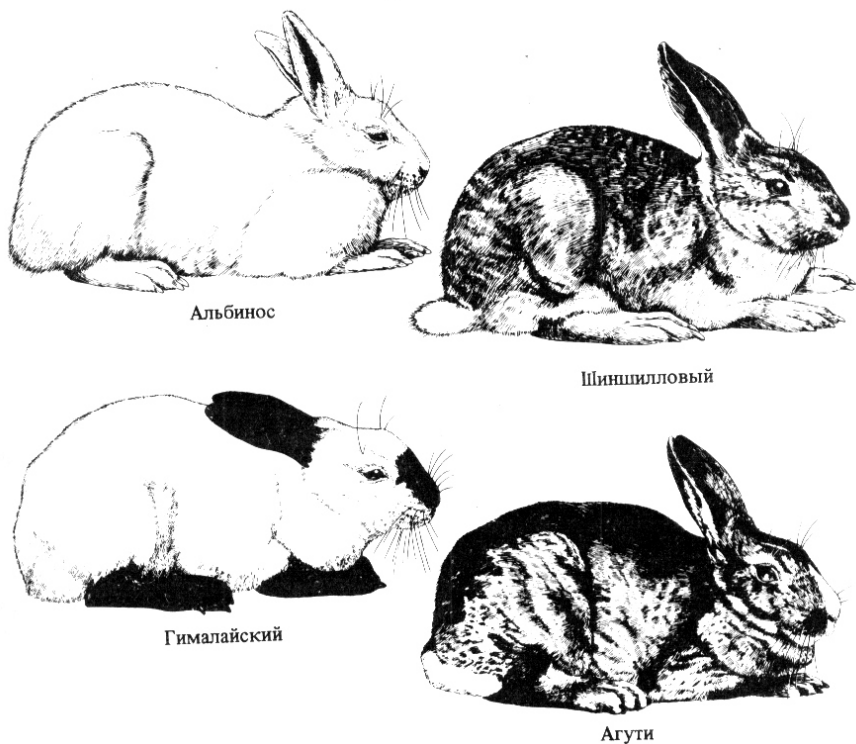


Рис. 5. Різні фенотипи кроликів обумовлені компаундами альбіністичної серії алелей.

**Множинний алелізм** – явище, при якому в популяції наявні не два, а більше алельних станів якогось певного одного і того ж гена. При цьому кожна окремо взята диплоїдна особина

несе тільки два алелі, а в гаметі – тільки один алель. Прикладом множинного алелізму, крім системи алелей АВО груп крові людини, може бути успадкування забарвлення шерсті у кроликів – альбіністична серія алелей. Альбіністичну серію утворюють такі гени:

$c^+$  - обумовлює дикий тип (забарвлення дикого типу може бути різне, обумовлене іншими генами, що не алельні генам альбіністичної серії, наприклад, темне, рівномірне, або агуті – забарвлення, при якому кожна волосина забарвлена нерівномірно – середина жовта, а кінці чорні),  $c^{ch}$  – обумовлює забарвлення шиншила,  $c^m$  - обумовлює забарвлення мардер,  $c^h$  – обумовлює забарвлення гімалайське,  $c^a$  – обумовлює забарвлення альбінос. Ген дикого типу повністю домінує над іншими генами, а ген забарвлення шиншила неповністю домінує над іншими генами і у гетерозиготи виникає забарвлення, що відрізняється від забарвлення шиншила і близьке до світло-сірого. Загалом, система домінування у цій серії така:

$$c^+ > c^{ch} \geq c^m > c^h > c^a$$

Іншим прикладом множинного алелізму є серія алелей забарвлення кукурудзи, що обумовлюється пігментом антоціану – відомо 20 варіантів гену  $r - r^1, r^2, \dots, r^{20}$ .

Наступний приклад множинного алелізму – серія алелей, що обумовлюють забарвлення очей у дрозофіли. Відомо більше 20 генів, що обумовлюють колір очей від червоного (дикий тип) до білого.

Яскравим прикладом явища множинного алелізму є гени самостерильності рослин. Так, у тютюну є 30 алелів гену самостерильності  $s (s^1, s^2, s^3, \dots, s^{30})$ . Гени самостерильності подавляють проростання пилку або ріст пилкової трубки, коли один і той же алель присутній і в пилку, і в рослині, що запилюється. Так, пилко  $s^1$  не може запилити рослини  $s^1 s^2$  чи  $s^1 s^3$ , але може запилити рослини  $s^2 s^3$ . У конюшини аналогічна серія нараховує більше 200 алелей. Ці гени необхідні в першу чергу для блокади самозапилення і підвищення гетерозиготності особин в популяції.

Різні комбінації генів при множинному алелізмі називаються **компаунди**.

Ще один тип взаємодії алельних генів – **міжалельна комплементация** – спостерігається у компаундів. Якщо продуктом мутантного гена а слугує поліпептид, який є субодиницею білка-гомомультимера (значно рідше – гетеромультимера), то поєднання у компаунда двох рецесивних алельних генів, кожен з яких кодує мутантний поліпептидний ланцюг, іноді призводить до відтворення ознаки дикого типу, бо із двох типів частково ушкоджених субодиниць збирається четвертинний білок з майже нормальною функцією.

Вищеописані явища не дозволяють за безпосередніми спостереженнями судити про генетичну будову організму, тому розрізняють поняття:

**Фенотип** – сукупність ознак організму, що можуть бути безпосередньо виявлені.

**Генотип** – сукупність генів організму, його генетична будова.

**Гомозигота** – організм, який має два однакових алелі з якої-небудь пари алелів.

**Гетерозигота** – організм, який має два різних алелі з якої-небудь пари алелів.

**Гемізігота** – організм, який має лише один алель з якої-небудь пари алелів.

### **Основні генетичні позначення**

A – домінантний алель.

a – рецесивний алель.

Aa – гетерозигота.

AA, aa – гомозиготи.

P: - батьківське покоління.

F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> – перше, друге покоління нащадків.

c<sup>+</sup> або + - алель дикого типу.

c<sup>+</sup> c<sup>ch</sup> або c<sup>+</sup> / c<sup>ch</sup> – диплоїдний генотип.

Aa Bb – гени розташовані в різних хромосомах, комбінуються незалежно.

Ac / aC – гени розташовані в одній хромосомі, комбінуються зчеплено.

### Дигібридне і полігібридне схрещування

Дигібридне схрещування – це схрещування, в якому вивчається успадкування одночасно двох пар генів.

При дигібридному, тригібридному чи полігібридному схрещуванні виникають нові комбінації генів чи ознак, що відсутні у батьківському поколінні. Такий процес називається **рекомбінація**. Прикладом рекомбінацій може бути успадкування ознак кольору клітин і наявності очка у хламідомонади.

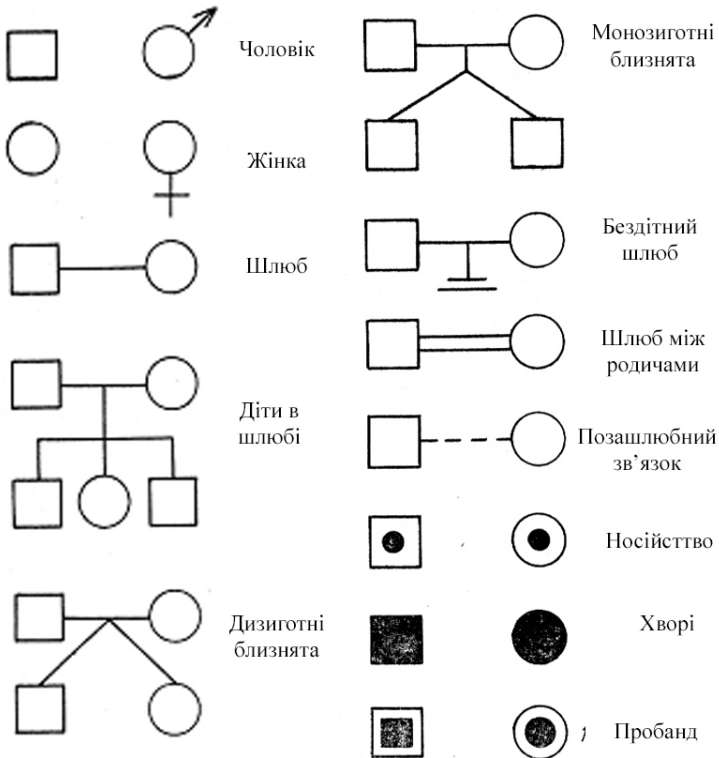


Рис. 6. Основні генетичні позначення при складанні родоводів.



Якщо ми схрестимо хламідомонаду зелену, очко наявне з хламідомонадою жовтою, без очка отримаємо нащадків з новими комбінаціями цих ознак: отримаємо, крім особин з ознаками, що були у батьків хламідомонад жовтих, очко наявне; зелених, без очка. (Нагадую, хламідомонади істоти гаплоїдні, диплоїдна тільки зигота).

G – ген, що обумовлює зелений колір клітин

g – ген, що обумовлює жовтий колір клітин

H – ген, що обумовлює наявність очка

h – ген, що обумовлює відсутність очка

P: GH X gh

GgHh – зигота

F<sub>1</sub>: GH, Gh, gH, gh

Розщеплення обох пар генів при дигібридному схрещуванні відбувається незалежно, якщо ці гени розташовані у різних хромосомах. Прикладом такого незалежного комбінування є успадкування забарвлення личинок та імаго у тутового шовкопряда.

P – темні смуги на гусені (Т)

p – світла гусень (С)

B – білий метелик (Б)

b – метелик з темною каймою на крилах (К)

P: ♀ PP BB X ♂ pp bb

F<sub>1</sub> : Pp Bb – всі Т Б

F<sub>2</sub> :

	PB	Pb	pB	pb
PB	PPBB Т Б	PPBb Т Б	PpBB Т Б	PpBb Т Б
Pb	PPBb Т Б	PPbb Т К	PpBb Т Б	Ppbb Т К
pB	PpBB Т Б	PpBb Т Б	ppBB С Б	ppBb С Б
pb	PpBb Т Б	Ppbb Т К	ppBb С Б	ppbb С К

Розщеплення 9:3:3:1

Зчеплення генів – явище, при якому гени розташовані в одній хромосомі, порушує закон незалежного комбінування.

Методи схрещування лежать в основі гібридологічного аналізу. Крім моногібридних, дигібридних, тригібридних, полігібридних розрізняють ще такі типи схрещувань:

**1) реципрокне схрещування** – схрещування двох форм між собою в двох протилежних напрямках, наприклад: ♀P<sub>1</sub> X ♂P<sub>2</sub> і ♀P<sub>2</sub> X ♂P<sub>1</sub>;

**2) зворотне схрещування (бекрос)** – схрещування нащадків першого покоління гібридів з однією з батьківських форм;

**3) аналізуюче схрещування** – схрещування з резесивною гомозиготою (аналізатором).

### **Лекція III. ПРИЧИНИ ВІДХИЛЕННЯ ВІД ЗАКОНІВ МЕНДЕЛЯ**

Розрізняють дві групи причин відхилення від законів Менделя:

- 1) Відхилення внаслідок причин, що не зачеплюють механізм успадкування – статистичні причини.
- 2) Відхилення внаслідок причин, що зачеплюють механізм успадкування: зчеплення зі статтю, зчеплення генів. Успадкування через цитоплазму, кросинговер, диференційна летальність, наявність генів-модифікаторів та інше.

#### **Статистичні причини**

Розщеплення завжди виявляється посередньо – за числовим співвідношенням фенотипічних класів. Дія генетичних законів завжди ускладнюється законами, що управляють будь-якими випадковими процесами, тому результати схрещувань мають статистичний характер. Існує певна імовірність того, яка саме гамета може з'єднатись з іншою гаметою. Існують розміри можливих відхилень від теоретично очікуваного співвідношення у нащадків, які викликаються

статистичними причинами, та існує метод визначення, чи ці відхилення вкладаються у ці розміри.

Для перевірки висунутої гіпотези про механізм успадкування існують спеціальні методи. Один із цих методів – метод "хі-квадрат" або метод Пірсона. Критерій "хі квадрат" - критерій Пірсона вираховується за формулою:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

Де : O – фактично спостережене число особин в даному класі.

E – теоретично очікуване число особин в даному класі.

Для перевірки, в якій мірі спостережене розщеплення відповідає теоретично очікуваному результату, використовують спеціальну таблицю. Як правило, у задачах з генетики беруть значення ймовірності 0,05. Якщо значення "хі-квадрат" більше ніж у стовпчику, що відповідає ймовірності 0,05, то розщеплення не відповідає гіпотезі, відхилення не є випадковим. Якщо значення "хі-квадрат" менше ніж у стовпчику, що відповідає ймовірності 0,05, то розщеплення відповідає гіпотезі, відхилення є випадковим. Число степенів свободи рівне числу фенотипічних класів, зменшеному на один. Якщо у розпорядженні дослідника мала вибірка (менше 10 особин), необхідно при вирахуванні "хі-квадрат" вносити поправку Йейтса – зменшення на 0,5 кожної різниці (O – E).

### Диференційована смертність

Диференційовану смертність можуть спричинювати певні гени. Гени, що викликають загибель організму на певних стадіях розвитку, називаються **летальними генами (летелями)**. Прикладом летальних генів є ген жовтого забарвлення шерсті у мишей. При схрещуванні жовтих мишей ми завжди будемо отримувати розщеплення 2:1 (жовтих:чорних) і ніколи не зможемо вивести чисту лінію жовтих мишей. Це пояснюється

тим, що гомозиготи по гену жовтого забарвлення гинуть ще у ембріональному розвитку.

Y – ген, що обумовлює жовту шерсть мишей (Ж)

y – ген, що обумовлює не жовту шерсть мишей, наприклад, чорну (Ч).

P: ♂ Yy X ♀ Yy

F<sub>1</sub>:

	Y	y
Y	YY леталь, гинуть	Yy жовті
y	Yy жовті	yy чорні

Подібна дія летальних генів, коли вони є летальними виключно у гомозиготі, називається **рецесивна летальна дія**.

Другим прикладом летальних генів є ген, що обумовлює сіре забарвлення каракуля. Цей ген – домінуючий, у гомозиготі – летальний. Ss – сірий каракуль, ss – чорний каракуль, SS – леталь.

Крім летальних генів, відомі ще напівлетальні гени.

**Напівлетальні гени** – це гени, що в тій чи іншій мірі знижують життєздатність організму, але не призводять до 100 % смертності особин, що є носіями цих генів.

Іноді межа між летальними, напівлетальними і нормальними генами умовна – залежить від факторів зовнішнього середовища. Прикладом цього є мутація короткокрилості у дрозофіли – в одних умовах такий генотип є летальним, в інших умовах – напівлетальним і в умовах лабораторії ми можемо створити умови, при яких цей генотип не буде впливати на життєздатність. Напівлетальні гени бувають рецесивними і домінуючими. Летальні гени з одного боку зменшують продуктивність їх носіїв, але вони не зникають з популяції по тій причині, що часто життєздатність гетерозигот вища, ніж обох гомозигот.

## Неповне проявлення генів

**Неповне проявлення генів** – це явище, при якому дія гена на ознаку виявляється тільки при певних умовах середовища або в залежності від наявності чи відсутності інших генів. Прикладом є успадкування кольору квітів у китайської примули: китайська примула має рослини з білими і рожевими квітами. Ген рожевих –  $p^+$  квітів домінує над геном білих квітів  $p$  ( $p^+ > p$ ). Але ген  $p^+$  проявляється тільки при температурах, нижчих за  $30^0\text{C}$ . Якщо ж температура вища за  $30^0\text{C}$  – квіти у цієї рослини будуть білі, навіть при генотипі  $p^+p^+$ . Якщо ж температура буде коливатися біля  $30^0\text{C}$ , то рослини з рожевими і білими квітами будуть спостерігатися у дуже різних співвідношеннях від 3:1 до 0:1.

## Вплив зовнішніх умов на характер домінування

Зовнішні умови можуть впливати на характер домінування – при певних умовах домінантні гени можуть перетворюватись на рецесивні. Прикладом цього явища є успадкування забарвлення тіла у дрозофіл. У дрозофіл є ген  $e$  (чорного тіла) – обумовлює чорне забарвлення тіла і його алель  $e^+$  – обумовлює дикий тип забарвлення тіла – сірий. При нормальних температурних умовах ( $t = 14 - 21^0\text{C}$ ) ген  $e$  (чорного тіла) проявляє часткове домінування над геном дикого типу ( $e^+$ ). При температурах  $t = 21-25^0\text{C}$  гетерозигота мало відрізняється від дикого типу, а при  $t = 26 - 29^0\text{C}$  ген  $e$  з домінантного перетворюється у рецесивний.

## Гени-модифікатори

**Гени-модифікатори** – це неалельні гени, які впливають на інші неалельні їм гени і фенотипічно проявляються по такій дії. Прикладом дії генів-модифікаторів може бути успадкування жилкування крил у дрозофіли. У дрозофіли є рецесивний ген  $vti$ , що викликає редукцію поперечних жилок крила дрозофіли. Ген дикого типу  $vti^+$  викликає розвиток нормального жилкування крил. Але на прояв гену  $vti$  впливають гени-модифікатори, які дуже ускладнюють успадкування. Серед генів-модифікаторів можна виділити дві великі групи генів: **гени-інтенсифікатори** –

гени, що стимулюють функцію інших генів; **гени-супресори** – гени, що пригнічують функцію інших генів.

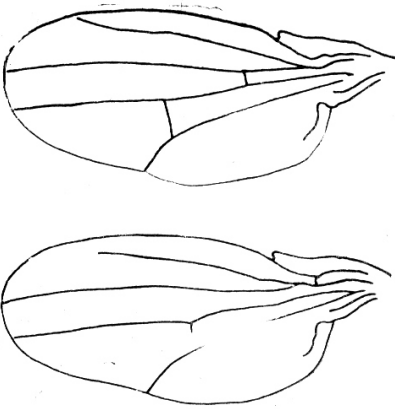


Рис. 7. Нормальне крило дрозофіли і крило, що проявляє ознаку *vti*.

### Гени-супресори

Значне відхилення від чисельних співвідношень фенотипічних класів простежується при розщепленні, якщо дві або більше пари генів діють на одну і ту ж ознаку організму.

Зокрема, до таких генів належать гени-супресори.

**Гени-супресори** – це гени, в присутності яких не можуть проявлятися інші неалельні їм гени, причому, такі гени-супресори не виявляють ніякої іншої дії на фенотип.

Прикладом гена-супресора є явище прояву гена пурпурного забарвлення очей у дрозофіли (*rg*). Цей ген рецесивний і в гомозиготі *rgrg* зумовлює розвиток пурпурних очей. У гетерозиготі – *rg+rg* забарвлення очей нормальне (дикий тип – червоні очі). Але ген *rg* проявляється тільки тоді, якщо в геномі присутній ген-супресор дикого дипу *su+*. Якщо в гомозиготі наявний ген-супресор *su su*, то відбувається супресія – подавлення прояву гена *rg* і у гомозиготі *rg rg* пурпурного забарвлення очей немає – очі дикого типу. Тобто ген *su* є супресором гена *rg*. При схрещуванні гетерозигот розщеплення по фенотипу буде 13:3.

Бувають випадки, коли ген-супресор має прояв у фенотипі і в той же час служить супресором неалельного йому гена, що зачіпає ту ж ознаку. Таке явище називається **епістаз**. Ген-супресор в цьому випадку називається **епістатичним**, а ген, прояв якого подавлено, називається **гіпостатичним**.

Прикладом епістазу є успадкування масті у коней. Ген В обумовлює чорну масть, алельний йому ген в обумовлює руду масть, ген С обумовлює раннє посивіння, а його рецесивний алель с – відсутність раннього посивіння. Тоді при генотипах ВВ сс, Вв сс - чорна масть, вв сс – руда масть, при наявності домінантного гена С відбувається епістаз і утворюється при генотипах ВВ Сс, вв Сс і т. д. – сіра масть.

Приклад дії генів-супресорів:

P: ♀ pr pr su+ Su+ X ♂ pr+ pr+ su su  
                     пурпурні                    червоні

F1: ♀ pr+ pr su+ su X ♂ pr+ pr su+ su  
                     червоні                    червоні

F2:

	pr+ su+	pr+ su	pr su+	pr su
pr+ su+	pr+pr+su+ su+ червоні	pr+ pr+su+ su червоні	pr+ pr su+ su+ червоні	pr+ pr su+ su червоні
pr+ su	pr+ pr+ su+ su червоні	pr+ pr+ su su червоні	pr+ pr su+ su червоні	pr+ pr su su червоні
pr su+	pr+ pr su+su+ червоні	pr+ pr su+su червоні	pr pr su+ su+ пурпурні	pr pr su+ su пурпурні
pr su	pr+ pr su+ su червоні	pr+ pr su su червоні	pr pr su+ su пурпурні	pr pr su su червоні

Розщеплення - 13:3

Іншим прикладом епістазу є успадкування забарвлення плодів у гарбуза. У цієї рослини ген W обумовлює біле забарвлення плодів, ген w – пігментне забарвлення плодів, ген Y – жовте забарвлення плодів, ген y – зелене забарвлення плодів. При генотипах WwYY, Wwyy – плоди будуть білі, а при генотипах wwYy – жовті, wwyy – зелені. Розщеплення при схрещуванні гетерозигот буде 12:3:1.

Якщо епістатичну дію проявляє рецесивний ген, то таке явище називається **криптомерія**. Прикладом криптомерії є успадкування забарвлення шерсті у миші домашньої. Забарвлення дикого типу миші домашньої – це забарвлення агуті – зональне

забарвлення кожної волосини – основа і кінчик чорні – середина – жовта. Це забарвлення у миші обумовлюється домінантним геном А. У гетерозиготі Аа – забарвлення агуті, у рецесивній гомозиготі аа – суцільне (рівномірне) забарвлення. Але наявний ще один ген, що впливає на ту ж ознаку. Домінантний ген С викликає розвиток пігменту, а у рецесивній гомозиготі сс – пігмент шерсті не синтезується – виникають альбіноси. Ген с проявляє криптомерію по відношенню до гена А – навіть у гомозиготі ААсс забарвлення агуті не виникає – виникає суцільне біле забарвлення шерсті. При схрещуванні гетерозигот розщеплення буде 9:3:4 (агуті:чорних:білих). Забарвлення особин з генотипами ААсс, Аасс, аасс буде однакове – біле, бо ген с супресує прояв генів А і а. Буває ще подвійний рецесивний епістаз або подвійна криптомерія, коли аа > С, сс > А.

Приклад епістазу: успадкування масті коней

P: ♀ AA cc X ♂ aa CC  
 чорні              сірі

F1: ♀ Aa Cc X ♂ Aa Cc  
 сірі              сірі

F2:

	AC	Ac	aC	ac
AC	AA CC сірі	AA Cc сірі	Aa CC сірі	Aa Cc сірі
Ac	AA Cc сірі	AA cc чорні	Aa Cc сірі	Aa cc чорні
aC	Aa CC сірі	Aa Cc сірі	aa CC сірі	aa Cc сірі
ac	Aa Cc сірі	Aa cc чорні	aa Cc сірі	aa cc руді

Розщеплення – 12:3:1



Приклад криптомерії: забарвлення шерсті мишей

P: ♀ ААСС X ♂ аасс

агуті білі

F1: ♀ АаСс X ♂ АаСс

агуті агуті

F2:

	АС	Ас	аС	ас
АС	ААСС агуті	ААСс агуті	АаСС агуті	АаСс агуті
Ас	ААСс агуті	ААсс білі	АаСс агуті	Аасс білі
аС	АаСС агуті	АаСс агуті	ааСС чорні	ааСс чорні
ас	АаСс агуті	Аасс білі	ааСс чорні	аасс білі

Розщеплення – 12:3:4

Прикладом взаємодії неалельних генів є також **комплементарні гени** – неалельні гени, яких вимагається два або більше для розвитку однієї ознаки. Прикладом комплементарних генів є гени, що обумовлюють колір у плодів баклажанів. У баклажанів плоди бувають темно-синього і білого кольору. Темно-синє забарвлення плодів виникає тоді, коли рослина несе два домінуючих гени Р і D. Тоді при генотипах DDpp, ddPP – розвиваються білі плоди, а при генотипі DdPp – темно-сині плоди. При схрещуванні гетерозигот розщеплення по фенотипах буде 9:7 (білі:сині).

Іншим прикладом комплементарних генів є гени, що обумовлюють забарвлення личинок індійського дубового шовкопряда. Личинки у цього метелика бувають блакитні (генотип B\_S\_yy), зелені (B\_S\_Y\_), жовті (bbS\_Y\_, bbssY\_), мигдальні (bbS\_yy, B\_ssyу, bbssyy). При схрещуванні комах з жовтими личинками з комахами з мигдальними личинками у нас може виникнути розщеплення 27:21:9:7.

Третім прикладом комплементарних генів може бути успадкування форми стручка у рослини “трицики”. Стручки овальної форми розвиваються тільки при наявності двох рецесивних генів у гомозиготі – aabb. У всіх інших випадках розвиваються стручки трикутної форми. Розщеплення по фенотипах при схрещуванні гетерозигот буде 15:1 (трикутні:овальні).

Приклад комплементарності – схрещування баклажанів з різним кольором плодів:

P: ♀ PPDD X ♂ ppdd  
           сині          білі

F1: ♀ PpDd X ♂ PpDd  
           сині          сині

F2:

	PD	Pd	pD	pd
PD	PPDD сині	PPDd сині	PpDD сині	PpDd сині
Pd	PPDd сині	PPdd білі	PpDd сині	Ppdd білі
pD	PpDD сині	PpDd сині	ppDD білі	ppDd білі
pd	PpDd сині	Ppdd білі	ppDd білі	Ppdd білі

Розщеплення – 9:7

Це все приклади **однозначних комплементарних генів** – комплементарних генів, що визначають розвиток однієї ознаки.

Крім них, є ще **полімерні адитивні (кумулятивні) гени** – неалельні гени, що однаково впливають на на одну і ту ж ознаку, але мають адитивну – сумуючу дію. Тоді степінь вираження ознаки залежить від числа присутніх в генотипі полімерних генів. Прикладом полімерних генів є гени, що визначають форму плода у гарбуза. Гарбуз має незалежні, неалельні гени G і D, кожен з яких збільшує діаметр плоду

гарбуза. Тоді при генотипах  $G\_D\_$  виникає плід дисковидної форми,  $GGdd$ ,  $ggDD$  - сферичної форми,  $ggDd$ ,  $Ggdd$  - кульовидної форми,  $ggdd$  - видовженої форми. І при схрещуванні гетерозигот виникає розщеплення 9:6:1, а при врахуванні всіх тонкощів варіації форми плода - 9:2:4:1.

В процесі взаємодії генів можна виділити дві групи явищ - полімерію і плейотропію.

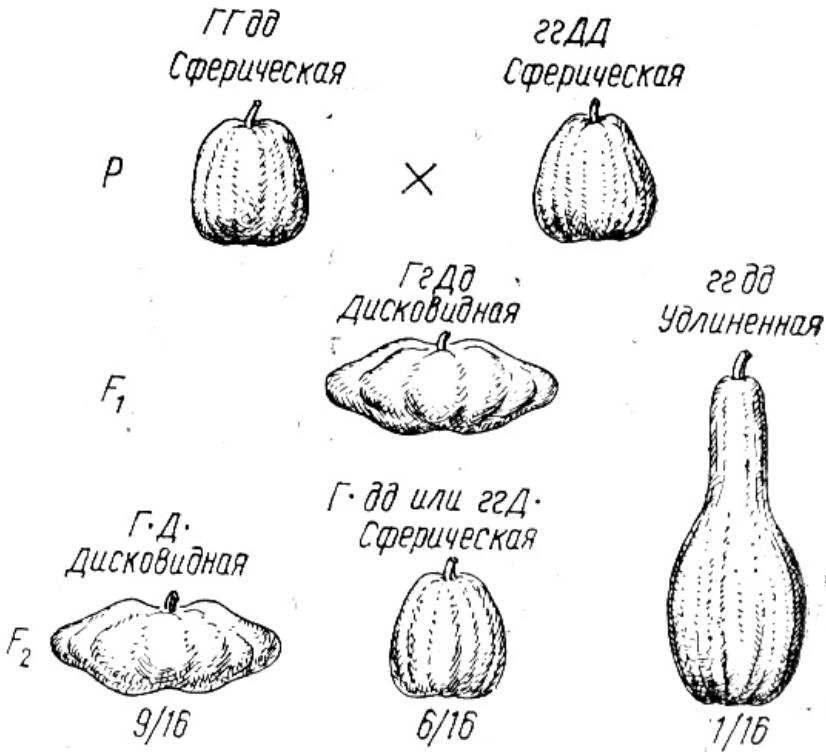


Рис. 8. Різні форми плодів гарбуза, обумовлені дією полімерних адитивних генів.

**Полімерія** – група явищ, при яких кілька генів діють на одну і ту ж ознаку. Розрізняють некумулятивну (дія генів не сумується) і кумулятивну (дія генів сумується) полімерії.

**Плейотропія** – група явищ, при яких один ген діє на кілька ознак. Виявлено деякі гени, які діють на величезну кількість ознак, докорінно змінюють весь фенотип.

Іноді в геномі утворюються внаслідок дуплікацій зіпсовані копії генів, що не експресуються. Такі гени називаються **псевдогени ( $\psi$ -генів)**.

Всі описані вище відхилення від класичних розщеплень стосуються тільки фенотипічних класів. Розщеплення по генотипах у віх цих випадках відбувається згідно законів Менделя. Ніяких порушень механізму успадкування тут немає.

## **Лекція IV. ЦИТОЛОГІЧНІ ОСНОВИ СПАДКОВОСТІ**

### **Цитогенетика**

У 1902 році вчені Саттон і Бовері створили хромосомну теорію спадковості. Вони простежили паралелі між поведінкою хромосом у мейозі і поведінкою генів. Зв'язок між конкретними генами і конкретними хромосомами продемонстрував Томас Морган у 1910 році на *Drosophila melanogaster*.

Тоді ж виникла **цитогенетика** – наука про цитологічні основи спадковості. Ще у кінці XIX століття Вайсман, Гертвіг, Страсбургер висунули гіпотезу про те, що спадкові ознаки передаються через ядро. Для доведення цього Герберт здійснював досліди по гібридизації морських їжаків, а Астауров здійснив досліди з шовкопрядами.

Досліди Астаурова полягали в тому, що незапліднені яйця шовкопряда опромінювали рентгенівськими променями – материнське ядро гинуло. Для комах властива фізіологічна поліспермія – явище, при якому одну яйцеклітину запліднюють кілька сперматозоїдів. В цьому досліді після загибелі материнського ядра двох спермійів зливались між собою і утворювали ядро зиготи. Тобто в цьому досліді ядро було виключно батьківське, а цитоплазма – материнська. Утворювалась так звана **андрогенетична зигота** – зигота, що утворилась внаслідок злиття ядер двох спермійів. В результаті

розвитку цієї зиготи утворювались організми, які точно відтворювали фенотип батька. Це явище отримало назву – **андрогенез** – розвиток організму з зиготи, ядро якої утворилося внаслідок злиття ядер двох спермій. Ці досліди Астауров продовжив, використовуючи міжвидову гібридизацію, брав яйця мандаринового шовкопряду і спермії тутового шовкопряду. Із андрогенетичних зигот розвивались виключно особини тутового шовкопряду і виключно самці. Пізніше проводились досліди із пересадкою ядер у земноводних – ядро одного виду земноводних пересажували у яйцеклітини іншого виду земноводних. Ці досліди не виявили ніякого впливу цитоплазми

на спадковість. Аналогічні досліди були проведені і з амебами.

Здійснювали пересадку ядер амеб, що належали до різних штамів. **Штами** – це раси одноклітинних організмів.

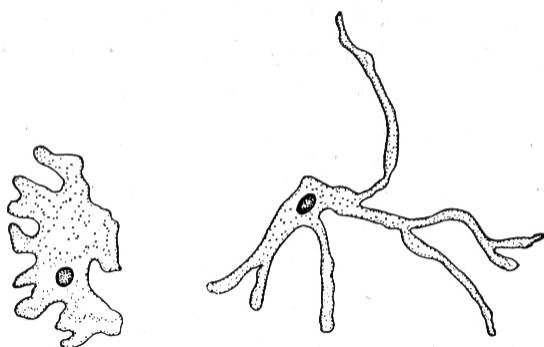


Рис. 9. Різні штамми амеб, що відрізняються морфологічно.

### Число і будова хромосом

Кожний вид еукаріот характеризується певним числом хромосом. Частіше гаплоїдні набори становлять від 5 до 30 хромосом, але є винятки: є види, що мають тільки одну хромосому і є види, що мають кілька сотень хромосом. Приклади гаплоїдних наборів хромосом наведені у таблиці 1.

В гаплоїдному наборі кожна хромосома має сувору індивідуальність, що проявляється навіть у грубій морфології хромосом. Кожна хромосома має **первісну перетяжку**, в якій розташована центромера (місце прикріплення кінетохору) і яка ділить хромосому на два плеча.

Табл. 1. Гаплоїдні набори хромосом різних видів еукаріот.

№ п/п	Вид	Число хромосом гаплоїдного набоу
1	хламідомонада	16
2	нейроспора	7
3	капуста	9
4	картопля	24
5	жито	7
6	Пшениця м'яка	21
7	рис	12
8	сосна	12
9	радіолярія	>800
10	Малярійний плазмодій	1
11	Муха кімнатна	6
12	Миша	20
13	собака	39
14	кінь	33
15	шимпанзе	24
16	людина	23

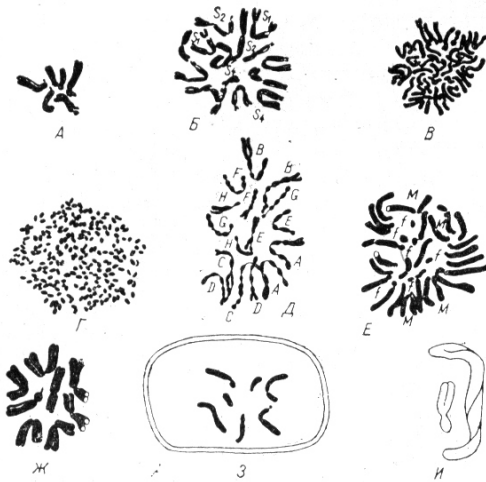


Рис. 10. Хромосоми різних квіткових рослин. А – скерди зеленої, Б – жита, В – м'якої пшениці, Г – німфеї гігантської, Д – жовтеця малого, Е – плямистика царського, Ж – цибулі, З – віночник в'їчастий, И – бульбоочеретяник приморський.

Хромосоми по грубій морфології прийнято класифікувати на:

**Метацентричні хромосоми** – хромосоми, що мають два однакових плеча. У людини – це хромосоми 3 (група А), групи F – 19, 20.

**Субметацентричні хромосоми** – хромосоми, у яких є коротке (p) і довге (q) плече. У людини – це хромосоми 1, 2 (група А), групи В – 4, 5, Групи С – 6 – 12 та Х хромосоми, групи Е – 16 – 18 хромосоми.

**Акроцентричні хромосоми** – хромосоми, що мають дуже коротке (p) плече у вигляді нитковидного придатка або супутника. У людини це хромосоми групи D – 13 – 15 хромосоми та групи G – 21, 22 та У хромосоми.

**Телоцентричні хромосоми** – хромосоми, що взагалі не мають короткого плеча – тільки довге. У людини телоцентричних хромосом немає.

**Супутники хромосом** (або сателіти хромосом) – це тільця, що з'єднані з хромосомою лише тоненькою ниткою і не несуть ніякої генетичної інформації. Наявність, відсутність, величина, кількість супутників хромосом – це все варіанти норми. Хромосоми з супутниками називають SAT-хромосоми.

Поява деяких вторинних перетяжок пов'язана з утворенням ядерця. Ці спеціалізовані ділянки окремих хромосом називають **зонами ядерця** або **ядерцевими організаторами**.

У диплоїдному наборі кожна хромосома представлена парою хромосом. Це **гомологічні хромосоми** – хромосоми-партнери, що належать до однієї пари хромосом. В кожній парі гомологічних хромосом одна походить від батька, інша від матері. Хромосоми різних пар називають гетерологічними хромосомами.

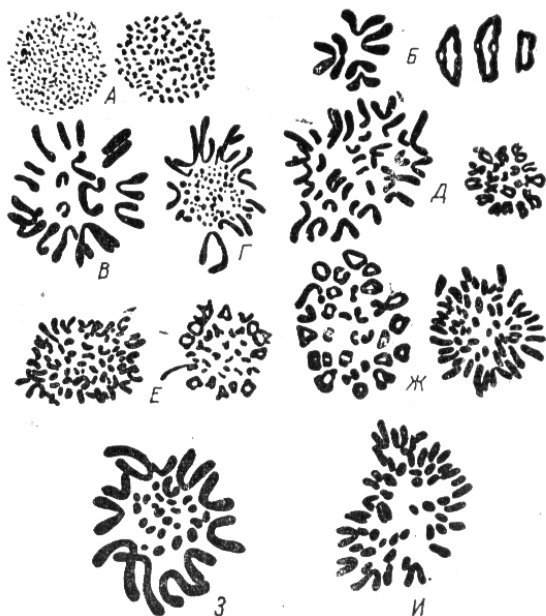


Рис. 11. Хромосоми різних видів тварин. А – річковий рак, Б – комар звичайний, В – щука, Г – курка, Д – кішка, Е – кінь, Ж – бик, З – саламандра, И – вівця.

Груба морфологія хромосом настільки індивідуальна для кожного виду еукаріот, що часто лише по одній хромосомній пластинці можна визначити, до якого

виду належить клітина, яку досліджують. У зв'язку з цим був запропонований термін **каріотип** – характерні для кожного виду особливості хромосомного набору, що стосуються числа, розмірів і форми хромосом. Каріотип певної особини або даного виду може бути представлений у вигляді схеми – **ідіограми**, на якій пари гомологів розташовуються рядами у порядку зменшення розмірів. Спеціальні методи диференційного забарвлення (G-, C-, R-забарвлення) хромосом дозволяють виявити в хромосомах **еухроматин** – нещільно упаковані ділянки хромосом та **гетерохроматин** – щільно упаковані ділянки хромосом. Гетерохроматин зосереджений в основному в області центромер, теломер, супутників хромосом. Гетерохроматин ділиться на конститутивний і факультативний.

**Конститутивний гетерохроматин** – це постійно існуючий у певних ділянках гетерохроматин.

**Факультативний гетерохроматин** – це гетерохроматин, що з'являється тільки у певні періоди життя клітини.



Кожна хромосома, кожна ділянка хромосоми має сувору індивідуальну картину смуг гетеро- і уехроматину.

У багатьох видів живих істот, крім постійних компонентів каріотипу – так званих **А-хромосом** – в ядрах деяких особин даного виду виявляються ще додаткові **В-хромосоми**. Часто вони складаються з гетерохроматину, і їх кількість з віком може збільшуватись, іноді до кількох десятків. Спостереження на рослинах (кукурудзі) свідчать, що накопичення В-хромосом у клітинах супроводжується зменшенням життєздатності організмів.



Рис. 12. Гігантські політенні хромосоми слинних залоз дрозофіли.

У хромосомах наявні **реплікатори** або **ARS-елементи** – ділянки, з яких починається реплікація (подвоєння) ДНК. У хромосомах дріжджів виявлено кілька сотень таких реплікаторів. Всі вони містять спільну для них послідовність з 11 пар нуклеотидів, головним чином з АТ-пар. Структура реплікаторів видоспецифічна. У профазних хромосомах розрізняють **хромери** – чисельні невеликі

потовщення різної величини на слабкоспіралізованих профазних хромосомах.

У деяких живих істот в окремих органах (наприклад, у слинних залозах комах) зустрічаються так звані **політенні**

**хромосоми** – гігантські хромосоми, які у 100 - 150 разів більші ніж відповідні нормальні хромосоми в інших тканинах. Політенні хромосоми мають характерні смуги – диски, що суворо індивідуальні для кожної хромосоми. Політенні хромосоми утворюються шляхом поділу хромосом без розходження дочірніх хромосом з утворенням пучка хромосом.

Кінцеві ділянки хромосом, що представлені повторами, називаються **теломерами**. Вони не несуть ніякої генетичної інформації і виконують функцію захисту хромосоми з кінців. Теломери містять особливу нуклеотидну послідовність, збагачену GC-парами.

**Центромера** – ділянка ДНК на хромосомі до якої приєднуються нитки веретена поділу. Це сегмент ДНК величиною 1 kb, в якому є ділянка багата AT-парами. Ця ділянка з обох боків невеликими консервативними послідовностями, структура яких дуже важлива для функціонування центромери. Центромери видоспецифічні.

Було запропоноване поняття **геном** – набір генів, що міститься в гаплоїдному наборі хромосом і являє собою у генетичному відношенні одне ціле.

## **Лекція V. ГЕНЕТИКА СТАТІ І ЗЧЕПЛЕНЕ ЗІ СТАТТЮ УСПАДКУВАННЯ**

### **Визначення статі**

Багатоклітинні організми бувають двостатеві (гермафродити) і роздільностатеві. **Двостатевість (гермафродитизм)** – архаїчна форма статевого розмноження, коли одна особина здатна продукувати як чоловічі так і жіночі статеві клітини (гамети). Більш прогресивна форма статевого розмноження – **роздільностатевість** – форма статевого розмноження, при якій одна особина здатна продукувати тільки чоловічі або тільки жіночі статеві клітини. Але навіть при роздільностатевості будь-яка особина лишається потенційно двостатевою, зберігає тенденції до розвитку як у жіночу, так і в

чоловічу сторону. Доказом цього є рідкісні випадки появи жінок фенотипічно цілком нормальних з генотипом ХУ.

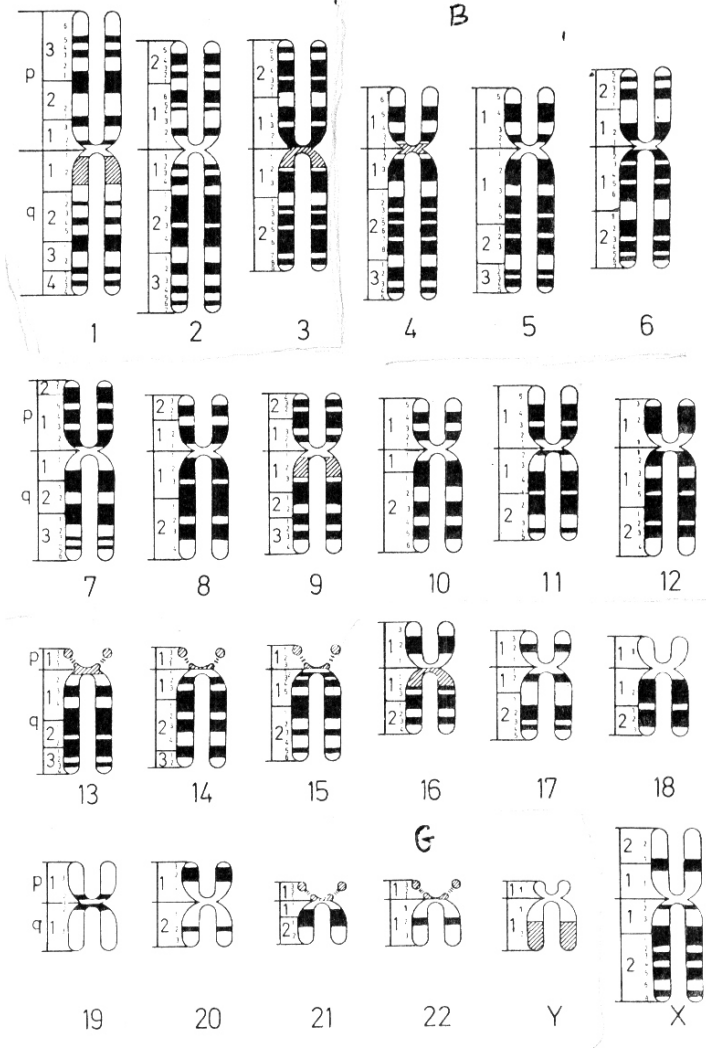


Рис. 13. Хромосоми людини. Схема отримана з використанням диференційного забарвлення хромосом. Варіабельні ділянки заштриховані.

Для розвитку особини певної статі повинно відбутись визначення статі майбутньої особини на самих ранніх етапах розвитку. При роздільностатевості існують три способи визначення статі майбутньої особини – епігамне, прогамне та сингамне визначення статі.

При **епігамному** визначенні статі відбувається визначення статі після запліднення, тенденції до розвитку чоловічої чи жіночої статі обумовлюються чисто зовнішніми причинами. Наприклад, у морського черва *Vonnelia* самці паразитують на самках – дрібні самці живуть у матці самок. Якщо личинка потрапляє на ґрунт – з неї розвивається самка, а якщо личинка потрапляє на хоботок самки – з неї розвивається самець. Другий приклад епігамного визначення статі – *Arizema* японська (*Arizema japonica*). У цієї рослини особини чоловічої статі розвиваються, якщо рослина росте на ґрунті, що бідний на поживні речовини, і розвиваються особини жіночої статі, якщо ґрунт багатий на поживні речовини.

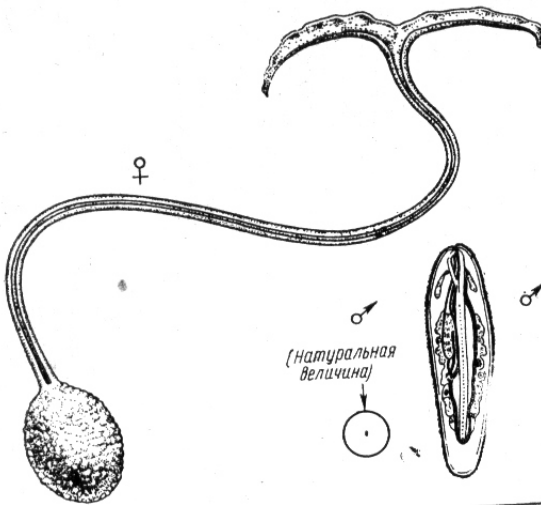


Рис. 14. Морський черв боннелія – приклад епігамного визначення статі (по Добжанському).

При **прогамному** визначенні статі відбувається визначення статі майбутньої особини до запліднення, тобто стать

майбутньої особини залежить від того, які сорти яєць продукують самки – з крупних яєць, що багаті на цитоплазму, розвиваються самки, з дрібних яєць, що бідні на цитоплазму,

розвиваються самці. Такий спосіб визначення статі виявлений у коловерток.

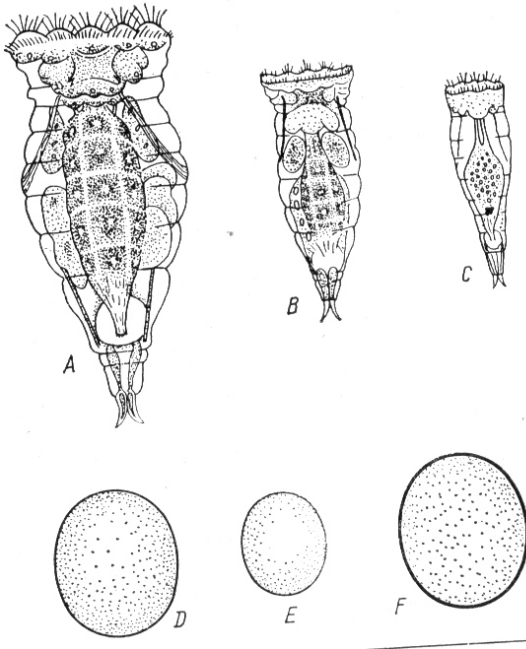


Рис. 15. Коловертка хідантіна. А – доросла самка, В – молода самка, С – самець. Як правило самки відкладають крупні яйця (D), що партеногенетично розвиваються в самок. Але при зміні умов середовища самки відкладають дрібні яйця (E), що завершують мейоз і партеногенетично розвиваються в гаплоїдних самців. Якщо ці яйця

запліднюються, то вкриваються товстою оболонкою (F), зимують і весною розвиваються в диплоїдну самку.

При **сингамному** визначенні статі відбувається визначення статі в момент запліднення – стать визначається сформованим при заплідненні генотипом зиготи і не залежить від зовнішніх умов. При сингамному визначенні статі найпоширенішим варіантом є хромосомне визначення статі – визначення статі при участі статевих хромосом. Але при цьому як в статевих хромосомах, так і в аутосомах розміщені гени, що впливають на визначення статі. Так, у дрозофіли в аутосомі є ген *transformer* (*tra* або *t*) – ген, що змінює (трансформує) стать. При наявності генотипу *tt* зигота жіночої статі з наявністю набору хромосом XX розвивається у фенотипічних самців, які є стерильними (безплідними). При цьому, з неї розвиваються цілком нормальні

плодючі самці. Є гени, які перетворюють однодомні рослини на дводомні, так, ген *silkless* (*sk*) перетворює рослину кукурудзи на таку, що має виключно чоловічі квіти. Ген *tassel seed* (*ts*) перетворює рослину кукурудзи на таку, що має виключно жіночі квіти. Зміна локалізації того чи іншого гена може привести до серйозних порушень у прояві статевих ознак. Ген *sex reserved* (*sxr*) розташований в Y хромосомі ссавців і обумовлює розвиток чоловічої статі. Якщо ген *sxr* випадково переноситься на X хромосому, то розвивається при генотипі XX чоловічий фенотип, але при цьому ці особини є стерильні.

### Стать як менделююча ознака

Ще Мендель помітив, що стать успадковується як будь-яка ознака при моногібридному аналізуючому схрещуванні між гетерозиготними і гомозиготними рецесивними батьками. Розщеплення в цих випадках буде 1:1.

Для виявлення механізмів генетичного визначення статі Коренс проводив гібридизацію різних видів бріонії – рослин з родини *Cucurbitaceae*. Він схрещував дводомну бріонію з білою бріонією. При схрещуванні чоловічих рослин дводомної бріонії і жіночих квітів білої бріонії в першому поколінні було розщеплення 1:1 чоловічих і жіночих рослин. Якщо ж брали жіночі рослини дводомної бріонії і чоловічі квіти білої бріонії, то в першому поколінні отримували тільки жіночі рослини. Коренс зробив висновок, що чоловічі рослини дводомної бріонії є гетерозиготами, а жіночі гомозиготами по певному гену. Домінантний ген *A* визначає чоловічу стать, а рецесивний *a* – жіночу. У білої бріонії є інші гени, що обумовлюють однодомність цього виду.

Були проведені дослідження з рослиною *Ecbalium elaterium*, які показали, що у цієї рослини стать визначається трьома генами:  $a^D > a^+ > a^d$ . Ген  $a^D$  визначає чоловічу стать, ген  $a^+$  – гермафродитизм, ген  $a^d$  – жіночу стать. Генотип  $a^D a^D$  – не існує, бо для його утворення довелось би схрещувати дві чоловічі рослини, генотипи  $a^D a^+$ ,  $a^D a^d$  – обумовлюють чоловічу стать,

генотипи  $a^+ a^+$ ,  $a^+ a^d$  обумовлюють гермафродитизм, генотип  $a^d a^d$  обумовлює жіночу стать.

### Статеві хромосоми

Статеві хромосоми вперше відкрив американський цитолог Вільсон, досліджуючи хромосоми дрозофіли. Він виявив, що у дрозофіли 8 хромосом (4 пари) – 3 пари гомоморфні і четверта пара гетероморфна – у самців одна хромосома аналогічна до обох хромосом самок, а інша хромосома – менша, у вигляді гачка, по формі нагадує літеру Y. Тому цю пару хромосом назвали хромосомами X і Y або статевими хромосомами.

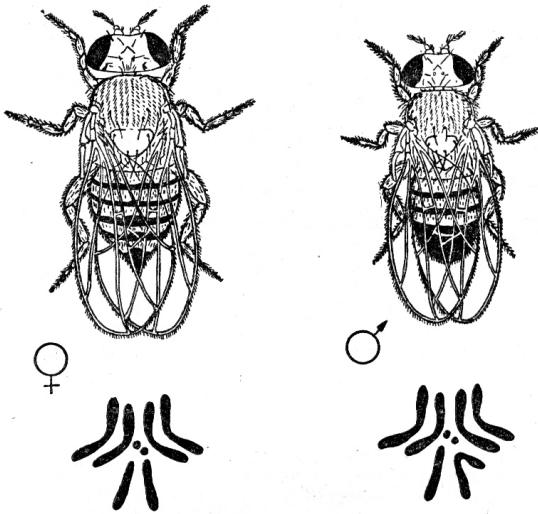


Рис. 16. *Drosophila melanogaster*. Каріотипи самців і самок.

**Статеві хромосоми** – це хромосоми, по яким особини різної статі відрізняються одне від одного. Інші хромосоми називаються

**аутосоми** – це хромосоми однакові у обох статей.

Отже, один із способів визначення статі на рівні хромосом – це система XX/XY. Модифікацією механізму XX/XY є система XX/X0 – при якій у самця є на одну X хромосому менше. Така система визначення статі є, наприклад, у морського черва анциракатуса. Самки мають каріотип 12, XX, а самці 11, X.

У зв'язку з виявленням статевих хромосом почали розрізняти гомогаметну і гетерогаметну стать.

**Гомогаметна стать** – стать, що продукує гамети однакові по відношенню до статевих хромосом (XX).

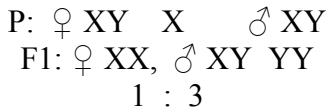
**Гетерогаметна стать** – стать, що продукує гамети різні по відношенню до статевих хромосом (XY).

Але бувають випадки, коли гомогаметною є не жіноча, а чоловіча стать. В такому випадку статеві хромосоми називають Z і W. Такий спосіб визначення статі властивий для метеликів і птахів. Модифікацією цієї системи є система ZZ/ZO. Серед живих організмів більш поширеною є система XX/XY ніж система ZZ/ZW. Поширення обох систем статевих хромосом наведені у табл. 2.

Табл. 2. Системи статевих хромосом у різних живих істот.

№ п\п	XX/XY – XX/X0	ZZ/ZW – ZZ/Z0
1	Черви	Метелики
2	Ракоподібні	Волохокрилі
3	Більшість комах	Деякі риби
4	Деякі риби	Деякі земноводні
5	Більшість земноводних	Плазуни
6	Ссавці	Птахи
7	Більшість дводомних рослин	Деякі рослини (суниця)

У деяких живих істот у визначенні статі є певна специфіка. Так, у багатьох риб, зокрема, у риб з роду менака, під дією гормонів стать особин може змінюватись: самців з набором хромосом XY можна перетворювати у повноцінних самок і навпаки. Причому, ці трансформовані особини здатні брати участь у статевому розмноженні:



У аксолотля під дією гормонів особини ♀ ZW перетворюються у ♂ ZW, що теж можуть вступати у нормальний статевий процес:



$$\begin{aligned}
 P: & \quad \text{♀ } ZW \quad X \quad \text{♂ } ZW \\
 F1: & \quad \text{♀ } ZW \quad WW, \quad \text{♂ } ZZ \\
 & \quad \quad \quad 3 : 1
 \end{aligned}$$

У перетинчастокрилих самки розвиваються із запліднених диплоїдних яєць, а самці розвиваються з незапліднених гаплоїдних яєць. Самці первісно гаплоїдні, але гаплоїдними лишаються тільки клітини зародкової лінії, у інших клітин набір хромосом подвоюється. У перетинчастокрилих є більше 12 алелей гена, що пов'язаний з визначенням статі:  $a_1, a_2, a_3, \dots$  і визначення статі відбувається за схемою:

$$\begin{aligned}
 P: & \quad \text{♀ } a_1 a_2 \quad X \quad \text{♂ } a_1 \\
 F1: & \quad a_1 a_1 \text{ – не розвиваються, } a_1 a_2 \text{ – ♀,} \\
 & \quad a_1 \text{ – ♂, } a_2 \text{ – ♂ (з незапліднених яєць)}.
 \end{aligned}$$

У попелиць відбувається чергування поколінь: партеногенетичне покоління – відбувається розвиток одних самок з диплоїдних яйцеклітин (при мейозі відсутня редукція числа хромосом) – розвиток відбувається без запліднення. Але періодично з незапліднених яєць розвиваються так звані сексупарні самки – самки, що дають нащадків, які розмножуються статевим шляхом. Сексупарні самки продукують яйцеклітини, з яких розвиваються самки і самці (самці розвиваються при втраті яйцеклітиною однієї X хромосоми). При мейозі у самців клітини без X хромосоми дегенерують. При заплідненні утворюються тільки самки, які потім розмножуються партеногенетично.

### Теорії визначення статі

Історично склалися різні теорії визначення статі, які одна одній протирічили. Але потім було встановлено, що у різних живих організмів механізми визначення статі різні, і ці теорії пояснюють визначення статі у різних живих істот.

У свій час була створена **балансова теорія Бріджеса**, яка пояснила, як визначається стать у дрозофіли. Бріджес зробив припущення, що у дрозофіли гени чоловічих потенцій знаходяться в аутозомах, а жіночих у X-хромосомах. Ці припущення підтвердились під час дослідів зі схрещуваннями

триплоїдних самок дрозофіли (такі дрозофіли іноді утворюються, розвиваються і є плодючими) з нормальними самцями. При таких схрещуваннях можуть утворюватись особини з дуже нетиповим співвідношенням статевих хромосом і аутосом. Виявилось, що розвиток статі у дрозофіли залежить саме від співвідношення кількості X-хромосом до набору аутосом, точніше стать визначається балансом генів аутосом і X-хромосом. Так, якщо це співвідношення (S) рівне 1,5 -  $S=X/A=1,5$  то розвивається з такої зиготи так звана суперсамка – особина, у якої статеві ознаки самки гіпертрофовані. Суперсамки, як правило, безплідні. Якщо  $S=X/A=1$ , то розвиваються нормальні самки, якщо  $S=X/A=0,67$  – розвивається інтерсекс – безплідні особини, ознаки яких займають проміжне значення між ознаками самки і самця. Якщо  $S=X/A=0,5$  то розвиваються нормальні самці. Якщо  $S=X/A=0,33$  розвиваються суперсамці, які є безплідними. У людини визначення статі не залежить від кількості X-хромосом, залежить від наявності конкретних генів, що визначають стать.

На протигагу цій теорії була створена **фізіологічна теорія Гольдшмідта**. Цю теорію Гольдшмідт створив, опираючись на досліди зі схрещування різних географічних рас непарного шовкопряда, що відрізняються статевими потенціями. Європейська раса за цими потенціями є квола, японська – сильна. Було проведено схрещування самок європейської раси з самцями японської раси. В результаті в першому поколінні утворились самки, які були інтерсексами. Було зроблено висновок, що для становлення статі у непарного шовкопряда визначальною є ступінь експресії тих чи інших генів, що визначають тип статевого розвитку.

### **Особливості визначення статі у ссавців**

Розвиток статі у ссавців – процес, що складається з двох етапів. Хромосомний склад ядра визначає статеву диференціацію гонад або в сім'яники або в яєчники. Сім'яники продукують тестостерон, у цьому випадку розвиток іде по чоловічому типу. Інший гормон сім'яників  $\chi$ -фактор подавлює

розвиток яєчників і фаллопієвих труб. Отже, розвиток сім'яників і продукція чоловічих гормонів – результат експресії генів Y-хромосоми. Найважливіше значення при цьому має домінуючий ген Sex reserved (Sxr). Розвиток зигот за чоловічим типом можливий лише за наявності продукту зчепленого з X-хромосою гена Tfm<sup>+</sup>, що обумовлює утворення зв'язуючого тестостерон протеїну, який є в цитоплазмі клітин як самців так і самок. Цей білок виконує функцію регулятора, який активується, зв'язуючи тестостерон. Комплекс білок-тестостерон входить в ядро і активує гени, необхідні для диференціації клітин за чоловічим типом. Відомий синдром, що називається тестикулярна фемінізація (синдром Моріса). Клітини мутантних ембріонів X<sup>Tfm</sup>Y абсолютно нечутливі до дії тестостерону, тому в таких випадках при генотипі XY розвивається жіночий фенотип. Ці жінки зовні не відрізняються від нормальних жінок, але є безплідними, мають недорозвинені статеві залози і часто недорозвинені внутрішні статеві органи, цикл відсутній. Отже, у ссавців, в тому числі і у людини інколи виникають генетичні аномалії, коли при каріотипі XX замість жіночої статі розвивається чоловіча і навпаки при каріотипі XY замість чоловічої статі розвивається жіноча. Ці аномалії є рідкісними.

### Успадкування зчеплене зі статтю

Більшість ознак успадковується незалежно від статі, але деякі ознаки зчеплені зі статтю ознаки. Пояснення цього явища – локалізація цих генів у статевих хромосомах. Прикладом таких генів є гени забарвлення очей у дрозофіли. Ген дикого типу w<sup>+</sup> обумовлює червоний колір очей дрозофіли. Але є ще серія алелів, що обумовлюють різні відтінки забарвлення очей. Найбільш рецесивний алель - алель w, який обумовлює білий колір очей у дрозофіли.

Якщо ми проведемо схрещування самців з білими очима з самками з червоними очима, то одержимо:

P: ♀ w<sup>+</sup> w<sup>+</sup> X      ♂ w  
 Червоні очі      білі очі

F1: ♀w+ w X ♂w+  
 Червоні очі червоні очі  
 F2: ♀ w+ w+, w+ w ♂ w+, w  
 Червоні очі червоні очі білі очі білі очі

Якщо ж проведемо інше схрещування, візьмемо навпаки самок з білими очима, а самців з червоними очима, отримаємо зовсім інший результат:

P: ♀w w X ♂w+  
 білі очі червоні очі  
 F1: ♀w+ w X ♂w  
 Червоні очі білі очі  
 F2: ♀ w w, w+ w ♂ w+, w  
 білі очі червоні очі білі очі білі очі

Тобто, результати схрещувань будуть залежати від того, якої статі будуть взяті особини певних фенотипів.

У людини теж є ряд ознак, що зчеплені зі статтю. Це такі ознаки, як дальтонізм (нездатність розрізняти червоний і зелений кольори – рецесивна ознака) та гемофілія (незгортваність крові – рецесивна ознака). Ці гени локалізовані у X хромосомі, тому серед жінок ці патології зустрічаються вкрай рідко – жінки можуть бути носіями цих патологічних генів. Чоловіки, які успадковують X хромосому з патологічним геном не можуть бути гетерозиготами по цих генах, можуть бути лише гомозиготами і можуть бути тільки хворими.

У курей теж є ознаки зчеплені зі статтю. Це ознака поперечно-смугастого забарвлення пера породи плімутрок. Ознака домінантна. Гени локалізовані у Z хромосомі (B > b+. B – посмуговане перо, b+ - дикий тип, рівномірно забарвлене перо).

В Y чи W хромосомах теж є певні гени, яких немає у X чи Z хромосомах. Прикладом таких генів є гени мутацій темної плями на спинному плавці рибок лебістусів (гуппі) – локалізовані у Y хромосомі. У людини у Y хромосомі локалізований ген наявності перепонок між пальцями ніг –

варіант норми – багато нормальних, видатних, геніальних людей мали цю ознаку (зокрема, цю ознаку мав Сідхартха Шак'ямуні Гаутама, якого потім назвали Буддою). Ці ознаки, що успадковуються виключно по чоловічій лінії називаються **голандричними ознаками**. Все це приклади **повного зчеплення зі статтю** – явища, коли відповідні гени не мають алельних копій у іншій статевій хромосомі (X або Y). Але є ще явище **неповного зчеплення зі статтю**, коли відповідні алелі знаходяться у обох статевих гетерохромосомах (X та Y). Такі гени в нормі не перебувають у гемізиготному стані. До таких генів, наприклад, належать гени (серія алелей), що обумовлюють забарвлення кутикули жука *Phitodecta variabilis* (жуки можуть бути чорного, червоного, жовтого, смугастого кольорів. Серія алелей:  $e^b > e^r > e^y > e^l$ ). Також прикладами таких генів є гени недорозвиненості щетинок у дрозофіли:  $b^+$  - дикий тип,  $b$  – недорозвинені щетинки, рецесивна ознака). У людини деякі патології (рак шкіри, загальна кольорова сліпота) успадковуються теж за такою схемою.

### **Нерозходження статевих хромосом**

Вперше виявив Бріджес на дрозофілі: на кожні 2000 нащадків схрещування білооких самок з червонооокими самцями в першому поколінні є 1-2 виключення – білоокі самки або червоноокі самці. Виявилось, що це є наслідком нерозходження X хромосом в мейозі. При цьому утворюються гамети або зовсім без X хромосоми або з двома X хромосомами. Відповідно будуть утворюватись у дрозофіли зиготи таких типів: XXX – як правило гинуть (або утворюються суперсамки), XXУ – нормальні самки X – безплідні самці Y – всі гинуть.

При наборі статевих хромосом XXУ Y-хромосома не бере участь в кон'югації і розподіляється між дочірніми клітинами випадково – при цьому виникає **явище вторинного нерозходження статевих хромосом**. Виникають зиготи: XXУ – нормальні самки ХУУ – нормальні самці XXX – суперсамки УУ – всі гинуть.

## **Фізичне зчеплення X хромосом**

Відкрито Ліліан Морган на дрозофілі. При цьому явищі дві X хромосоми з'єднані фізично в районі центромери і має місце 100 % нерозходження статевих хромосом. Явище було продемонстровано з використанням мутації у (yellow) – жовте тіло дрозофіли. Ця мутація зчеплена з X хромосоною.

## **Нерозходження статевих хромосом у людини**

У людини також в процесі мейозу бувають порушення, які приводять до нерозходження хромосом. Частота нерозходження хромосом у людини корелює з віком матері – у матерів старших вікових груп частіше народжуються діти з хромосомними порушеннями і нерозходженням хромосом. Як правило, ембріони з нерозходженням хромосом елімуються у вигляді спонтанних абортів, але при нерозходженні деяких хромосом, зокрема 21 хромосоми та статевих хромосом – ембріони розвиваються з виникненням характерного патологічного фенотипу. Так, при нерозходженні 21 пари хромосом виникає трисомія 21 хромосоми (каріотип 47, XX +21), що фенотипічно проявляється у патології синдром Дауна. Значно рідше трапляються новонароджені з трисомією 16 хромосоми чи з трисомією 18 хромосоми. Частота народження дітей з трисоміями аутосом корелює з віком матері – із збільшенням віку матері число хромосом, що не розійшлися у дозріваючих яйцеклітинах, зростає. Це пояснюється затримкою оогенезу на стадії диплотени профазі мейозу.

Нерозходження статевих хромосом спостерігається частіше, ніж аутосом. При нерозходженні статевих хромосом виникають такі патології:

0 статевих хромосом (44, -X, -X) – ембріони гинуть на ранніх стадіях розвитку.

XXX – жіночий фенотип, розумова відсталість, безпліддя.

XXXX – прогресуюча розумова відсталість.

XXY – чоловічий фенотип, фемінізація, синдром Кляйнфельтера, безпліддя, розумова відсталість.

X0 – синдром Шерешевського-Тернера, жіночий фенотип, недорозвиненість статевих органів, безпліддя.

XYY – чоловічий фенотип, підвищена агресивність, гіпермаскулізація, цей каріотип частіше зустрічається серед кримінальних злочинців, ніж серед нормальних чоловіків.

Загалом, частота появи дітей з аномальними каріотипами по статевих хромосомах становить 1 дитину на 600 новонароджених.

### Статевий хроматин

У інтерфазних ядрах ссавців простежується невелике дисковидне тільце гетерохроматину під ядерною оболонкою – **тільце Барра**. Це тільце виявляється виключно у самок з каріотипом XX. Воно отримало назву статевий хроматин. Як виявилось, статевий хроматин утворюється з однієї X хромосоми, яка повністю репресується – активно лишається тільки одна X хромосома. Це було доведено слідуючими фактами: у людей з каріотипами X0, XY, XYY, XYYY статевого хроматину немає взагалі, у людей з каріотипами XX, XXY, XXYY наявна одна глобула статевого хроматину, у людей з каріотипами XXX, XXXY, XXXYY наявно дві глобули статевого хроматину, у людей з каріотипами XXXX, XXXXY наявні три глобули статевого хроматину, у людей з каріотипами XXXXX наявні чотири глобули статевого хроматину.

Материнські і батьківські X-хромосоми самок інактивуються в різних клітинах ембріона за законом випадковості. Саме тому самки, гетерозиготні по генах X-хромосоми, є мозаїками: в різних частинах клітин експресуються різні алелі гетерозиготи. Прикладом можуть бути кішки з черепаховим забарвленням, що мають мозаїку шерсті чорних та жовтих плям. Кошенята-самці від таких матерів завжди або жовті або чорні – експресується або ген yellow coat ( $C^Y$ ) або ген black coat ( $C^B$ ). Плямисте черепахове забарвлення кішок з генотипом  $C^Y C^B$  обумовлене випадковою інактивацією X-хромосом у ранньому періоді розвитку. Жінки, гетерозиготні за генами X-хромосом, теж є мозаїками. Так мутація

ектодермальної дисплазії, що обумовлює відсутність зубів і потових залоз, проявляється лише в деяких місцях щелеп і шкіри.

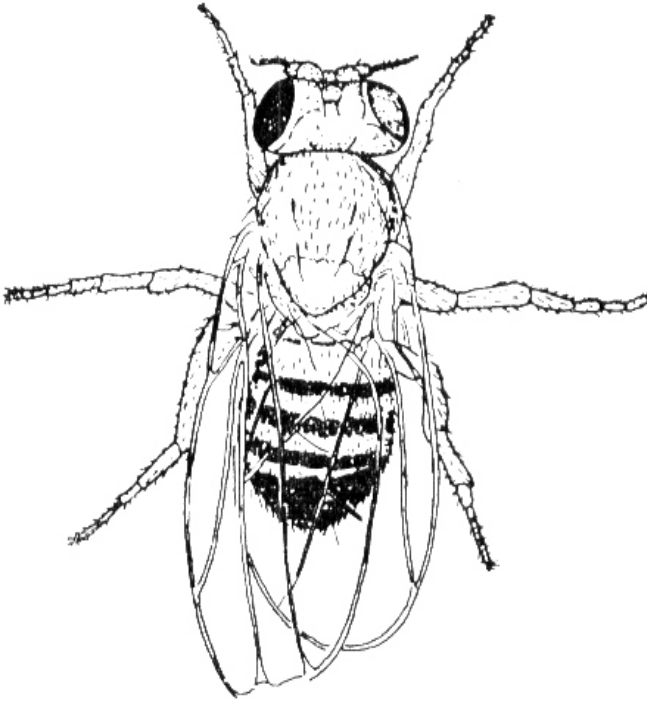


Рис. 17. Гінандроморф дрозофіли.

Механізм інактивації Х-хромосом до кінця не з'ясований. Відомо, що у дрозофіли за **дозової компенсації** регулюється не активність всієї Х-хромосоми, а кожного гена окремо. Якщо ген аутосоми перенесений у Х-хромосому, то регуляції його активності по типу компенсації дози не спостерігається. Отже, цей механізм регуляції специфічний саме для генів Х-хромосом. Його пояснюють наявністю гіпотетичного гена-компенсатора в Х-хромосомі, який не підлягає дозовій компенсації і обумовлює синтез інгібітора транскрипції генів Х-хромосоми. Чим більше



X-хромосом, тим більше синтезується інгібітора і тим нижча активність відповідних генів.

### Гінандроморфи

**Гінандроморфи** – це особини, у яких половина тіла має жіночу будову, інша половина тіла – чоловічу будову.

Гінандроморфи утворюються тоді, коли при першому поділі зиготи, що має дві X хромосоми, один із бластомерів отримує обидві X хромосоми, а інший тільки одну (друга губиться). Також гінандроморфи можуть виникати, якщо після мейозу в яйці виявляється не одне, а два гаплоїдних ядра. У комах є фізіологічна поліспермія, обидва ядра запліднюються і розвивається гінандроморф. Гінандроморфи відомі у птахів і у комах.

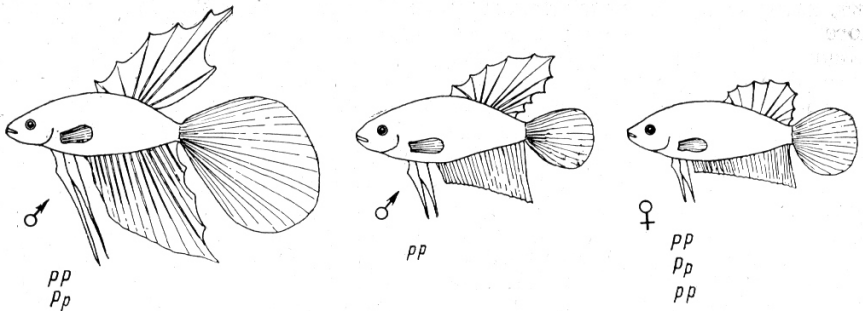


Рис. 18. Обмежені статтю спадкові відмінності розмірів плавців у сіамського риби-півника.

### Чисельні співвідношення статей і їх регуляція

Як правило, співвідношення статей є 1 : 1, але часто це співвідношення порушується за рахунок:

1) диференційованої смертності. Так, у людини смертність серед чоловіків вища, ніж смертність серед жінок. І якщо хлопчиків народжується більше (52 : 48), то до 50 років співвідношення статей у людини становить 85 : 100. У метеликів смертність на фазі гусениці у самок більша, ніж у самців.

2) Генетичні причини: інколи в популяції наявні летальні гени, що порушують поведінку статевих хромосом. Так, у дрозофіли виявлено ген, що усуває Y хромосому і народжуються виключно самки.

### **Явище відносної сексуальності**

Явище відносної сексуальності полягає в тому, що в рамках виду існують не дві статі, а кілька різних статевих форм, що здатні брати участь у статевому процесі, але лише у певних комбінаціях. Так, у хламідомонади існують “+” і “-” статі, але кожна з цих статей має слабку і сильну форму – наприклад, слабкий “+” і сильний “+”. Тобто фактично існує не дві, а чотири статі. Сильний “+” може вступати у статевий процес із слабким “+”, тоді слабкий “+” грає роль мінуса.

У гриба алейродискуса існують чотири статевих форми, що обумовлюються генами A, a, B, b. Здатні вступати у статевий процес клітини, що відрізняються по обох генах:

AB X ab

Ab X aB

aB X Ab

У інфузорій є вісім статей. Кожна стать може вступати в кон'югацію з сімома іншими статями, але не зі своєю.

У бактерій є клітини донори ДНК (умовно чоловічі) і клітини акцептори ДНК (умовно жіночі). Чоловічі клітини містять статевий фактор – епісому F. Фактор F може передаватися від однієї клітини до іншої і тоді жіноча клітина перетворюється у чоловічу, або може втрачатися клітиною, і тоді чоловіча клітина перетворюється на жіночу.

## **Лекція VI. ЗЧЕПЛЕННЯ І КРОСИНГОВЕР**

**Зчеплення генів** – це явище, яке полягає в тому, що при розщепленні в потомстві дигібридних особин-число особин, що несуть поєднання генів, яке є у батьківських особин перевищує очікуване у відповідності із законом незалежного комбінування, а число рекомбінантів менше очікуваного.

Наприклад: у дрозофіли є гени *e* (*ebony*) – чорне тіло і *ss* (*spineless*) – редуковані щетинки. Відповідно гени *e+* - дикий тип (*cipe* тіло), *ss+* дикий тип (нормальні щетинки). При схрещуванні:

P: ♀ *e+ e+ ss+ ss+* X ♂ *e e ss ss*  
 Сірі щетинкові чорні безщетинкові  
 F1: ♀ *e+ e ss+ ss* X ♂ *e e ss ss* (аналізуюче схрещування)  
 Сірі щетинкові Сірі щетинкові

F2: Сумарна кількість особин 861 і з них:

Сірих щетинкових - 384

Чорних безщетинкових - 371

Чорних щетинкових – 53

Сірих безщетинкових – 45

Згідно із законом незалежного комбінування таке схрещування повинно було б дати нащадків у співвідношенні 1 : 1 : 1 : 1. Але доля рекомбінантів виявилась 11,4 %. Тобто ці гени виявились зчеплені між собою.

У кожного виду виявлена певна кількість груп зчеплення. Так у *Drosophila melanogaster* – 4 групи зчеплення, у *D. virilis* – 6, *D. funebris* – 6, *D. pseudoobscura* – 5, *D. willistoni* – 3, *Homo sapiens* – 23. Розгадка цього явища проста: гени розташовані у хромосомах і у кожного організму число генів набагато більше ніж число хромосом.

Основою незалежного розподілу генів служить незалежне комбінування різних негомологічних хромосом при мейозі, внаслідок чого гамети або спори, які утворюються гетерозиготою, отримують вихідні батьківські хромосоми у випадкових комбінаціях. Тому очевидно, що зчеплення спостерігається між генами, що лежать в одній хромосомі. Такі гени утворюють **групу зчеплення**. Число груп зчеплення рівне числу хромосом.

### Кросинговер

Якщо зчеплені гени лежать в одній хромосомі, але у гетерозигот за ними при утворенні гамет або спор у відомому числі випадків відбувається рекомбінація цих генів, значить,

пара гомологічних хромосом може під час мейозу обмінюватись частинами хромосом. Такий обмін отримав назву кросинговера (від англ. crossing over – утворення перехресту). Під час кросинговеру утворюються **кросоверні гамети** – гамети, що містять рекомбінації зчеплених генів.

Вивчення кросинговеру показало, що частота кросинговеру між двома зчепленими генами являє собою величину, характерну саме для даної конкретної пари генів. Наприклад, *Drosophila melanogaster* у другій хромосомі містить такі гени: al – відсутність відгалужень на вусиках, dp – усічені кінці крил, b – чорне тіло, j – загнуті догори крила, Bl – товсті вкорочені щетинки, pr – пурпурні очі, cn – кіноварні очі, vg – зачаткові крила, L – зменшені очі, c – загнуті вниз крила, a – розсунуті дугоподібні крила, px – сітка додаткових жилок, bw – коричневі очі. Частоти кросинговеру між цими генами в нормальних умовах є величини сталі:

Пари генів	Частота кросинговеру (%)	Пари генів	Частота кросинговеру (%)
b-j	0,2	vg-L	5,0
b-pr	6,0	vg-c	8,5
b-Bl	6,3	c-L	3,5
b-cn	9,0	a-px	1,3
vg-cn	9,5	px-bw	4,0

### Карти хромосом

Чим далі один від одного розташовані гени в хромосомі, тим більша ймовірність того, що між ними відбудеться кросинговер. Наприклад, у якомусь організмі існують гени А, В, С. Частота кросинговеру між генами А і В становить 3 %, між генами В і С – 5 %, між генами А і С – 8 %. З цих даних висновок напрашується такий: зчеплені гени розташовані у хромосомі в лінійному порядку і частота кросинговеру між ними прямо пропорційна відстані, що розділяє їх у хромосомі.

Це вірно для генів, що розташовані відносно недалеко на хромосомі. Це дозволило **скласти генетичні карти хромосом**. Відстань на генетичних картах хромосом виражають в одиницях, що відповідають 1 % кросинговера. Ця одиниця називається **Морганіда (М)**. Місце, яке займає ген на хромосомі чи генетичній карті, називається **локус**.

### **Подвійний і множинний кросинговер. Інтерференція**

Кросинговер може відбуватися одночасно у двох чи кількох точках пари гомологічних хромосом. Так, гетерозигота по трьох зчеплених генах ABC/abc може, крім некросоверних гамет ABC і abc та гамет з комбінацією генів з одиночним кросинговером (Abc, aBC, ABc, abC), утворювати гамети AbC, aBc, що виникають у випадках подвійного кросинговера, що відбувається одночасно між генами А і В та між генами В і С.

Можуть виникати не тільки подвійні, але і потрійні, четвертинні та інші кросинговери. Парне число перехрестів між двома генами не приводить до рекомбінації. Кросинговер, що відбувся, утруднює одночасне здійснення інших кросинговерів на сусідніх ділянках хромосоми. Це явище отримало назву **інтерференція**. Силу інтерференції **виражають коефіцієнтом коінциденції (К)** :

$$K = F/T$$

К – коефіцієнт коінциденції

F – фактична частота подвійного кросинговеру

T – теоретична частота подвійного кросинговеру (рівна добутку частот одинарного кросинговеру).

Розрізняють ще поняття **значення інтерференції (I)**:

$$I = 1 - K$$

Сила інтерференції різна у різних видів і у різних хромосомах одного виду і в різних ділянках однієї хромосоми. Сила інтерференції тим сильніша, чим коротша ділянка хромосоми. Так, на відстані 10 морганід у дрозофіли  $K = 0$ , на відстані 40 морганід  $K = 1$ .

Для генів, що розташовані далеко один від одного, можна застосовувати формулу:

$$P = \frac{1}{2} (1 - e^{-2d} \cos 2d)$$

$d$  – відстань між генами у одиницях карти

$e$  – основа натурального логарифма.

$P$  – фактично виявлена частота рекомбінації

Але поблизу центромери цю формулу застосовувати не слід – біля центромери спостерігається повна ( $K = 1$ ) або навіть від'ємна інтерференція ( $K > 1, I < 0$ ).

### **Нерівний кросинговер**

Під час мейозу гомологічні хромосоми зближуються по всій довжині, розташовуються так, що відповідні точки двох парних хромосом точно співпадають, розриви відбуваються у суворо тотожних місцях. Тому кросинговер приводить до обміну рівними ділянками хромосом, що містять рівне число генів. Але ці закономірності іноді порушуються. Зокрема, при тандемних дуплікаціях. Прикладом нерівного кросинговеру є прояв мутації *Var* у дрозофіли. Мутація *Var* викликає смугасті очі у дрозофіли внаслідок редукції очних фасеток. В лінії *Var Var* періодично з частотою 1 : 1600 з'являються мухи з нормальними очима і з більш сильною редукцією очних фасеток, ніж у *Var* – так звані *ultraVar*. Мутанти *UltraVar* виникають в результаті потрібної дуплікації ділянки *X* хромосоми: в результаті нерівного кросинговеру – одна хромосома втрачає, інша отримує ту ж ділянку.

### **Цитологічний механізм кросинговера**

Кросинговер відбувається на зиготенній і пахітенній стадіях профазі мейозу, коли кожна хромосома вже розділена на дві хроматиди – пара хромосом представлена чотирма хроматидами. В акті кросинговера беруть участь дві з чотирьох хроматид. Постає питання: чи кросинговер може відбуватись між сестринськими хроматидами, які є тотожними? Виявилось, що такий обмін відбувається при так званому мітотичному кросинговері.

**Мітотичний кросинговер** або **соматичний кросинговер** – це рекомбінація зчеплених генів, що лежать у

парі гомологічних хромосом і яка відбувається під час мітозу – головним чином у соматичних клітинах. Вперше виявлений у дрозофіли. В результаті мітотичного кросинговеру можуть утворюватись так звані “близнюкові плями” – мозаїчні плями, де поруч розташовані два генетичні типи клітин, що відрізняються один від одного і від інших клітин даної особини.

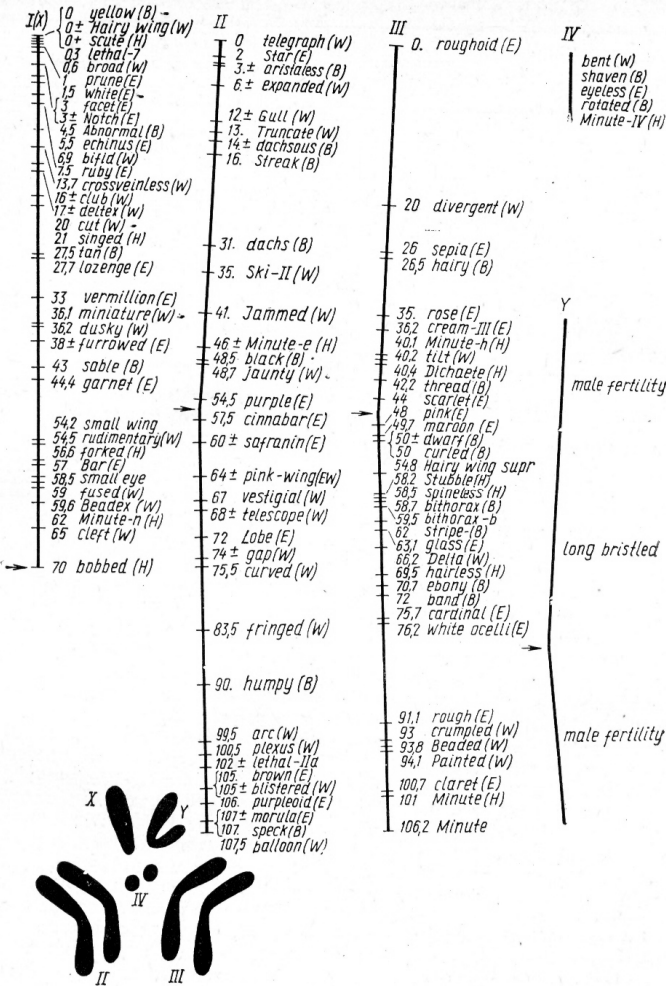


Рис. 19. Генетична карта хромосом дрозофіли.

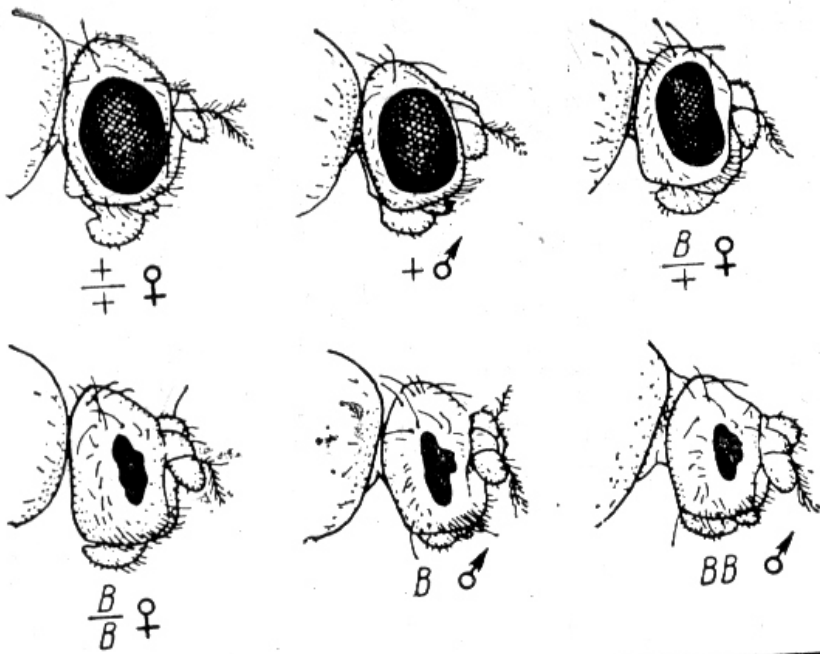


Рис. 20. Різний прояв ознаки Bar у дрозозфіли. Ознаки ультра-Bar можуть виникати в результаті нерівного кросинговеру.

### Фактори, що впливають на кросинговер

Частота кросинговера між двома зчепленими генами є постійною тільки у нормальних умовах. Ряд факторів впливають на частоту кросинговера:

- 1) Статевий фактор – у багатьох видів живих істот у гетерогаметної статі частота кросинговера занижена або у гетерогаметної статі кросинговер взагалі відсутній. Так, у дрозозфіли мейотичний кросинговер є тільки у самок.
- 2) Мутації – часто роблять кросинговер неможливим.
- 3) Є гени, які подавляють кросинговер.
- 4) Є гени, які підвищують частоту кросинговера або роблять кросинговер можливим у самців.



- 5) Віковий фактор – у дрозофіли у молодих самок кросинговер є високим, потім його частота знижується і з віком потім знову зростає.
- 6) Температурний фактор – при температурі 25<sup>0</sup>С кросинговер мінімальний, при підвищенні або знижуванні температури частота кросинговеру зростає.
- 7) Голодування – призводить до зростання частоти кросинговеру.
- 8) Недолік вологи - призводить до зниження частоти кросинговеру.
- 9) Опромінення – підвищує частоту кросинговеру.
- 10) Йони кальцію – підвищують частоту кросинговеру.

## Лекція VII. ГЕНЕТИКА БАКТЕРІЙ І ВІРУСІВ

### Картування бактеріальної хромосоми

Хромосоми бактерій і вірусів складаються тільки з однієї молекули нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК). У бактерій внесок батьківських організмів (донора і реципієнта) – нерівний (реципієнт – вносить цілу хромосому, донор – частину хромосоми), тому клітина, в якій відбувається кросинговер не диплоїдна, а частково диплоїдна – **меродиплоїдна**. Така клітина називається **мерозигота**.

Існують різні способи перенесення генетичного матеріалу у бактерій:

- 1) **Трансдукція** – спосіб змішування генів у бактерій, при якому фрагмент хромосоми однієї бактерії переноситься у іншу бактерію бактеріальним вірусом (бактеріофагом).
- 2) **Сексдукція** - спосіб змішування генів у бактерій, при якому фрагмент хромосоми однієї бактерії переноситься у іншу бактерію статевим фактором F.
- 3) **Трансформація** – спосіб змішування генів у бактерій, при якому фрагмент хромосоми однієї бактерії переноситься у іншу бактерію безпосередньо – бактерія поглинає чужорідну ДНК з розчину після руйнування іншої бактерії і включає чужорідну ДНК у свій геном.

Статевий фактор бактерій являє собою епісому – плазмиду, що здатна включатися у бактеріальну хромосому. Фактор F включається в бактеріальну хромосому *E. coli* між генами *lac* і *ton* (генами утилізації лактози і геном чутливості до фага T1). При такому включенні штам F перетворюється у Hfr штам (від англ. High frequency recombination – висока частота рекомбінації).

Хромосома бактерій кільцева, її цілісність при кросинговері може зберігатися тільки у випадку парного числа обмінів між нею і привнесеним фрагментом хромосоми донора – **екзогенотом**. При непарному числі обмінів утворюється нежиттєздатна рекомбінантна лінійна хромосома з дуплікаціями на обох кінцях. Обмін ділянками між хромосомою бактерії-реципієнта і бактерії-донора можна виявити, якщо гени, що містяться в цьому фрагменті, представлені іншими алелями, аніж гени в хромосомі реципієнта, тобто якщо мерозигота буде гетерозиготна по цих генах (тобто буде **гетерогенотом**).

**Гетерогенота** – це мерозигота по генах, що вступили у кросинговер.

Екзогенота, як правило, нежиттєздатна, тому реєструється тільки половина продуктів рекомбінації. Але, коли донорний фрагмент включений в плазмиду, обидва продукти рекомбінації лишаються у клітині і можуть бути виявлені. Визначення частоти кросинговера між бактеріальними генами складніше, ніж у еукаріот, бо лишається невідомим число мерозигот, від яких пішли виявлені в досліді рекомбінанти. Інтерференція практично відсутня у бактерій, але має місце явище від'ємної інтерференції.

**Від'ємна інтерференція** – це явище, при якому кросинговер підвищує рівень кросинговеру на сусідніх ділянках хромосоми.

### **Фізичне картування бактеріальних генів методом перерваної кон'югації**

Перенесення ДНК з клітини донора до клітини реципієнта у бактерій здійснюється по механізму “кільця, що котиться”.

Але часто відбувається руйнування кон'югаційної трубки і обрив хромосоми Hfr (навіть під дією механічних струсів) – у F<sup>-</sup> клітину ціла Hfr –хромосома потрапляє дуже рідко. Послідовність поступлення генів з Hfr клітин у F<sup>-</sup> клітини надає можливість картувати їх у бактеріальній хромосомі у відповідності з порядком і часом їх потраплення в клітини.

Приклад: Hfr, Thr<sup>+</sup>, Leu<sup>+</sup>, Az<sup>S</sup>, Tl<sup>S</sup>, Lac<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Str<sup>S</sup> X F<sup>-</sup>, Thr<sup>+</sup>, Leu<sup>-</sup>, Az<sup>R</sup>, Tl<sup>R</sup>, Lac<sup>-</sup>, Gal<sup>-</sup>, Str<sup>R</sup>.

Починають схрещування між штамми зі змішування двох культур (час – t=0). Через інтервали часу із суміші відбирають проби і різко їх струшують – кон'югаційні містки руйнуються. Висівають проби на агар із стрептоміцином і глюкозою. На середовищі відбираються рекомбінанти по **селективних маркерах**. Потім рекомбінанти пересівають на різні середовища, щоб визначити генотипи по інших маркерах.

З одного F<sup>+</sup> штама може виникнути багато різних Hfr штамів, для кожного з яких властива своя локалізація і орієнтація в хромосомі бактерії. В кожному штамі передача бактеріальної хромосоми починається з іншої точки. Сукупність даних по різних Hfr штаммах дозволяє встановити кільцевий характер бактеріальної хромосоми і розміщення на цій хромосомі генів.

### **Рухомі генетичні елементи – транспозони**

Первісні уявлення про стабільність генетичної організації були порушені відкриттям рухомих генетичних елементів бактерій. Перші рухомі генетичні елементи – генетичні елементи, що змінюють своє положення у геномі, були названі **інсерційні послідовності (IS-елементи)** або вставки. Вони були виявлені як причина мутацій, що подавляють експресію певного гена, в який вони вбудовуються. Вивчення гетеродуплексних молекул, що утворюються з ДНК мутанта і ДНК дикого типу, показало, що інсерційні мутанти містять ділянки ДНК, вбудовані у ДНК дикого типу. IS-послідовності можуть викликати мутації багатьох генів. Різні IS-елементи відрізняються розмірами, але мають спільні риси: на кінцях IS-

елементів є однакові або майже однакові нуклеотидні послідовності, розташовані у зворотному порядку (типу паліндромів). Наприклад, IS1 елемент має кінцеві послідовності величиною 23 нуклеотида і з них 18 - однакові. Коли IS-послідовності вбудовуються у ДНК-мішень, невелика ділянка послідовності ДНК-мішені повторюється біля кожного кінця IS-послідовності (5-9 нуклеотидів).

Спільні властивості рухомих генетичних елементів такі:

- 1) Здатність переміщуватись по геному: копія вбудовується в мішень. Функції, що забезпечують транспозицію, закодовані у самому транспозоні.
- 2) Рухомі генетичні елементи можуть точно вирізатися – при цьому відбувається реверсія до дикого типу.
- 3) У сайтах, суміжних до інсерції, відбуваються інверсії бактеріальних генів.
- 4) У сайтах, суміжних до інсерції, відбуваються делеції бактеріальних генів.
- 5) Рухомі генетичні елементи забезпечують взаємодію між такими елементами як F-фактор і бактеріальна хромосома.

IS-послідовності порівняно невеликі, кодують лише функції, необхідні для їх транспозиції. Але існує ще другий клас рухомих елементів – Tn-елементи або власне транспозони – це рухомі генетичні елементи, що містять гени, які не мають відношення до транспозиції. Приклад: транспозони Tn1, Tn2, Tn3 містять гени стійкості до ампіциліну. Деякі Tn-елементи містять Is-елементи – наприклад, транспозон Tn5 містить на кінцях Is50. Багато Tn-елементів містять на кінцях повтори. Цікаво, що деякі бактеріофаги можуть існувати у формі транспозона: так, бактеріофаг Mu може існувати і у формі профага і у формі транспозона і вбудовуватись у будь-яке місце геному E. coli інактивуючи гени, що виявились у місці мішені. Перші транспозони були описані ще у 1951 році Барбарою Мак-Клінток на кукурудзі. Транспозони еукаріот, як правило, називають мігруючими генетичними елементами (МГЕ). У еукаріот розрізняють генералізовану транспозицію – випадкову транспозицію, включення транспозонів у будь-які сайти і

спрямовану транспозицію – включення транспозонів у конкретні сайти.

У дріжджів виявлено транспозицію генів, що визначають тип спарювання ( $\alpha$  або  $\alpha$ ) з мовчазних касетних локусів у єдиний адаптивний реципієнтний локус (MAT). Серед траспозонів у еукаріот розрізняють ретропозони і ретротраспозони – транспозони, що мігрують по геному за допомогою зворотної транскрипції, яку здійснює ревертаза – фермент, що синтезує ДНК на основі мРНК. У дріжджів виявлено сімейство транспозонів *Tu*. Кожен *Tu*-елемент нагадує складний транспозон бактерій – складається з серцевидної послідовності (“тіла”) – 6,3 kb і має довгі прямі повтори на обох кінцях, що нагадують елементи LTR. Кожен кінцевий повтор елемента *Tu* має розмір 0,33 kb і називається  $\delta$ -повтор. Крім *Tu*-елементів виявлені ще незалежні поодинокі  $\delta$ -елементи. У дрозофіли теж виявлено транспозони – це соріа-елементи і FB-елементи. Ці мігруючі елементи мають довгі кінцеві повтори. Розрізняють також у дрозофіли соріа-подібні елементи – це мігруючі елементи *mgd1*, *mgd3*, B104, 412, 297, *gypsy*-елементи. FB-елементи за будовою нагадують сателітну ДНК. Багато дослідників пов’язують наявність псевдогенів – зіпсованих копій генів ( $\psi$ -генів) з транспозонами. Псевдогени виявлені у всіх еукаріот, псевдогени, як правило, позбавлені інтронів, що наводить на думку, що це ретропозони. Іноді у еукаріот ретропозон вбудовується під чужий промотор і транскрибується – тоді він стає так званим **ретрогеном**. З переміщеннями МГЕ еукаріот пов’язане явище **гібридного дисгенезу** – виникнення комплексу генетичних аномалій (хромосомних аберацій, мутацій, стерильності, порушення мейозу та ін.) у деяких гібридів.

У дрозофіли виявлено кілька генетичних систем, що обумовлюють гібридний дисгенез. Дрозофіли першої системи поділяються на типи I (*inducer*) і R(*reactive*). При схрещуванні самців I з самками R зменшується плодючість, чого не буває при реципронних схрещуваннях.

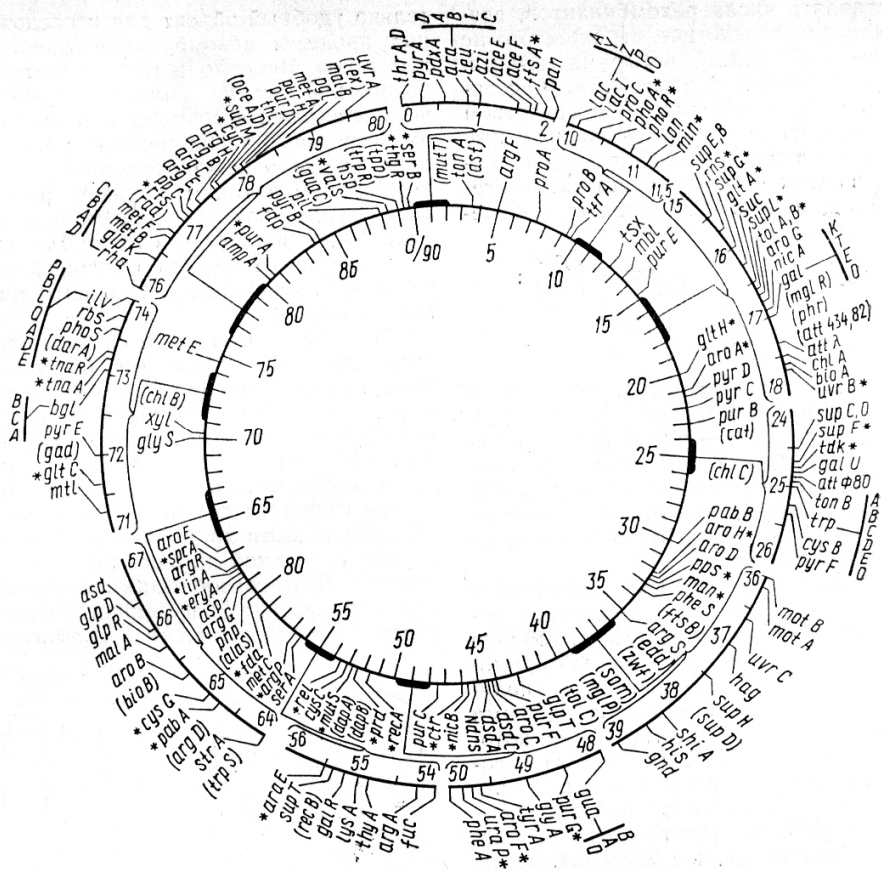


Рис. 21. Генетична карта *Escherichia coli* складена методом перерваної кон'югації.

Дрозофіли іншої системи складаються з типів Р (paternal contributing) і М (maternal contributing). Схрещування між самцями Р і самками М викликає гібридний дизгенез, у реципральному схрещуванні такого ефекту немає. Явище гібридного дизгенезу у дрозофіли проявляється головним чином у зародкових генеративних клітинах. Морфологічні дефекти в розвитку гамет розпочинаються на стадії швидкого розмноження клітин зародкової лінії. Виявилось, що хромосоми

самців Р-типу мають мобільні Р-елементи, а у дрозофіл М-типу цих елементів немає. У гібридів  $F_1(\text{♀}M \times \text{♂}P)$  і їх нащадків спостерігаються дуже інтенсивні переміщення Р-елементів і багато визваних цим мутацій у зародкових клітинах, що часто приводить до стерильності нащадків. Тому лінії дрозофіл з Р-елементом і без нього виглядають як репродуктивно ізольовані, принаймні, частково. Гібридний дизгенез проявляється лише тоді, коли фактори Р потрапляють у цитоплазму М-типу (М-цитотип). У цьому випадку активується процес транспозиції всіх Р-елементів, які дуже варіабельні щодо їх довжини із-за частих внутрішніх делецій. Інтактні Р-елементи кодують транспозазу, яка неактивна у Р-цитотипі, але стає активною у М-цитотипі. Р-елементи з делеціями можуть втратити здатність продукувати транспозазу і стати неавтономними, однак їх активація здійснюється за рахунок активності транспозази нормальних за будовою Р-елементів. Те, що гібридний дизгенез проявляється виключно в клітинах зародкової лінії, пояснюється тим, що лише в останніх можливий такий хід сплайсінгу транскрипту Р-елемента, за якого утворюється безперервна відкрита рамка трансляції для транспозази. Дисгенетичні взаємини Р-М здатні до активації у гібридів  $F_1$  транспозицій не тільки Р-елементів, але і інших МГЕ, наприклад, елементів соріа. Типові для гібридного дизгенезу розриви хромосом здійснюються в гарячих точках, які, переважно, і є місцями інсерцій Р-фактора. Властивості М-цитоплазми, що обумовлює гібридний дизгенез за взаємодії з Р-генотипом, можуть змінитися, але для цього потрібно, щоб хромосоми Р-генотипу діяли на цю цитоплазму протягом багатьох поколінь. Повна перебудова цитотипу від Р до М або від М до Р здійснюється за 10 і більше поколінь. Причетними до такої перебудови є гени дистальної частини Х-хромосоми і частково гени аутосом.

### **Фізична карта F-фактора**

F-фактор являє собою епісому розміром 94,5 kb. F-фактор містить гени *tra* – гени, що забезпечують кон'югаційний перенос, гени автономної реплікації ДНК і 0-пункт

кон'югаційного переносу; інсерційні елементи IS3,  $\gamma\delta$ , IS2 - за допомогою яких F-фактор вбудовується у хромосому бактерій і перетворюється у Hfr; послідовності, що забезпечують гомологію між епісомною F і F-подібними плазмідами R1, R100, R6, ColV; послідовності генів резистентності щодо фагів T3, T7,  $\phi$ 11.

### Генетичне картування E. coli

Метод перерваної кон'югації не може бути використаний при картуванні маркерів, що лежать близько одне від одного. Для рекомбінантного картування потрібно клітину реципієнта і клітину донора. ДНК донора може вводиться у клітину реципієнта різними способами:

- 1) кон'югацією (з використанням Hfr-хромосоми).
- 2) За допомогою фага-вектора – методом трансдукції.
- 3) Методом трансформації – прямої передачі ДНК.

Часто створення штамів Hfr і F- справа не проста і картування відбувається за допомогою мерозигот, що виникають при трансдукції помірними бактеріофагами, такими як P1. Після інфікування такими фагами E. coli розвиток може піти двома шляхами:

- 1) по літичному шляху (поява нащадків фага).
- 2) По шляху лізогенії (інтеграції профага у бактеріальну хромосому).

В окремих випадках під час упаковки фагової ДНК послідовності перетасовуються один відносно одного. Іноді у фаг потрапляє замість фагової ДНК фрагмент хромосоми клітини-господаря, що зруйнувалася у процесі лізису. Дефектні фаги, що містять ДНК E. coli, можуть бути виявлені посередністю генетичного аналізу при наявності у ДНК E. coli генетичних маркерів (наприклад, клітина thr- “інфікована” фагом, що містить фрагмент ДНК E. coli з геном thr+). Утворюється прототрофний рекомбінант, що здатний рости при відсутності треоніну). Фаг P1 проявляє **неспецифічну трансдукцію** – здатність переносити будь-які частини геному бактерії. Крім неспецифічної є ще **специфічна трансдукція** –



трансдукція, при якій переносяться тільки ті бактеріальні гени, які локалізовані недалеко від сайту інтеграції профагу. Специфічна трансдукція властива для таких фагів як фаг  $\lambda$ . Коли фаг P1 розмножують на клітинах  $thr^+$ ,  $leu^+$ ,  $azi^R$ , то лише 3 % від рекомбінантів типу  $thr^+$  мають фенотип  $leu^+$  і жоден із них не має фенотипу  $azi^R$ . Але 50 % клітин з фенотипом  $leu^+$  містять ген  $azi^R$ . З цього можна зробити висновок, що ген  $leu^+$  більш зчеплений з геном  $azi^R$ , аніж з геном  $thr^+$ .

Перенесення фагом одночасно двох генів господаря називається **сумісна трансдукція (котрансдукція)**. Частоти котрансдукції відповідних маркерів можна використати для визначення степені їх зчеплення. Для цього зручно використовувати мутанти фагів P1  $cleag$ , що не здатні до лізогенізації бактерій і **ауксотрофів** – мутантів бактерій, що потребують додаткового живлення (вони є носіями мутацій, що порушують експресію необхідних біосинтетичних функцій).

### Картування генів вірусів

Рекомбінації генів виявлені практично у всіх досліджених вірусах, найбільш детально вивчені у ДНК-бактеріофагах. По відношенню до клітини господаря вірус може вести себе по різному. Вірус може:

- 1) Вбивати клітину господаря в процесі розмноження (фаг T4).
- 2) Не руйнувати повністю інфіковану клітину, а дозволяти їй рости і ділитися, виділяючи назовні нащадків віруса.
- 3) Вбудовуватись у геном господаря і пасивно реплікуватись по мірі поділу клітин – переходити у стан профага (фаг  $\lambda$ , вірус SV40).

Для досліджень, розробки систем картування генів вірусів виявились зручними віруси  $\phi X174$ ,  $\lambda$ . (малі розміри геному -  $\phi X174$  має всього 10 генів у геномі,  $\lambda$  - має 60 генів у геномі. Швидкість розмноження – за одну добу змінюється кілька поколінь).

Для картування генів бактеріофагів використовуються мутантні бактеріофаги. Але лише деякі фагові гени мають мутації, що змінюють морфологію негативних колоній, але у

всіх генах фага можуть відбуватися летальні мутації, що унеможливають появу фагових нащадків.

**Умовно летальні мутанти** – це мутанти, що нежиттєздатні в одних умовах і нормально життєздатні у інших умовах. Розрізняють такі основні різновидності умовно летальних мутантів фагів:

- 1) Температурочутливі мутанти (ts) – мутанти, що здатні розмножуватись при 30<sup>0</sup>C (пермісивні умови) і не здатні розмножуватись при 40<sup>0</sup>C (непермісивні умови).
- 2) Мутанти чутливі до холоду (cs) – мутанти, що мають нестабільний при певній температурі білок.
- 3) Супресорчутливі мутанти (sus) – мутанти, що здатні розмножуватись тільки у бактеріях з певним генотипом. Наприклад, sus-мутанти можуть розмножуватись тільки у бактеріях su<sup>+</sup> і не можуть розмножуватись у бактеріях su<sup>-</sup>. Фаг дикого типу розмножується у обох типах клітин.

Розрізняють три класи супресорних мутацій: amber (am), ochre (och), opal (op). Супресорні мутації можуть зачіпати всі гени, що кодують синтез білків. Ці мутації порушують синтез білків у клітинах господаря типу su<sup>-</sup> і не перешкоджають синтезу білку у клітинах типу su<sup>+</sup>.

Для картування умовно летальних мутацій бактеріофагів здійснюють комплементарний аналіз. Суть цього методу така. Для того, щоб визначити, чи впливають дві незалежні мутації на одну і ту ж генетичну функцію або на дві різні, бактеріальні клітини одночасно заражують фагами обох мутантних типів при непермісивних умовах. Якщо в таких умовах у двічі інфікованих бактеріальних клітинах продукуються нащадки фага, то можна зробити висновок, що кожен фаг здійснює функцію, яку не може здійснити інший. Такі мутації називають **комплементарними**. Розрізняють групи комплементарності у фагів. Наприклад, при одночасному зараженні бактерій мутантами am<sup>10</sup> і am<sup>9</sup> нащадки виникають, а при одночасному зараженні бактерій мутантами am<sup>9</sup> і am<sup>32</sup> нащадки не виникають. Значить, мутації am<sup>9</sup> і am<sup>32</sup> становлять одну групу комплементарності.

## Лекція VIII. ЦИТОПЛАЗМАТИЧНА СПАДКОВІСТЬ

Цитоплазматична спадковість – це вид спадковості, при якій цитоплазма теж зберігає і передає нащадкам частину отриманої від батьків генетичної інформації, хоча суттєво меншу ніж ядро. Цитоплазматична спадковість визначається:

- 1) Ядерними генами матері, які виявляють вплив через цитоплазму яйцеклітини.
- 2) Позаядерними генами, що локалізовані в різних реплікуючих компонентах цитоплазми (пластидах, мітохондріях, плазмідах, внутрішньоклітинних симбіонтах і паразитах).

### Дія генів матері через цитоплазму яйцеклітини

Цитоплазма яйцеклітини синтезує речовини під дією експресії материнських генів і це впливає на ознаки нащадків.

Прикладом такої дії материнських генів через цитоплазму яйцеклітини може бути успадкування забарвлення зовнішніх покривів і очей у вогнівки млинної. У цього метелика є ген А, що обумовлює синтез протопігменту формілкінереніну. За рахунок цієї речовини утворюється темне забарвлення зовнішніх покривів і очей. При наявності гену а протопігмент не синтезується – утворюється світлі личинки і червонооокі метелики. При схрещуванні:

P: ♀Aa X ♂aa

F1: всі личинки мають темні ділянки покриву, але потім у личинок з генотипом aa покриви з кожною лінкою світліють і з личинок aa утворюються червонооокі метелики, а з личинок Aa – чорнооокі метелики. При протилежному схрещуванні отримаємо інші результати: P: ♀Aa X ♂aa

F1: всі личинки світлі, але личинки з генотипом Aa з кожною лінкою темніють і з личинок aa утворюються червонооокі метелики, а з личинок Aa – чорнооокі метелики.

Другим прикладом – більш глибокої дії материнських генів через цитоплазму яйцеклітини може бути успадкування завитків мушлі у молюска ставковика. У цього молюска відомі

раси з лівозакрученою (фенотип S - рецесивний) і з правозакрученою (фенотип D - доміантний) мушлею. Причому, напрям завитка задається не генами особини, а генами матері особини. Ген D обумовлює правозакручену мушлю, ген d – лівозакручену мушлю. При схрещуванні:

P: ♀DD X ♂dd

F1: Dd – фенотип D

F2: DD, Dd, dd – у всіх фенотипи D

F3: Від материнських особин DD, Dd народжуються особини з фенотипом D, від особин dd з фенотипом S.

При схрещуванні: P: ♀dd X ♂DD

F1: Dd – у всіх особин фенотип S

F2: DD, Dd, dd – у всіх фенотипи D

F3: Від материнських особин DD, Dd народжуються особини з фенотипом D, від особин dd з фенотипом S.

Фенотипічний прояв даного гена запізнюється на одне покоління. Причина цього така: направлення завитка мушлі залежить від орієнтації веретена другого мітотичного дроблення.

Дія материнських генів може:

- 1) Впливати тільки на ознаки яйця.
- 2) Впливати на ознаки яйця і ембріона.
- 3) Поступово зникати по ходу індивідуального розвитку.

Зберігатись протягом всього життя індивідуума наступного покоління.

Ці дії об'єднує те, що фенотип нащадків визначається хромосомними генами матері, але не прямо, а посередньо через цитоплазму яйцеклітини.

### Гени пластид

Вперше гени пластид були виявлені на початку ХХ століття при дослідженні успадкування строкатолистості рослин. Потім інтерес до цих генів зменшився і досліджено було ці гени тільки у 80-тих роках ХХ століття. Зокрема, дослідили гени пластид хламідомонади: виявилось, що у геномі пластид хламідомонади є гени стійкості до антибіотиків.

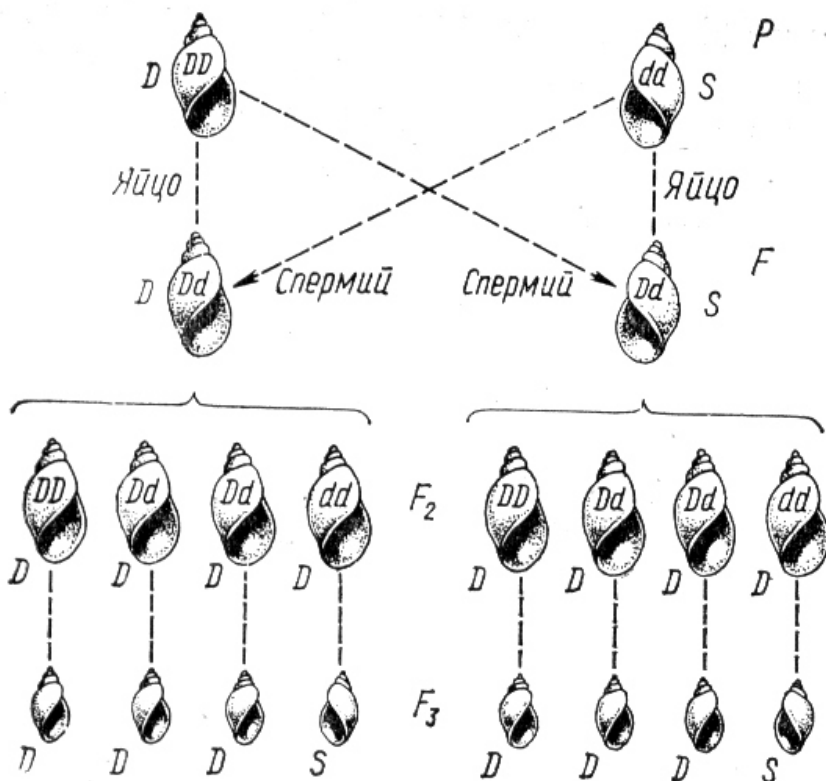


Рис. 22. Успадкування правобічної (D) і лівобічної (S) мушлі у ставковика.

У хламідомонади є раси  $S^R$  і  $S^S$  – резистентні і чутливі до стрептоміцину. Виявилось, що чутливість до стрептоміцину нащадків визначається тим, до якої раси ( $S^R$  чи  $S^S$ ) належить батьківська клітина типу “+” і не залежить від раси батьківської клітини типу “-“. Відомо ще кілька десятків ознак хламідомонади, що залежать від геному хлоропласта і успадковуються аналогічно – це здатність до фотосинтезу, розміри колоній і клітин при рості на агарному середовищі, стійкість до підвищеної температури та ін. Передача генів тільки від “+” клітини пояснюється тим, що пластидні гени, що

привносяться в зиготу батьківською клітиною “-“ елімінуються в зиготі і не потрапляють до чотирьох дочірніх клітин. Але у рідкісних випадках (менше 1 %) зигота отримує пластидні гени обох батьківських організмів. Утворюється гетерозигота – **цитогета** – гетерозигота по пластидних генах. Частоту цитогет можна значно збільшити, якщо перед копуляцією клітини “+” опромінити ультрафіолетом.

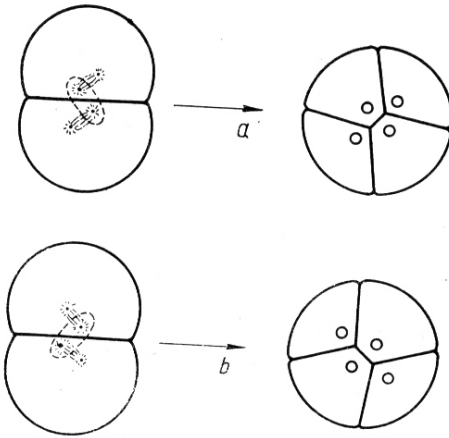


Рис. 23. Направлення завитка мушлі у молноків визначається орієнтацією мітотичних веретен при другому поділі дроблення заплідненого яйця.

При мейозі цитогет пластидні гени не розщеплюються, всі тетради є цитогетами.

Але по ходу подальшого мітозу поступово вищеплюються обидва батьківських гени і виникають клони клітин, що несуть ту чи іншу ознаку. Вивчення нащадків цитогет показало, що всі пластидні гени хламідомонади складають одну групу зчеплення. Визначаючи частоту рекомбінацій пластидних генів, вдалося скласти кросинговерну карту пластидної групи зчеплення хламідомонади. Виявилось, що хромосоми пластид подібні до бактеріальних хромосом і теж являють собою кільцеву структуру.

Вищі рослини теж мають у пластидах цілу низку генів. Зокрема, гени, що обумовлюють строкатолистість. **Строкатолистість** – це явище, яке полягає у наявності на листку рослини мозаїки із зелених і білих (або жовтих) тканин рослини. Строкатолисті рослини – це лише одна із різновидностей **рослин-химер**. Химери – це рослини, що

складаються з генетично різних тканин. Розрізняють секторіальні і периклинальні химери.

**Секторіальні химери** - це рослини, у яких генетично різні тканини утворюють в рослині різні сектори, наприклад, радіальні сектори на пластині листка.

**Периклинальні химери** – рослини, у яких шар тканин одного типу покриває шар тканин іншого типу або заключений між двома такими шарами.

Строкатолистість проявляється обома цими способами. Успадкування строкатолистості у химер має специфічний характер: так, зелені пагони химер продукують насіння, з яких розвиваються всі зелені рослини, строкаті пагони продукують насіння, з яких розвиваються і зелені, і строкаті, і білі (летальна ознака) рослини. Характер нащадків визначається тільки материнською рослиною. Пилок може бути будь-який і це не відображається на нащадках. Пояснення цього явища наступне: відновлення пластид відбувається незалежно від поділу клітин і при мітозі вони розподіляються між дочірніми клітинами випадково. Клітина, що має суміш зелених і білих пластид, утворює клітини і зі змішаними пластидами і з одноманітними пластидами – зеленими або білими. Відповідно, з цих клітин можуть утворюватись різні рослини. У деяких рослин (пеларгонія, енотера) пластиди передаються не тільки материнською клітиною, але і пилом, тому у строкатолистя форм цих видів характер пластид нащадків залежить від обох батьків, але при реципрокних схрещуваннях переважає значення материнської рослини.

Ядерні і пластидні гени можуть взаємодіяти між собою, бо властивості пластид визначаються не тільки генами пластид але і ядерними генами клітини, в цитоплазмі якої знаходяться ці пластиди. Це було продемонстровано, зокрема, на дослідях з міжвидовими схрещуваннями енотери. Виявилось, що у енотери наявні так звані **комплексні гетерозиготи** – гетерозиготи, у яких в межах кожного гаплоїдного набору всі хромосоми зв'язані між собою так, що в мейозі вони не перекомбінуються, а в кожному гамету потрапляє цілком або

один або другий з цих хромосомних наборів. Експериментували з наборами хромосом *gaudens* і *velans*. Постійність такої гетерозиготності підтримується збалансованими летелями: і *gaudens* і *velans* мають рецесивні летальні гени, але ці гени різні і в стані гетерозиготи подавлюються нормальними алелями. Досліди з міжвидовою гібридизацією енотери показали, що пластиди зберігають свої властивості в ряді поколінь, але отримують нові властивості як тільки потрапляють у клітину, що має відповідне сполучення геномів. Так, деякі білі пластиди в новому ядерному генному сполученні отримували зелене забарвлення.



Рис. 24. Приклад строкатолістості у рослин.

У кукурудзи виявлено ще більш складний тип взаємовідносин між геномами пластид і ядерними генами. У кукурудзи в ядрі є рецесивний ген *ij* у сьомій хромосомі. Цей ген обумовлює безколірність пластид. У рослин з генотипом *ij ij* або наявні білі смуги або ці рослини взагалі альбіноси – без хлорофілу. При схрещуванні:

$$P: \text{♀ } Ij Ij \times \text{♂ } ij ij$$

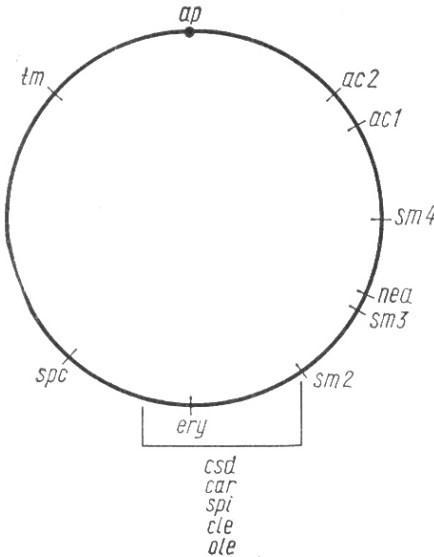
У першому поколінні всі рослини зелені, але реципрокне схрещування дає зелені, білосмугасті і білі рослини, тобто дефектні пластиди передаються тільки через яйцеклітини. При схрещуванні:

$$P: \text{♀ } ij ij \times \text{♂ } Ij Ij$$

Всі рослини у першому поколінні білі і білосмугасті, і у будь-якому числі поколінь нащадків цих рослин простежуються



тільки білі і білосмугасті рослини. Таким чином, пластиди, що стали безколірні під дією гена *ij*, стійко лишаються такими ж незалежно від ядерного генотипу клітини, в цитоплазмі якої вони знаходяться. Ці безколірні пластиди мають певний набір нормальних генів, але під дією гена *ij* у них виходить з ладу білок-синтезуючий апарат.



Сукупність генів пластид називається **пластом**. Гени, що розташовані в цитоплазмі називаються **плазмогени**.

Рис. 25. Генетична карта хромосоми хлоропластів хламідомонади. *Tm* – ген стійкості до підвищеної температури, інші гени –

гени стійкості до конкретних антибіотиків.

### Гени мітохондрій

Сукупність генів мітохондрій називається **хондріом**. Найбільш детально вивчені гени мітохондрій у дріжджів. Це пояснюється тим, що пекарські дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae*) - найзручніший еукаріотичний об'єкт для подібних досліджень (зручність культивування, можливість культивування як диплоїдних так і гаплоїдних культур, малі розміри геному і т.д.) Дріжджі мають специфічний клітинний цикл: Зигота – Диплоїдний клон – Споруючі і мейоз – Сумка – Spori – Гаплоїдні клони  $\alpha$  і  $a$  – Зигота.  $a$  і  $\alpha$  – це два статеві типи дріжджів, що можуть зливатися між собою під час статевого процесу. Деякі колонії дріжджів відрізняються малими розмірами (фенотип *petites* – «петіт»). Виявилось, що

клітини petites позбавлені ряду дихальних ферментів. При схрещуванні:

P: + X petites

F1: всі дикий тип (+) X petites

F2: всі дикий тип (+) X petites

F3: всі дикий тип (+) X petites і т.д.

Виявилось, що у petites у мітохондріях є тільки четверта частина ДНК притаманної нормальним клітинам, petites утворились у результаті делеції мітохондріальної ДНК, з якої випали ряд генів, які відповідальні за синтез цитохромоксидаз, клітина позбавляється здатності до аеробного дихання. При гібридизації нормальні мітохондрії розмножуються швидше дефектних і витісняють їх. У геномі мітохондрій дріжджів виявлено ще ряд генів стійкості до антибіотиків – рекомбінація цих генів не залежить від рекомбінації генів ядра.

### Плазміди

**Плазміди** – маленькі додаткові кільцеві хромосоми бактерій і дріжджів, що складаються всього з кількох тисяч пар основ, мініатюрні голі кільцеві ДНК, що здатні автономно реплікуватися, свого роду мініхромосоми бактерій. У бактерій плазміди функціонують у цитоплазмі, у дріжджів – у нуклеоплазмі. Величина плазмід, як правило, біля 1 % бактеріальної хромосоми, але є дуже дрібні плазміди, величина яких становить всього 0,05 – 0,1 % бактеріальної хромосоми.

Розрізняють наступні типи плазмід:

**Нетрансмісібельні плазміди** – плазміди, що не здатні включатися у бактеріальну хромосому.

**Епісоми** - плазміди, що здатні включатися у бактеріальну хромосому.

**Плазміди під сильним контролем** бактеріальної хромосоми – існують у вигляді 1 або 2 копій у цитоплазмі.

**Плазміди під слабким контролем** бактеріальної хромосоми – існують у вигляді сотень (більше 200) копій у цитоплазмі.

Плазміди, що здатні передаватись від одної бактерії до іншої в процесі кон'югації (навіть якщо ці бактерії належать до різних видів) називають **інфекційними** або **трансмисивними**. Властивості інфекційних плазмід визначаються групою генів, відповідальних за кон'югаційний перенос. Ці гени утворюють найбільший у бактерій оперон tra. Гени tra-оперона обумовлюють утворення спеціальних ворсинок або пилів на поверхні клітини. Ці пилі властиві клітинам чоловічого типу і необхідні для взаємодії двох бактерій, які вступають у процес кон'югації. Дрібні плазміди, які не мають власних tra-оперонів і можуть передаватись в іншу клітину лише за наявності трансмісивних плазмід називаються **мобілізаційними**.

Крім того, розрізняють плазміди:

**F-фактори** – статеві фактори бактерій

**R-фактори** – фактори стійкості до антибіотиків

**C-фактори** – коліциногени.

R-фактори (від англ. resistance – стійкість) – доволі крупні плазміди, несуть гени стійкості до антибіотиків. Крім того, ці плазміди часто мають гени, що викликають здатність бактерій створювати кон'югаційний місток навіть з бактеріями іншого виду. Наприклад, бактерія кишківникового тифу може стати стійкою до дії антибіотиків внаслідок проникнення у неї генів з *E. coli*. R-фактори можуть втрачатися бактерією і не відновлюватись при цьому, зокрема, під дією акридинів, які перешкоджають реплікацією плазмід.

Коліциногени – дрібні плазміди (*Col*-плазміди), передаються при поділі клітини нащадкам, можуть утворювати кон'югаційний місток і передаватись іншим бактеріям, деякі можуть вбудовуватись у хромосому бактерій. Коліциногени містять гени, що продукують особливі речовини – коліцини – речовини, що здатні навіть у дуже низьких концентраціях вбивати бактерій того ж виду, але які не мають відповідного коліциногену. Коліциногенів відомо декілька. Їх ділять на кон'югаційні коліциногени (наприклад, *ColI*, *ColB*, *ColIV*) і некон'югаційні (*ColE1*, *ColE2*, *ColE3*). Носії коліциногену імунні до відповідного коліцину, що дає їм відповідну перевагу

в порівнянні з бактеріями, не захищеними таким чином. У клітині може бути більше 20 різних коліциногенів одночасно. Коліцин виробляється бактерією-носієм не завжди, а тільки у випадку певної індукції, під час якої активуються гени коліциногена. Індукція часто самовільна, іноді можна викликати індукцію штучно, наприклад, опромінюючи ультрафіолетом чи діючи алкілюючими сполуками. При індукції коліцин вбиває не тільки чужі для популяції бактерії, але і саму бактерію-носія, що приноситься в жертву для блага всієї колонії. Іноді коліциногени взаємодіють з F-факторами, і бактерія втрачає можливість утворювати кон'югаційні містки. Крім бактерій, плазміді описані у синьо-зелених водоростей і дріжджів. Є підстави вважати, що плазміді зустрічаються і у еукаріот. Формування ентеропатогенних властивостей деяких штамів *E.coli* обумовлюють плазміді Ent (детермінують синтез ентеротоксину), Hly (визначають синтез гемолізіну), K (блокують деякі поверхневі антигени).

Також носіями цитоплазматичної спадковості можуть бути фаги і профаги, що можуть виступати в ролі епісом (M<sub>c</sub>, SPO1, λ).

Плазміді здатні суперспіралізуватися. Суперспіралізацію плазмід здійснює фермент гіраза в присутності АТФ, релаксацію плазмід здійснює фермент топоізомераза.

### **Паразити і симбіонти**

У природних популяціях дрозофіли знайдені самки, які дають виключно потомство самок. Виявилось, що ці самки заражені дрібними спірохетами, які спричинюють загибель ембріонів чоловічої статі. Якщо на таких самок подіяти високою температурою, то спірохети гинуть і самки починають давати потомство обох статей. Навпаки, якщо зробити ін'єкцію спірохет від зараженої самки до здорової, то її потомство буде складатися виключно з самок.

У парамецій (інфузорій) деякі штами виділяють речовину – парамецин, що не виявляє шкідливої дії на особин цього штаму, але згубно діє на інші штами цього ж виду. Штами, що

виділяють парамецин, отримали назву “кілерів”. У цитоплазмі кілерів знаходяться частинки розміром біля 1 мкм – так звані к-фактори - “частинки каппа”, що виявились дрібними бактеріями. У інфузорій було знайдено три домінантні гени K, S1, S2, що обумовлюють стійкість інфузорій до парамецину. Якщо інфузорія гомозиготна хоча б по одному рецесиву з цих алелей – парамецин її вбиває (наприклад, парамецин цетальний для штаму kk S1S1 S2s2). При статевому процесі інфузорії обмінюються тільки ядерним матеріалом (мікронуклеусами) – в результаті обидва ексон'югата отримують по гаплоїдному набору хромосом того і іншого кон'югата. При вегетативному розмноженні кіллер продукує тільки кіллерів, чутливі – тільки чутливих. При статевому процесі, якщо інфузорія-кіллер кон'югує з чутливою, то після розходження обидва кон'югати зберігають свої властивості. Це пояснюється тим, що при кон'югації інфузорії обмінюються тільки ядерним матеріалом – цитоплазма лишається негібридною. Але інколи кон'югація затримується, між інфузоріями утворюється цитоплазматична перемичка, коли затримка кон'югації довга, то цитоплазма обох інфузорій змішується і обидва ексон'югата виявляються кіллерами. Кіллерів можна звільнити від “частинок каппа” - діючи підвищеною температурою, рентгенівськими променями, алкілюючими сполуками. Цікаво, що гени K, S1, S2 не тільки охороняють інфузорій від згубної дії парамецину, але і потрібні для розмноження в них “частинок каппа (к)”.

У дрозофіли виявлені лінії, високочутливі до вуглекислого газу. При схрещуванні чутливих самок з нормальними самцями все потомство буде чутливим. При схрещуванні нормальних самок з чутливими самцями чутливість буде передаватися з дуже низькою частотою. Виявилось, що чутливість до вуглекислого газу у дрозофіл викликає особливий вірус, що був названий “фактор сигма ( $\sigma$ )”.

## Цитоплазматичні фактори невідомої природи

У багатьох живих організмів виявлено цитоплазматичні фактори спадковості, природу яких досі не вдалось встановити. Наприклад:

- 1) Успадкування незвичайної форми тіла інфузорій – так званої псевдоподвійної форми тіла – цей фенотип обумовлюється особливостями ектоплазми, формується подвійний набір кінетопластів. Фенотип обумовлюється якимось цитоплазматичним фактором, природа якого досі не встановлена.
- 2) Цитоплазматичний фактор  $\Delta$  - „дельта” дрозофіли, що підвищує частоту мутацій, змінює частоту кросинговера, вбиває зиготи певних генотипів. Природа його досі невідома, але відомо, що розмноження цього фактора залежить від наявності у другій хромосомі дрозофіли домінантного гена Da. Імовірно, мутантна копія гена Da може утворювати позахромосомні копії, які здатні розмножуватися у цитоплазмі. Поводить себе цей ген як вірус.
- 3) Цитоплазматичний фактор спадковості рослин з роду кіпрей. При міжвидовому схрещуванні рослин видів *Epilolium hirtusum* і *Epilolium luteum*, коли пилкок береться виду *E. luteum*, утворюються рослини з пригніченим ростом і стерильним пилком. При протилежному схрещуванні, коли пилкок береться виду *Epilolium hirtusum*, утворюються нормальні рослини.
- 4) Цитоплазматична чоловіча стерильність (ЦЧС). Найбільш детально це явище вивчено у кукурудзи. При запиленні рослин з ЧЧС нормальним пилком утворюються нащадки з абортивним пилком. Ознака передається якимось реплікуючим цитоплазматичним фактором. Згідно сучасної гіпотези цей фактор є особливою плазмідною мітохондрій. Якщо плазміда вбудовується у ДНК мітохондрій, то фертильність пилку відновлюється. Знайдено ряд хромосомних генів, що відновлюють фертильність пилку у певних лініях з ЧЧС. Гени подавлюють прояв генів ЧЧС,

але не перешкоджають реплікації факторів ЦЧС. ЦЧС описані також у одного виду двокрилих.

- 5) Гібридний дисгінез. Виявлений у дрозофіли. Явище гібридного дисгінезу полягає в тому, що при схрещуванні певних ліній мух нащадки характеризуються підвищеною мутабільністю, кросинговером у самців. Явище залежить від цитоплазми самок. У цитоплазмі є якісь стійкі фактори, що обумовлюють її несумісність з певними хромосомними генами, що викликають гібридний дисгінез.
- 6) Успадкування смугастості шкіри коней. При схрещуванні кобилиць зі смугастими конями всі нащадки кобилиць, не залежно від типів інших схрещувань, мають смугасту шкіру. Можливо, цей цитоплазматичний фактор подібний до вірусу. Навколо цього факту виникло багато псевдонаукових спекуляцій. У паранауковій літературі цей факт отримав назву цілого «явища», яке назвали **телегонія**.

## Лекція IX. МУТАЦІЇ

**Мутації** – це раптово виникаючі стійкі зміни генетичного апарату.

Здатність до мутацій називається мутування – універсальна властивість всього живого. Розрізняють різні типи мутацій, наприклад:

**Генеративні мутації** – мутації, що виникають у генеративних клітинах і передаються по спадковості.

**Соматичні мутації** – мутації в соматичних клітинах, що можуть призводити до генетичної мозаїчності чи до онкологічних захворювань.

Можуть бути різні підходи до класифікації мутацій. Так, можна розрізняти домінантні, напівдомінантні, рецесивні, летальні, напівлетальні мутації. Але прийнято класифікувати мутації не за фенотипічним проявом, а за характером зміни генетичного апарату. Тому розрізняють такі основні типи мутацій:

**Геномні мутації** – зміна числа наборів хромосом.

**Ануплоїдія** – зміна числа окремих хромосом

**Сегментні мутації** – перебудова хромосом.

**Генні (точкові) мутації** – зміни у нуклеотидній послідовності в середині конкретного гена.

### Геномні мутації. Поліплоїдія

Нормальний набір хромосом, що властивий для даного виду живих організмів, називається **ортоплоїдний** набір хромосом (відповідно, диплоїдний чи гаплоїдний для видів, основна фаза розвитку яких є гаплоїдна). Під час геномних мутацій набір хромосом збільшується у кратне число разів. Утворюються так звані поліплоїди. Серед поліплоїдів розрізняють:

Триплоїди – набір хромосом  $3n$

Тетраплоїди – набір хромосом  $4n$

Пентаплоїди – набір хромосом  $5n$

Гексаплоїди – набір хромосом  $6n$  і т. д.

Де  $n$  – гаплоїдний набір хромосом.

Також серед поліплоїдів розрізняють:



Рис. 26. Рослини диплоїдної (а) і тетраплоїдної гречки (б), листя диплоїдної (в-д) і тетраплоїдної (е-з) конюшини.



**Аутополіплоїди** – поліплоїди, у яких кілька разів повторений один і той же набір хромосом.

**Аллополіплоїди** – поліплоїди, що виникли в результаті міжвидової гібридизації, містять повтори різних наборів хромосом.

Поліплоїдні мутанти відомі і часто зустрічаються серед рослин. Поліплоїдні мутанти мають більші розміри всіх вегетативних органів, більші розміри клітин, сповільнений розвиток, вищу концентрацію цукрів у вакуолях клітин. Гаплоїдні мутанти значно дрібніші диплоїдів і менш життєздатні. Плодовитість поліплоїдів залежить від парного чи не парного набору хромосом. Поліплоїди з парним набором хромосом ( $4n$ ,  $6n$ ,  $8n$ ) називаються збалансовані поліплоїди. При мейозі у них утворюються не біваленти, а квадріваленти хромосом або два біваленти і розходження хромосом відбувається типово. Тетраплоїди іноді утворюють не квадріваленти, а один тривалент і один унівалент, що не бере участі у кон'югації. В такому випадку утворюються ненормальні набори хромосом – такі гамети часто нежиттєздатні. Тому поліплоїди мають нижчу плодовитість ніж диплоїди. Поліплоїди з непарним набором хромосом ( $3n$ ,  $5n$ ,  $7n$ ) стерильні.

Розрізняють також:

**Амфідиплоїди** – тетраплоїди типу  $2n+2n$  – подвійні диплоїди – містять по два набори хромосом обох батьківських видів. Життєздатні і плодовиті.

**Незбалансовані поліплоїди** – містять непарне число наборів хромосом. Мейоз завжди неправильний. Розподіл хромосом випадковий. Більшість гамет нежиттєздатні.

У гаплоїдів мейоз порушений ще у більшій степені.

При схрещуванні поліплоїдів нормальне менделівське розщеплення порушується. Наприклад, по фенотипу може бути розщеплення  $35:1$  – при схрещуванні тетраплоїдів.

**Шляхи виникнення поліплоїдії:**

- 1) поділ хромосом без клітинного поділу;
- 2) злиття соматичних клітин або їх ядер;

3) утворення гамет або спор з нередукованим числом хромосом внаслідок аномального мейозу.



Рис. 27. Поліплоїдні мутанти пасльону чорного. А – диплоїдна рослина (36 хромосом), Б – тетраплоїдна (72 хромосом), В – гексаплоїдна (108 хромосом), Г – октоплоїдна (144 хромосом).

Є цілий ряд факторів, що діють на мітотичне веретено – внаслідок ушкодження мітотичного веретена хромосоми, що мали б розійтися по дочірніх клітинах, об'єднуються в одне ядро. До таких факторів належать як фізичні фактори – різке коливання температури, так і хімічні фактори – колхіцин, колцемід, ацетонафтен, наркотичні речовини.

## Шляхи отримання гаплоїдних мутацій:

- 1) запилення рослин пилком далекого виду;
- 2) запилення пилком, хромосомний апарат якого інактивований опроміненням;
- 3) вирощування на штучних середовищах клонів гаплоїдних клітин, що отримані з пророслого пилку.

## Зміна числа окремих хромосом (анеуплоїдія)

Розрізняють такі основні різновидності анеуплоїдії:

- 1) Трисомія – наявність трьох гомологічних хромосом, каріотип типу  $2n + 1$ ;
- 2) Моносомія – наявність тільки однієї з гомологічних хромосом, каріотип типу  $2n - 1$ ;
- 3) Нулісомія – відсутність обох гомологічних хромосом, бракує цілої пари хромосом, каріотип типу  $2n - 2$ .

Анеуплоїдія спричиняє значну зміну фенотипічних ознак. Причому, у трисоміків простежуються менш значні зміни, ніж у моносоміків і нулісоміків. Це пояснюється тим, що додавання зайвих генів менше порушує процеси розвитку, ніж їх відсутність. Часто відсутність певних генів є летальністю.

Найкраще вивчена анеуплоїдія у рослини “дурман”. У дурмана в каріотипі диплоїдного набору 24 хромосоми ( $2n=24$ ). Було отримано 12 різних типів трисоміків ( $n=12$ ). Кожен

трисомік характеризувався характерним тільки для нього фенотипом.

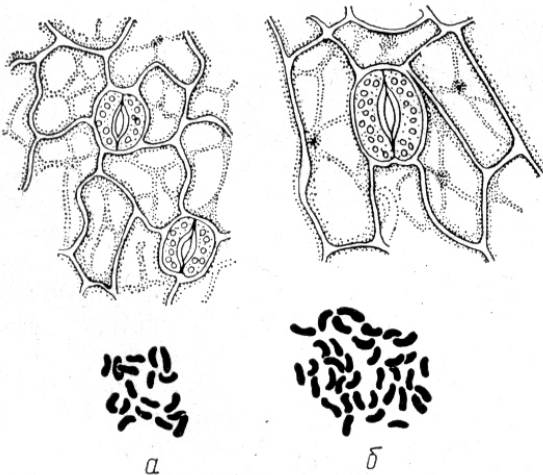


Рис. 28. Розміри замикаючих клітин устя, число хлоропластів у них у диплоїдного (а) та тетраплоїдного (б) цукрового буряку.

У людини теж бувають випадки трисомії окремих хромосом. Зокрема, трисомія 21 хромосоми спричинює патологію **синдром Дауна**, що проявляється у характерному фенотипі – розумова відсталість (до ідіотизму), змінена форма голови, сплющене обличчя, вкорочені кінцівки і шия, характерний розріз очей та інші аномалії розвитку. Як правило, хворі на синдром Дауна не доживають до 30 років. Частота виникнення - 1 на 700 новонароджених.

Трисомія по 8 хромосомі спричинює ще більш важкі аномалії – розумова відсталість. Косоокість, короткопалість, дефекти будови нігтів, збільшення вушних раковин та ін.



Рис. 29. Гаплоїдна (а) і диплоїдна (б) рослина томату.

Трисомія по 13 хромосомі викликає патологію **синдром Патау**, що фенотипічно проявляється у розщепленні верхнього неба (“заяча губа” і “вовча паща”), порушення діяльності нервової і серцево-

судинної систем. Частота виникнення - 1 на 5000 новонароджених.

Трисомія по 18 хромосомі викликає патологію, що називається **синдром Едвардса**, який проявляється у вадах практично всіх систем органів. Діти з цим синдромом, як правило, живуть біля 6 місяців. Частота появи – 1 на 10 000 новонароджених.

Трисомії по інших хромосомах спричинюють ще більш важкі порушення розвитку і, як правило, летальні.

Причини виникнення трисомії:

- 1) Нерозходження якоїсь пари гомологів під час мейозу, внаслідок чого у гамету потрапляє або обидва гомологи або жодного гомологу.
- 2) Схрещування поліплоїдів з диплоїдами.
- 3) Неправильне розходження хромосом при мітозах у генеративних клітинах.
- 4) Вплив зовнішніх факторів – температурного шоку, іонізуючого випромінювання.
- 5) Дія внутрішніх факторів, наприклад, старіння.

У трисомиків гени, представлені тривалентом, успадковуються інакше ніж інші гени – при гаметогенезі утворюється чотири класи гамет: 1AA:2A:2Aa:1a, тому розщеплення буде не 3:1, а 17:1 у фенотипі. Подібні схрещування дозволяють довідатись, у якій хромосомі локалізований той чи інший ген. Це цінно особливо для рослин, у яких відомий повний набір трисомиків. Також отримав у генетиці застосування моносомний аналіз – створення серії моносомиків або нулісомиків по кожній хромосомі з подальшою гібридизацією з нормальними рослинами.

### **Перебудови хромосом (сегментні мутації)**

При перебудовах хромосом число хромосом не змінюється, але одна або декілька хромосом отримують перебудови, що викликаються розривами, що супроводжуються з'єднанням фрагментів, що розташовуються інакше, ніж це було у вихідних немутантних хромосомах. Перебудови хромосом можуть зачіпати або тільки одну хроматиду – тоді вони називаються хроматидні перебудови або обидві хроматиди - тоді вони називаються хромосомні перебудови.

Розрізняють наступні різновидності перебудов хромосом:

**Недоліки (дефішенси)** – відривається кінцевий фрагмент хромосоми, що не містить центромери, хромосома виявляється вкороченою. Прикладом патології у людини,

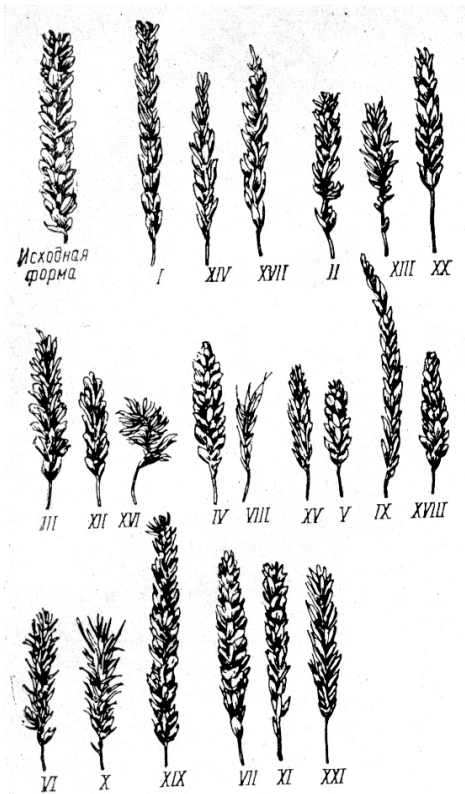
що виникає в результаті дефішенсу є **синдром котячого крику** – обумовлений дефішенсом у 5-ій хромосомі. Новонароджені з таким синдромом впізнаються по характерному крику, переважно рано гинуть, мають мікроцефалію, розумову відсталість.

**Делеції** – втрачається фрагмент хромосоми, але не кінцевий, а із середини хромосоми. Відбуваються внаслідок двох розривів, втрати проміжного фрагмента і з'єднання двох частин хромосоми, що лишилися. При делеціях часто відбувається прояв рецесивного гена, що лежить у гомологічній хромосомі, яка відповідає втраченому фрагменту. Наприклад, у гетерозиготних самок дрозофіли при делеціях у X-хромосомі можуть проявлятися рецесивні гени у – жовте тіло і w – білі очі. Прикладом патології у людини, що пов'язана з делеціями є **синдром Вольфа-Хіршохорна** – обумовлений делецією короткого плеча 4 хромосоми області p16, супроводжується чисельними вадами.

**Дуплікації** – подвоєння якої-небудь ділянки хромосоми – відбувається вставка в хромосому додаткового фрагмента або внаслідок нерівного кросинговера або при нерозходженні хромосом з делецією – тоді дуплікована ділянка хромосоми може існувати у вигляді маленької надкомплектної хромосоми. У фенотипі прояв дуплікацій слабший ніж делецій. Дуплікації мають велике значення для еволюції і виникнення нових генів.

**Інверсії** – змінюється порядок розташування генів у хромосомі – ділянка хромосоми, що утворюється у результаті двох розривів, знову вбудовується в неї, але повернутою на 180 градусів. Інверсії, як правило, не впливають на фенотип, але впливають на мейотичну кон'югацію, що приводить до нерозходження хромосом, утворення анеупloidних гамет. При інверсіях кросинговер утруднений, знижується здатність давати нормальне потомство. Важливі для еволюції – завдяки інверсіям відбувається розходження форм у середині виду.

**Транслокації** – перебудови хромосом, у яких беруть участь 2 або більше хромосом, що належать до різних пар хромосом – відбувається обмін ділянками між негомологічними хромосомами. У кожній з цих хромосом відбувається розрив і приєднання ділянки до іншої хромосоми. Інколи транслокації фенотипічно не проявляються – це так звані збалансовані транслокації, але часто при транслокаціях гени переміщуються у іншу групу зчеплення, що впливає на фенотип. Також транслокації часто впливають на мейоз, призводять до утворення нежиттєздатних зигот. Важливі



для процесу еволюції як фактор розходження форм в середині виду. Прикладом патології людини, що виникають в результаті транслокацій є філадельфійська хромосома – мініатюрна хромосома, що виникла в результаті транслокації  $t(9;22)(q34;q11)$ . Наслідком такої соматичної мутації може бути хронічна мієлобластна лейкемія.

Рис. 30. Колоски нулісоміків м'якої пшениці сорту «Чайна спрінг». Зміни викликані відсутністю

однієї пари гомологічних хромосом; Цифри показують, яка з 21 пари хромосом відсутня в даній рослині.

**Транспозиції** – вставки (інсерції) у якийсь місце хромосоми маленького фрагмента, що містить гени, не властиві цьому фрагменту.

**Центричне злиття** – злиття хромосом, яке супроводжується втратою однієї центромери і з'єднанням двох негомологічних акроцентричних хромосом в одну. Протилежне явище – **центричний поділ** – мутація при якій одна хромосома

поділяється на дві, кожна з яких має свою центромеру. Ці мутації називають

**Робертсонівськими перебудовами** за ім'ям Вільяма Робертсона, який злиттям хромосом спробував пояснити зменшення їх числа в хромосомних наборах деяких видів. Прикладом таких мутацій може бути кількість хромосом у людини (23 пари) і людиноподібних мавп (24 пари). Два плеча хромосоми 2 людини відповідають двом різним хромосомам мавп (12 і 13 хромосомам шимпанзе). Таким чином в процесі еволюції людини мала місце Робертсонівська перебудова.

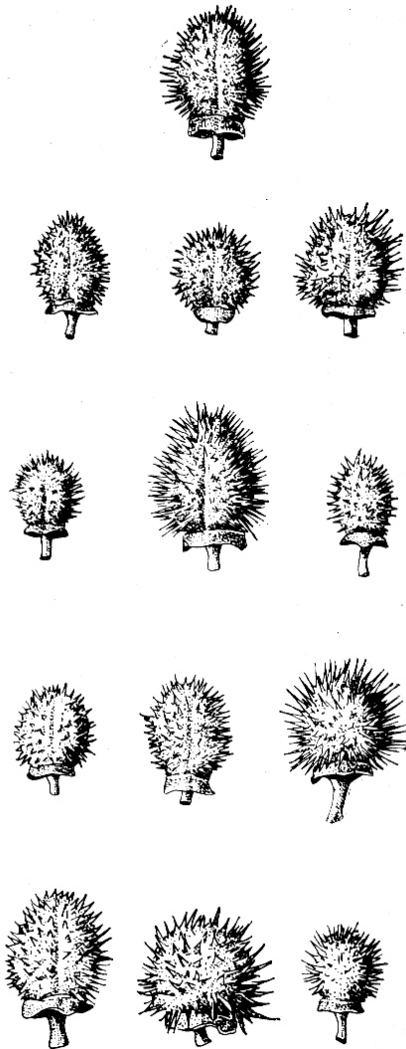


Рис. 31. Сім'яні коробочки трисоміків дурману ( $n=12$ ) (по Бекслі). Вгорі – у нормальної диплоїдної рослини ( $2n=24$ ), під ним – у трисоміків по



кожній з 12 хромосом галоїдного набору.

При хромосомних перебудовах проявляється так званий **ефект положення** гена. Вбудовування в хромосому стороннього фрагмента може впливати на прояв сусідніх генів. Часто це змінює дію і самого перенесеного гена. У дрозофіли виявлені летальні інверсії і реінверсії, зокрема, у Х-хромосомі. Також у дрозофіли зміна положення гена може привести до дестабілізації дії генів, що призводить до мозаїчності. Наприклад у гетерозиготи  $w+w$  виникають мозаїчні очі при переносі ділянки хромосоми з геном  $w^+$  на нове місце.

Ефект положення може бути стабільним і нестабільним або мозаїчним. До стабільного ефекту положення відносять такий ефект, за якого нормальний алель у зміненому геномному оточенні стабільно зберігає свій зовнішній вплив. Прикладом може бути зміна домінування гена  $ci$  (*cubitus interruptus*), який знаходиться в 4-тій хромосомі дрозофіли. Рецесивний алель цього гена в гомозиготному стані викликає переривчастість кубітальної жилки крила. Якщо в 4-тій хромосомі безпосередньо біля нормального домінантного алеля  $ci^+$  здійснюється розрив і обмін фрагментами з іншою хромосомою (транс локація), то цей домінантний алель не спрацьовує, і всі гетерозиготи  $ci^+/ci$  мають рецесивний фенотип (перервану кубітальну жилку). Підвищену мутабільність деяких генів можна пояснити особливостями їх локалізації у хромосомі. Доведено, що чимало мутантних фенотипів є наслідком незначних хромосомних порушень (мікро інверсій та ін.), які відбуваються поруч з відповідним нормальним геном.

### Генні мутації

**Генні мутації** – це стійкі зміни окремих генів. Це найбільша і найважливіша частка всіх мутацій, основа різноманітності генів і комбінаторної мінливості, матеріал добору. Мутація одного гена, як правило, зачіпає кілька ознак – в цьому проявляється явище плейотропії. У дрозофіли виявлено тисячі різних генних мутацій, що впливають на колір, розмір і

будову очей, колір і розмір тіла, колір, розмір і жилкування крил, будову черевця і ніг, будову вусиків, число, товщину і форму щетинок, плодовитість, довжину життя, серологічні особливості, ферменти, реакцію комахи на світло, тяжіння, поведінку і т. д.

Серед генних мутацій можна виділити: прямі і зворотні мутації.

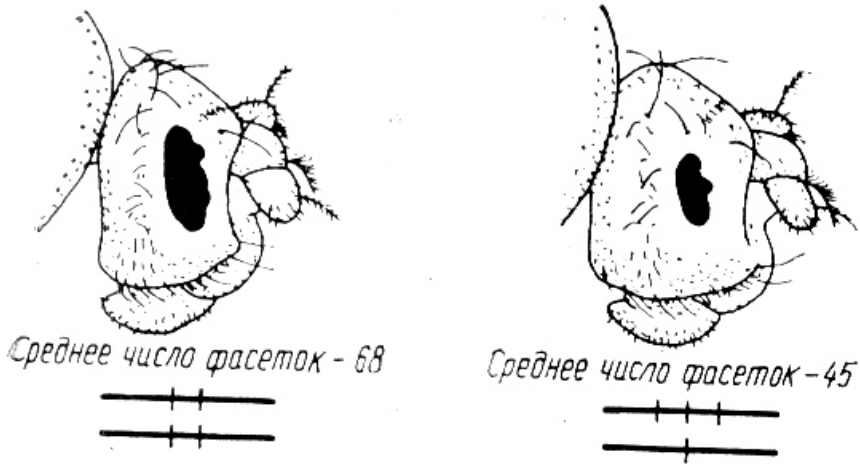


Рис. 32. Ефект положення в ділянці *Var* X-хромосоми дрозофіли.

Зворотні мутації або **реверсії** – це мутації, що повертають мутантний ген у його вихідний стан. Також можна виділити домінантні, напівдомінантні, рецесивні, летальні, напівлетальні генні мутації, мутації, байдужі до життєдіяльності, мутації, що покращують життєдіяльність, видимі мутації, приховані (латентні) мутації, “малі” (слабко помітні) мутації і т.д. Але частіше генні мутації класифікують по зміні кількості або якості біохімічного продукту (частіше всього фермента), синтез якого контролюється відповідним геном. Згідно такого підходу серед генних мутацій розрізняють:

**Гіпоморфні мутації** – генні мутації, в результаті яких ген мутує у рецесивний стан, для якого характерно зменшення кількості того ж біохімічного продукту, синтез якого визначається домінантним алелем гена. Приклад – мутація *eosin* ( $w^e$ ) – викликає світло-оранжевий колір очей у дрозофіли.  $w^e w^e$  – очі темніють,  $w^e w^e w^e$  – наближення до нормального кольору,  $w^e w^e w^e w^e$  – нормальний колір очей як і у  $w^+$ .

**Аморфні мутації** - генні мутації, в результаті яких повністю перестає вироблятися продукт, ген повністю інактивується. Генна мутація в цьому випадку не відрізняється від делеції. Приклад - мутація *white* ( $w$ ) – викликає білий колір очей у дрозофіли.

Гіперморфні мутації - генні мутації, в результаті яких кількість біохімічного продукту збільшується. Приклад: реверсія  $w^e \rightarrow w^+$ .

**Антиморфні мутації** - генні мутації, в результаті яких мутантний алель викликає утворення продукту, що гальмує синтез або дію продукту вихідного алеля гена. Приклад: мутація *ebony* ( $e$ ) – викликає розвиток чорного забарвлення тіла у дрозофіли,  $e e$  – чорне тіло,  $e e e$  – ще чорніше тіло,  $e e e e^+$  - тіло світліє – антагонізм між генами  $e$  та  $e^+$ .

**Неоморфні мутації** - генні мутації, в результаті яких мутантний алель визначає синтез в організмі біохімічного продукту, що докорінно відрізняється від вихідного немутантного алеля і не взаємодіє з цим продуктом. Приклад: мутація *Hairy wing* ( $Hw$ ) – викликає розвиток на крилах дрозофіли чисельних щетинок.

Частота спонтанних мутацій різних генів у одного і того ж виду чи організму часто доволі різна, деякі гени здатні мутувати частіше за інші у сотні разів. Але якщо вивчена мутабільність – здатність мутувати, то можна вирахувати середню частоту мутацій певного гена того чи іншого організму. Для вищих організмів для індивідуального гена середня частота мутацій в нормальних умовах становить  $1 \times 10^{-5}$  на покоління, тобто на 100 000 гамет припадає в середньому 1 гамета, в якій цей ген мутантний. А значить, сумарна частота мутацій

виявляється досить значною за рахунок великого числа генів. Так, у дрозофіли в середньому 5 % гамет кожного покоління несуть мутацію. У людини частка мутантних гамет досягає 60 %.

Мутабельність перебуває під контролем геному. Різні у генетичному відношенні лінії мають різну мутабельність.

Є у геномі так звані **гени-мутатори** – гени, що сильно підвищують частоту генних мутацій. І **мутабельні гени** – гени, що мають виключно високу здатність мутувати. Прикладом мутабельних генів є гени *miniature* у дрозофіли:  $m^+$  - нормальні розміри крил,  $m_a$ ,  $m_b$ ,  $m_c$  - зменшення розмірів крил і зміна їх структури.

### **Лекція X. ПРИЧИНИ МУТАЦІЙ.**

У 1927 році Меллер вперше довів, що мутації можна викликати штучно, зокрема Рентгенівськими променями. Таким чином, були відкриті **мутагени** – фізичні і хімічні фактори, що викликають мутації.

#### **Фізичні мутагени**

До фізичних мутагенів належать: рентгенівські промені, гамма промені, бета частинки, нейтрони, альфа частинки, протони, ультрафіолет (іонізуюче випромінювання), а також різке коливання температури (дуже слабкий мутаген). До фізичних мутагенів різні живі істоти мають різну чутливість. Якщо доза опромінення перевищує певну межу, то відбувається настільки сильне порушення генетичного апарату, що викликає загибель клітин і організму.

Частота мутацій залежить від дози радіації – мутагенний ефект відповідає загальній дозі опромінення. Не грає ролі ні інтенсивність, ні час опромінення. Частота мутацій прямо пропорційна дозі опромінення:  $y = k + ad$

де  $y$  – загальна частота мутацій

$k$  – частота спонтанних мутацій

$a$  – коефіцієнт пропорційності

$d$  – доза опромінення

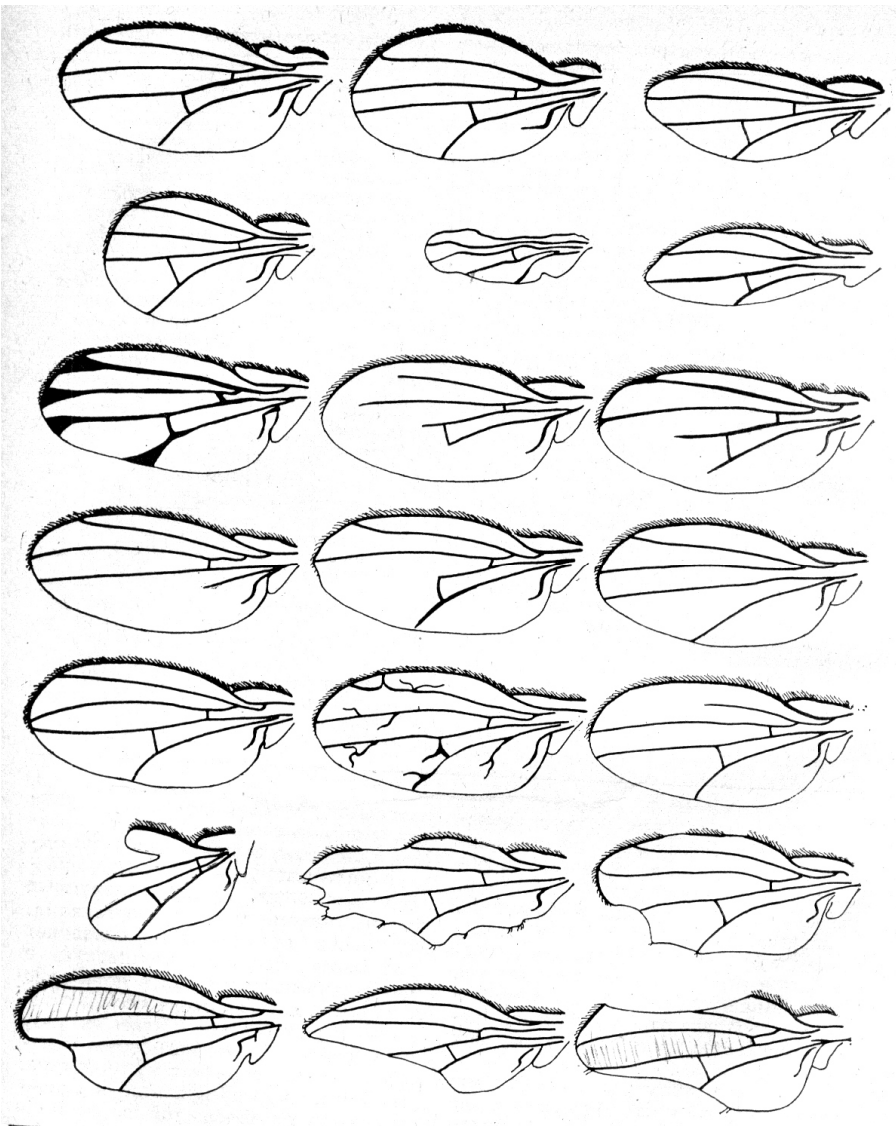


Рис. 32. Різні мутації дрозофіли, що зачіпають розміри, форму і жилкування крил. Крайнє ліве верхнє – нормальне, властиве не мутантним особинам.

Кожна мутація є результатом одиначної іонізації або збудження атому. Теоретично частота мутацій повинна б бути пропорційною квадрату дози, але цього не спостерігається по ряду причин: зберігаються тільки нелетальні мутації – інші не виявляються – клітини гинуть; репарація зменшує кількість мутацій.

Пояснення дії фізичних мутагенів було здійснено Тимофеевим-Ресовським, що розробив **теорію мішені**. Згідно цієї теорії мутації викликаються одиначним актом іонізації, що пошкоджує чутливу структуру клітини – мішень – спадкового апарату. Дія радіації на гени і хромосоми може бути пряма (основна) і посередня – за рахунок утворення вільних радикалів, які можуть реагувати з хімічними компонентами хромосом. Зокрема, внаслідок радіолізу води виникають радикали Н та ОН, що можуть діяти на ДНК. Доведено це було шляхом інкубації бактерій у опроміненій воді. При дії радіації на ДНК проявляється так званий **кисневий ефект**, що полягає в тому, що опромінення організму в атмосфері, що багата на кисень, призводить до більшого числа мутацій, аніж у атмосфері, що бідна на кисень. Це відбувається за рахунок утворення перекисних органічних сполук, що мають мутагенну дію.

Зростання частоти мутацій зі збільшенням дози радіації відбувається тільки до відомої межі, вище якої частота мутацій починає знижуватися. Пояснюється це тим, що при дуже великих дозах опромінення ураження генів і хромосом досягає такої степені, що клітини стають нежиттєздатними, а виживають ті, які не пошкоджені радіацією. Якщо статеві клітини, сильно вражені радіацією, все ще здатні брати участь у заплідненні, то зиготи, що утворюються, часто не можуть розвиватися або гинуть у процесі розвитку внаслідок появи так званих домінатних леталей. Все це призводить до зменшення числа мутацій, що виявляються серед нащадків особин, що були опромінені великими дозами випромінювання. Максимальна частота генних мутацій, що індуковані випромінюванням, зростає не більше ніж на 2 порядки. Спектр мутацій лишається тим же: гени, які рідко мутують у нормі, рідко мутують при

опроміненні; гени, які часто мутують у нормі, часто мутують при опроміненні.

Радіація більше підвищує частоту перебудов хромосом, аніж частоту генних мутацій. Особливо сильно підвищують частоту перебудов хромосом корпускулярні випромінювання внаслідок більш щільної іонізації середовища.

Живі клітини здатні до **репарації** – відновлення пошкодженого генетичного апарату.

Різні живі організми мають різну чутливість до іонізуючого випромінювання. Так, однакова доза рентгенівського опромінення індукує у дрозофіли у 4-18 разів менше генних мутацій, аніж у миші, у бактерій ще менше. Різні клітини одного живого організму теж мають різну чутливість до іонізуючого опромінення. Так, нервові клітини з усіх клітин найменш чутливі до опромінення, найбільш стійкі, зрілі спермії мало чутливі до опромінення, яйцеклітини – дуже чутливі до опромінення.

Ультрафіолетові промені (УФ) теж є сильним мутагеном. Але для цього випромінювання характерне явище фотореактивації – відновлення ДНК в присутності квантів світла. Так, довгохвильові ультрафіолетові промені частково подавляють мутагенну дію короткохвильових УФ. У клітинах наявний особливий фотореактивуючий фермент – фотоліаза – що виправляє дефекти, які виникають у ДНК при поглинанні УФ променів.

Різке коливання температури теж є мутагенним фактором, хоча і дуже слабким. Так, різке підвищення температури на 10 градусів у 3-5 разів підвищує частоту мутацій, причому виключно генних мутацій. Характер цих мутацій не відрізняється від спонтанних.

### **Хімічні мутагени**

Хімічні мутагени можна розбити на такі групи:

**Алкілюючі сполуки** – найсильніші хімічні мутагени – високоактивні речовини, що здатні переносити алкільні групи  $\text{CH}_3$ -,  $\text{C}_2\text{H}_5$ - і т.д. у інші молекули. До цих мутагенів

належать речовини: диметилсульфат, етиленімін, іприт, N-нітрозосечовина, 1,4-бисдіазоацетилбутан, етилметансульфонат, діетилнітрозосечовина. Остання речовина є найсильнішим з усіх відомих мутагенів – ця речовина підвищує частоту мутацій у мишей у 90 разів – у 5 разів більше, ніж максимально переносима мишами доза радіації. Перелічені сполуки називають ще супермутагенами. Всі хімічні мутагени, а особливо супермутагени, мають канцерогенні властивості.

**Аналоги азотистих основ** - 5-бромурацил, 5-дезоксисуридин, 5-фтордезоксисуридин, 8-азагуанін, 2-амінопурин, кофеїн і т.д.

**Акридинові фарбники** – акридин жовтий, акридин оранжевий і т.д.

**Збірна група** – речовини різного походження, що виявляють мутагенні властивості: азотиста кислота, гідроксиламін, перекис водню, уретан, формальдегід та ін.



Рис. 34. Порушення хромосомного апарату, що викликані вірусом кіру в клітинах нирок людини, що культивуються поза організмом.



**Чужорідна ДНК** – теж проявляє мутагенні властивості. Має високовибіркову дію. У деяких генів при дії чужорідної ДНК частота мутацій зростає на 3 порядки, але мутабільність інших генів лишається тою ж. Чужорідна ДНК сильно змінює спектр мутацій. Має дуже продовжений мутагенний ефект, дія розтягується на багато поколінь. Інші мутагени не мають такої продовженої дії. Механізм дії чужорідної ДНК – включення її у хромосому по типу транспозицій.

**Віруси** – теж є мутагенним фактором. У клітинах, що вражені вірусом, частіше відбуваються аберації хромосом, фрагментація хромосом, пульверизація хромосом, генні мутації. Доведено це було, зокрема, дослідями з дрозофілою – дрозофілам вводили непатогенні для них віруси, і це суттєво підвищувало частоту мутацій.

**Старіння клітин** – теж є мутагенним фактором, старіння клітин суттєво підвищує частоту мутацій.

Всі хімічні мутагени викликають більше генних мутацій, аніж хромосомних. Хімічні мутагени набагато більш ефективні, ніж фізичні, часто частка мутацій, що викликані хімічними мутагенами при комбінованій дії, становить 100 %. Як правило, при дії хімічних мутагенів спектр мутацій лишається той же. Хімічні мутагени мають так звану **продовжену дію** – дія хімічних мутагенів триває і через кілька клітинних поколінь після безпосередньої дії мутагена.

Мутагени є універсальними – викликають мутації у всіх живих істот.

Для всіх мутагенів не існує нижнього порогу їх мутагенної дії.

Серед речовин, що впливають на процес виникнення мутацій, розрізняють так звані **антимутагени** – речовини, що знижують частоту мутацій: цистеамін, хінакрин, похідні пропіонової кислоти, похідні галоїдної кислоти, кофеїн (у різних дозах він є то мутагеном, то антимутагеном) та ін.

## Причини спонтанних мутацій

До причин спонтанних (неіндукованих) мутацій належать фактори:

- 1) Природній фон, що виникає за рахунок природніх радіоактивних ізотопів таких як  $K^{40}$ , космічних променів, сонячної радіації. Але цим можна пояснити тільки дуже незначну частку спонтанних мутацій. Так, у дрозофіли лише 0,1 % всіх спонтанних мутацій можна пояснити дією цих факторів.
- 2) Випадкове пошкодження хромосом і генів по ходу нормальних метаболічних процесів, що відбуваються у клітині – помилки реплікації, вплив вільних радикалів.

## Лекція XI. МОДИФІКАЦІЇ ТА РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ ГЕНІВ

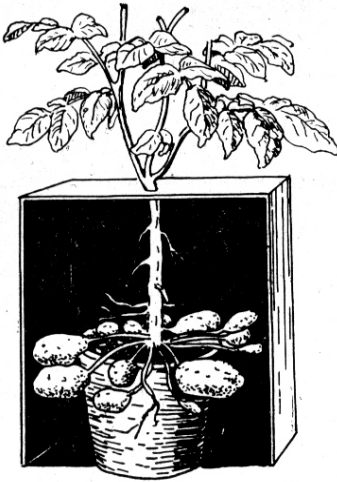
### Модифікації

При тотожному генотипі дві особини можуть бути фенотипічно несхожими. Це виникає за рахунок впливу зовнішнього середовища.

**Модифікації** – це фенотипічні відмінності, що викликані зовнішніми факторами у однакових у спадковому відношенні організмів. Фенотип визначається не тільки генами, отриманими від батьків, але і впливом середовища, в якому організм розвивається та існує. Модифікації важливі для процесу еволюції, бо відбір працює виключно з фенотипом.

Модифікації виникають як реакція організму на дію середовища – одна і та ж дія викликає однаково і цілком визначену модифікацію у всіх генетично схожих особин. Це основна відмінність від мутацій, які позбавлені направленості. Модифікації можуть відбуватися як на морфологічному так і на молекулярному рівнях. Прикладом модифікації на молекулярному рівні є процес засвоєння лактози *E. coli*: ця бактерія засвоює лактозу трьома ферментами – галактозидпермазою, бетагалактозидазою, галактозидтрансцетилазою. Якщо у поживному середовищі

лактози немає, то ці три ферменти не синтезуються. Якщо ж лактоза у середовищі з'являється – відбувається індукція синтезу цих ферментів. Ще один цікавий приклад модифікацій на молекулярному рівні – забарвлення крил метеликів, що залежить від температури. У метелика багатоколірниця з родини німфалід весною фон крил - рудий, літом фон чорний. Загальна закономірність прояву модифікацій така: степінь вираження модифікації пропорційна силі і довжині дії на організм фактора, що викликає модифікацію. Це корінним чином відрізняє модифікації від мутацій. Модифікації мають адаптивний характер. Модифікація являє собою корисну адаптивну реакцію організму на той чи інший зовнішній фактор. Приклади адаптивних модифікацій: зміна забарвлення у тварин, зміна густоти хутра у тварин, підвищення числа еритроцитів і вмісту гемоглобіну у людей, що потрапили в гори та ін. Але з



правила адаптивності модифікацій є винятки: адаптивними бувають тільки ті модифікації, які викликаються звичайними змінами природніх умов, які багато разів зустрічалися особинам даного виду протягом його минулої еволюційної історії.

Рис. 35. Морфози картоплі, що викликані затемненням стебла.

Якщо ж організм потрапляє в умови, які ніколи не зустрічалися ні йому, ні його предкам, то виникають модифікації, позбавлені адаптаційного значення. Прикладом таких модифікацій є поява на надземній частині стебла картоплі бульб при його ізоляції від світла. Не мають адаптаційного

значення, а часто навіть шкідливі модифікації, що викликаються фізичними чи хімічними факторами, які застосовуються в експерименті з інтенсивністю, що не зустрічається у природі. Такі модифікації називаються **морфозами**. Морфози у дрозофіли можуть викликати температурний шок, ультрафіолет, іонізуюча радіація. Деякі з морфозів нагадують відомі мутації. Такі морфози, що нагадують прояви відомих генів, називаються **фенокопіями**. Прикладом фенокопій, що викликаються хімічними факторами, є забарвлення жиру у курей. У курей є гени W – викликає розвиток білого жиру у курей і ген w – викликає розвиток жовтого жиру у курей. Але якщо у кормах відсутній каротин, то у курей навіть з генотипом ww буде розвиватися білий жир. Другий приклад фенокопій – ін'єкція інсуліну в курячі яйця, що призводить до появи курчат із сильними вадами розвитку (якщо ввести інсулін на 72 годині після початку інкубації – розвиваються курчата без хвоста, якщо ввести інсулін на 120 годині після початку інкубації, розвиваються курчата з вадами кінцівок, але нормальним хвостом та ін.). Третій приклад фенокопій – висока концентрація LiCl у воді при розвитку риб – у риб розвивається тільки одне око (циклопізм).

Отже, адаптивність модифікацій не є наслідком якоїсь початкової притаманної організмам здатності доцільно реагувати на дію факторів середовища, а являє собою результат попередньої еволюції.

Модифікації мають різну ступінь стійкості. Багато модифікацій є оборотними – зміна, що виникла, поступово зникає протягом життя особини, якщо зникає фактор, що викликав модифікацію. Приклад: засмаг шкіри у європеїда. Інші модифікації, особливо ті, що виникають на ранніх стадіях онтогенезу зберігаються протягом життя індивідууму. Приклади: вади розвитку, рахіт, касти у суспільних комах. Деякі модифікації можуть частково поширюватись і на наступне покоління (наприклад, дистрофія – у дистрофічної матері народжуються дистрофічні діти). Але така зміна поступово зникає, якщо особини потрапляють у нормальні умови. Дуже

рідко модифікації зачіпають кілька поколінь – це так звані **тривалі модифікації**. Приклад – дія миш'якової кислоти на інфузорій: якщо збільшувати концентрацію миш'якової кислоти поступово, виробляється стійкість до цієї отрути до концентрації 5 % (принцип або метод Мітрідата). Після припинення дії отрути модифікація буде зберігатися протягом 600 поколінь при безстатевому (вегетативному) розмноженні. Але якщо мав місце статевий процес, то ця модифікація зникає одразу після статевого процесу.

Модифікації мають неспадковий характер. Модифікації реалізуються у рамках норми реакції – здатності організму відповідати на дію зовнішніх факторів саме такими, а не інакшими модифікаціями. Багато модифікацій виявляються виключно у лабораторних експериментах.

## Регуляція активності генів

### Оперон

Кожна клітина організму, за невеликим винятком, **омніпотентна** – несе всю повноту генетичної інформації.

Гени здатні включатися і виключатися. Одиницею переключення генів у геномі є **оперон**. Теорію організації оперона вперше створили вчені Жакоб і Моно. Згідно їхньої теорії існують структурні і регуляторні гени. Найкраще оперон – його будова і функціонування, вивчений у прокариот. У еукариот оперон влаштований складніше.

Отже, **оперон** – це одиниця генетичної регуляції, система, що складається з одного або декількох структурних генів, що розташовані біля регуляторних генів.

З усіх оперонів найбільш детально вивчений лактозний оперон (lac-оперон). Основні структурні одиниці його такі:

**Сар-ділянка** – ділянка ДНК, до якої приєднується білок-активатор – Сар-білок (від англійського catabolite gene activation protein) – без цього білку РНК-полімераза не може зв'язатися з опероном і почати транскрипцію. Сам Сар-протеїн попередньо повинен бути активований цАМФ. Якщо концентрація цАМФ в

цитоплазмі знижена, то Сар-протеїн не здатний приєднатися до оперону.

**Промотор** – послідовність нуклеотидних пар, яку розпізнає РНК-полімераза, яка прикріплюється до промотора і потім просувається вздовж оперона, транскрибуючи його. Для різних оперонів і для різних живих організмів не існує єдиної промоторної послідовності. Є різні послідовності ДНК, що розпізнаються РНК-полімеразою. Але є спільні властивості різних промоторів. Так, всі промотори у позиції -35 (від точки початку транскрипції) мають послідовність TTGACA, а в позиції -10 розташований так званий Прібнов-бокс або як його ще називають ТАТА-бокс – послідовність ТАТААТ. Области -35 та -10 розпізнаються білком «сигма», який необхідний для точної ініціації транскрипції – точного розпізнавання РНК-полімеразою точки початку транскрипції.

**Оператор** – послідовність нуклеотидів, з якими зв'язується білок-репресор. Білок-репресор кодується геном  $I^S$ . Існують мутанти гена  $I^S$ . При їх наявності має місце явище **суперрепресії** – репресор зв'язується з оператором незалежно від присутності індуктора чи ефектора.

**Спейсери** – невеликі нетранскрибовані ділянки ДНК, що відмежовують регуляторні гени від структурних.

Далі розташовані 3 структурні гени – гени Z, Y, A, що кодують білки бета-галактозидазу, галактопермазу і трансацетилазу відповідно. Після них розташований термінатор.

**Термінатор** – це невелика ділянка ДНК, що служить “стоп-сигналом”, що припиняє рух РНК-полімерази. Перш ніж термінатор розпізнається, він зчитується РНК-полімеразою. Ці транскрипти закінчуються ланцюгом poly U, якому передують ділянка, що містить взаємно комплементарні послідовності в протилежних орієнтаціях. При цьому утворюються так звані “шпилечні структури”. Відмічено, що область шпильки збагачена CG – парами. Шпилечна структура розпізнається білком NusA, що є одним із компонентів РНК-полімерази. Серед термінаторів розрізняють р-залежні і р-незалежні термінатори. У р-незалежних термінаторах РНК-полімераза здатна

закінчувати синтез РНК при відсутності  $\rho$ -фактора. У них по ходу транскрипції спершу йде GC-багата послідовність з центральною симетрією, а потім послідовність з 4-8 розташованих залишків А в кодогенному ланцюгу. Транскрипція закінчується на кінці олігоА-послідовності або ж зразу за нею. Вважають, що після проходження РНК-полімеразою GC-багатої ділянки з інвертованими повторами в РНК-продукті виникає шпилька, що і призводить до зупинки РНК-полімерази і звільнення РНК з гібриду РНК-ДНК транскрибуючого комплексу. Цьому сприяє нестабільність ділянки гібридних послідовностей олігоА(ДНК)-олігоU(РНК), яка локалізується зразу ж за шпилькою. Виявлено білковий фактор тау ( $\tau$ ), який підвищує ефективність і точність термінації на  $\rho$ -незалежних термінаторах. Чисельні  $\rho$ -залежні термінатори впізнаються РНК-полімеразою лише за допомогою фактора  $\rho$  (46 kD), який виявляє РНК-залежну нуклеозидтрифосфатну активність за умов утворення фактором  $\rho$  комплексу з одонитковою РНК. Вважають, що фактор  $\rho$  сприяє витісненню РНК із транскрипційного комплексу завдяки гідролізу NTP, що призводить до конформаційної перебудови фактора  $\rho$ .

Іноді в оперонах зустрічаються внутрішні термінатори – **атенуатори** – регуляторні послідовності, які здатні плавно регулювати рівень транскрипції. Перед атенуатором, якій міститься в лідерній послідовності ДНК, є кілька послідовностей з центральною симетрією. Лідерна РНК, що на них синтезується, утримує чотири ділянки послідовностей, здатних утворювати шпильки в різних варіантах поєднання цих ділянок. Атенуатори виявлені у гістидиновому та триптофановому оперонах.

**Ефектором** в лактозному опероні є лактоза. Коли ефектор з'єднується з білком-репресором, це сильно змінює структуру репресора, і він не може зв'язуватися з оператором і РНК-полімераза зчитує структурні гени. Такий ефект зміни конфігурації регуляторного білку під дією низькомолекулярних речовин називається **аллостеричним ефектом**. Якщо репресор з'єднується з оператором тільки в комплексі з ефектором (як у

триптофановому опероні), то такий ефектор називають **корепресором**.

У деяких оперонах виявлені специфічні послідовності – енхансери – послідовності, які посилюють транскрипцію, активують стан промоторів, але можуть міститися при цьому і за межами промотора, досить далеко від нього. Механізми дії енхансерів досі не досліджені.

Існують різні оперони з різною системою регуляції активності генів. Розрізняють такі чотири основні типи регуляції активності генів:

1) **Негативна індукція** – регуляторний білок (репресор) при взаємодії з ефектором не прикріплюється до оператора і це дозволяє транскрипцію. Прикладом такої регуляції є lac-оперон.

2) **Негативна репресія** – до оператора прикріплюється білок-репресор, зв'язаний з ефектором. При відсутності ефектора дозволяється транскрипція. Прикладом такої регуляції є триптофановий оперон. Але цей оперон має свою специфіку. У триптофановому опероні є 5 структурних генів, оператор, 2 промотори – другий зі структурних генів не підпорядкований оператору.

3) **Позитивна індукція** - прикладом такої регуляції є aga-оперон (утилізація арабінози). Репресор, зв'язуючись з арабінозою, перетворюється в активатор.

4) **Позитивна репресія** – при цьому типі регуляції регуляторний білок, що активує оперон, інактивується ефектором.

Часто трапляються змішані типи регуляції активності генів – одночасно функціонують і репресор, і активатор (Cap-протеїн)

У еукаріот система переключення генів вивчена слабше. Основна відмінність полягає в тому, що у еукаріот має місце не індивідуальне, а групове подавлення генів – у ділянці хромосоми, у всій хромосомі, в усьому ядрі. Таке подавлення може здійснюватись гістонами – позитивно зарядженими білками, що взаємодіють з ДНК. Оперон еукаріот теж суттєво відрізняється від оперону прокариот. В першу чергу тим, що еукаріоти мають складний оператор, що складається часто з



п'яти різних операторів, кожен з яких здатний зв'язуватися з іншим репресором. Еукаріоти мають в опероні, як правило, лише один структурний ген, тоді як прокаріоти – до 12 структурних генів в опероні (оперон генів переносу F-фактора). Оперон може мати 1 або 2 промотора, 1 або 2 термінатора (2 термінатори працюють як блок, якщо один термінатор не спрацьовує). IS і Tn елементи здатні порушувати нормальну регуляцію активності генів. Так, наприклад, IS2 має власний промотор. І при транспозиції простежується залежність від орієнтації промотора. Якщо промотори зорієнтовані в протилежних напрямках – гени оперона не функціонують. Якщо промотори зорієнтовані в однакових напрямках – гени оперона функціонують безперервно, навіть якщо оператор репресований.

При дослідженні систем регуляції активності генів виявлено явище **фазової варіації**. Це явище виявили у бактерії з роду *Salmonella* – у збудника тифу мишей. Цей вид бактерій має 2 штами, що відрізняються джгутиковими антигенами. Ці антигени кодуються генами H1 та H2. У бактерій проявляється тільки один із цих генів, інший автоматично стає неактивним. Але фаза клону час від часу змінюється, ген H1 перестає проявлятися, починає проявлятися ген H2 і навпаки. Частота зміни фаз висока, мутаціями це не пояснюється. Причини цього явища полягають в наявності ділянки типу IS-последовності, що здатна до інверсій. При інверсіях змінюється орієнтація цієї ділянки. Інверсії здійснюються дією специфічного поліпептиду, що кодується особливим геном, що лежить в середині IS. У багатьох живих організмів є узгоджена регуляція різних оперонів. Прикладом такої узгодженої регуляції є каскадна регуляція, що найкраще вивчена у фагів. Так, фаг T4 має три групи гнів: переданні, ранні, пізні, які включаються каскадно.

## Лекція XII. ТОНКА БУДОВА ХРОМОСОМ І ГЕНІВ ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМА

Хромосоми вірусів і бактерій влаштовані відносно просто і являють собою кільцеву ДНК, що функціонує як один реплікон. Точка початку реплікації називається реплікатор. Значно складніше організовані хромосоми еукаріот.

### Молекулярна будова хромосом еукаріот

Хромосоми еукаріот містять гістони і негістонові білки, які зв'язуються з ДНК. Гістони – позитивно заряджені білки з дуже високим вмістом лізину (Lys) та аргініну (Arg). Гістони – найконсервативніші з усіх білків – будь-які мутації в генах гістонів тут же елімінуються. Розрізняють нуклеосомні гістони (H2A, H2B, H3, H4) та гістон H1. Нуклеосомні гістони, взаємодіючи між собою та ДНК, утворюють нуклеосому, що є одиницею хроматину. Нуклеосома складається з октамерного гістонового кору (8 нуклеосомних гістонів – по 2 кожного) та петлі ДНК розміром 146 нуклеотидів, що спіральсно обкручена навколо кору. Ділянки ДНК між нуклеосомами називаються **лінкерними ділянками**. Їх розмір – 60 нуклеотидів. Гістон H1 забезпечує укладку нуклеосомної “нитки намистин”. Не всі нуклеосоми упаковані однаково. Очищені гістони здатні *in vitro* формувати нуклеосоми з будь-якою ДНК, включно з бактеріальною. Нуклеосоми наявні у будь-якій ділянці хроматину, але не всюди вони розташовані однаково, невеликі зміни у нуклеосомній організації хроматину викликають модуляцію деяких важливих функцій геномної ДНК. Причому, структурна гетерогенність хроматину є у місцях розташування активних генів.

Гетерогенність нуклеосомних гістонів може виникнути за рахунок ацетилювання залишків лізину, фосфорилування залишків серину. Тільки частина гістонів кожного типу модифікується таким чином. Тому одні нуклеосоми мають модифіковані гістони, інші – нормальні. Ковалентні модифікації гістонів – зворотні. Ацетильні групи приєднуються ферментом

гістонацетилазою і видаляються гістондеацетилазою. Ацетилювання позбавляє лізин позитивного заряду. Клітини у відповідь на сигнал можуть швидко змінювати картину ацетилювання нуклеосом. Ацетилювання гістонів посилюється у тих ділянках хроматину, в яких знаходяться активні гени. Гістон H2A здатний з'єднуватись з висококонсервативним білком убікітіном – в результаті цього процесу виникає модифікований гістон uH2A, що властивий інтерфазному хроматину активних генів. Під час мітозу і конденсації хромосом цей комплекс зникає. Відомі і незворотні модифікації гістонів. Так, деякі клітини синтезують один або кілька мінорних варіантів гістонів, які відрізняються амінокислотними послідовностями. Гістон H1 теж проявляє гетерогенність. Виявлено 5 підтипів гістона H1, які можуть специфічно фосфорилуватися по певних амінокислотних залишках. Гетерогенність нуклеосом може бути обумовлена зв'язуванням їх з мажорними негістоновими білками. Регуляторних білків у ядрі клітини є мало – 1 білок припадає на 3 000 нуклеосом. Це так звані мінорні білки. Але є у ядрі і, так звані, мажорні негістонові білки, концентрація яких значно вища – 1 білок на 10 нуклеосом. До мажорних негістонових білків належать так звані **високорухомі білки** – або **НМГ-протеїни**. Ці білки мають малі розміри і великий заряд. Особливо зацікавили дослідників такі високорухомі білки як НМГ-14, НМГ-17, які є в усіх клітинах ссавців. Ці білки зв'язуються з нуклеосомами в районах активних генів. Дві молекули високорухомих білків безпосередньо приєднуються до нуклеосомної кор-частинки.

Крім того, подвійна спіраль ДНК всіяна білками, які впізнають специфічні послідовності нуклеотидів, утворюючи водневі зв'язки з певними азотистими основами і “відчуваючи” геометричну форму даної ділянки подвійної спіралі – це регуляторні білки. Виявилось, що подвійна спіраль ДНК може існувати у кількох формах. Найпоширеніша і найстабільніша – В-форма подвійної спіралі ДНК – правозакручена. Окремі ділянки ДНК мають ще правозакручену А-форму. Була виявлена і лівозакручена Z-форма ДНК. Наскільки вона поширена у живій

клітині – дискутується. Не виключено, що ділянки з різними формами подвійної спіралі ДНК служать сигнальними структурами для спеціальних регуляторних білків. В залежності від того, які саме нуклеотиди беруть участь в утворенні ДНК, змінюються параметри В-форми, утворюються мінорні зсуви ДНК.

Гістони обмежують доступність ДНК для інших ДНК-зв'язуючих білків, беруть участь у регуляції активності генів. Нуклеосомний кор перешкоджає взаємодії ДНК зі специфічними регуляторними білками. Регуляторний білок зв'язується з ДНК тільки тоді, коли він вільний від нуклеосом.

Нуклеосоми розташовані на ДНК не випадково. Такий специфічний розподіл нуклеосом називається фазуванням, а розташовані таким чином нуклеосоми називаються фазованими.

Області, вільні від нуклеосом, виявляються при обробці клітинних ядер слідовими кількостями фермента ДНК-ази I, яка при низьких концентраціях гідролізує вільну ДНК, але не діє на ділянки лінкерної ДНК і ДНК, що асоційована з нуклеосомами. Наявність гіперчутливих до ДНК-ази I областей хроматину свідчить про те, що хроматинові фібрили нагадують більше низку хроматинових глибок, аніж безперестанну гомогенну структуру. Ці гіперчутливі ділянки грають важливу роль у регуляції генної активності. Кожна хромосома містить тільки одну дуже довгу молекулу ДНК, що має петельну організацію. Гігантські петлі хроматину утворюються і підтримуються за допомогою ДНК-зв'язуючих білків, які впізнають специфічні нуклеотидні послідовності двох віддалених ділянок хроматинової фібрили і зближують їх. Утворюються серії петельних доменів, які відповідно утворюють смуги на хромосомах. Кожний петельний домен відповідає окремій функціональній одиниці. Різні хроматинові домени містять різні по структурі нуклеосоми. Це досліджувалось на політенних хромосомах – гігантських хромосомах слинних залоз комах. Виявилось, що політенні хромосоми мають **пуфи** – диски політенних хромосом, що частково декомпактизуються з початком транскрипції генів, що в них містяться.

Більша частина хромосомної ДНК не кодує ніяких білків. У деяких живих організмів виявлено аномально велику кількість ДНК, що припадає на одну клітину. Зокрема, у деяких земноводних і риб на одну клітину припадає ДНК у 30 разів більше ніж у людини. Кількість ДНК у багатьох споріднених видів сильно відрізняється – у амфібій кількість ДНК в залежності від виду може коливатися у 100 разів. Ці дані наштовхнули на створення гіпотези “егоїстичної ДНК”.

Особливий вид активного хроматину представлений ядерцями. ДНК в області ядерцевого організатора хромосоми складається з чисельних повторів генів рРНК – число таких повторів може складати кілька тисяч. Розділені повтори спейсерами – невеликими нетранскрибованими ділянками ДНК. Продукти транскрипції генів району ядерцевого організатора крупні молекули – попередники рРНК. Вони тут же “одягаються” білками, потім кожна з цих великих молекул

розпадається на дві нерівні частини, які разом з оточуючими їх білками проходять через ядерні пори у цитоплазму і утворюють велику і малу субодиницю рибосом.

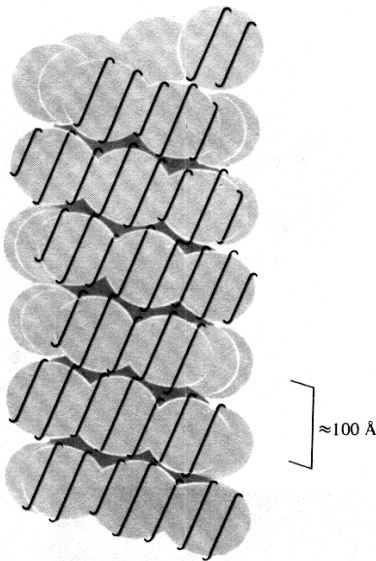


Рис. 36. Соленоїд хроматину, який утворюють нуклеосоми.

У деяких клітинах (зокрема, у ооцитах) відбувається **ампліфікація** генів рРНК – частина генів рРНК виходить з хромосоми у нуклеоплазму, розташовується

біля ядерної мембрани і продовжує автономно реплікуватися, причому число таких генів набагато перевищує число генів ядерцевого організатора. Є дані, що ампліфікуватися можуть і інші гени, що беруть участь в онтогенезі.

Другий спосіб збільшення числа генів рРНК називається **магніфікація** і спостерігається у тих випадках, коли частина генів втрачена у результаті нерівного кросинговера. Виявлена у дрозофіли. Відбуватися може у всіх клітинах ембріона. Полягає в тому, що гени рРНК виходять з хромосоми, існують деякий час у вигляді кільцевої ДНК і копіюються, а потім чисельні копії вбудовуються у хромосому.

### Тонка будова гена

Протягом історії генетики уявлення про ген змінювались. На світанку генетики ген уявляли як якусь сталу, непорушну структуру, свого роду неділимий атом спадковості, одиницю рекомбінації. Але після відкриття мутацій ці уявлення почали змінюватися. Постало питання – а що власне є одиницею спадковості? У тридцяті роки були проведені цікаві дослідження гену *scute*, що викликає редукцію щетинок у дрозофіли, і було показано, що цей ген складається із субодиниць, які впливають на різні групи щетинок.

У 1949 році М. Грін та К. Грін показали, що ген може бути розділений кросинговером. Вони дослідили ген *lozenge*, що зменшує розміри очей і викликає злиття фасеток у дрозофіли. Різні мутантні алелі цього гена при схрещуванні інколи давали нормальних нащадків. Так, у самок-гетерозигот по різних мутантних алелях  $lz^{BS} lz^g$  0,1 % нащадків мали нормальні очі. У самок гомозиготних по мутантних алелях цього гена  $lz^{BS} lz^{BS}$  ніколи нормальних нащадків не з'являлося. Причина цього феномену – кросинговер. Мутації  $lz^{BS}$  та  $lz^g$  зачіпають різні ділянки одного і того ж гена і при кросинговері можуть утворюватись нормальні гени. Після відкриття цього явища був запропонований так званий **цис-транс тест**. Стало зрозуміло, що мутації можуть розташовуватись у цис- і у транс-положенні:

$lz^{BS} lz^g / ++$  - цис положення, очі нормальні.

$lz^{BS} / ++ lz^g$  – транс-положення, очі *lozenge*.

Цис-транс тест дозволяє встановити, чи мутації зачепили два різних гени, чи розташовані в одному гені. Мутації можуть виникати у багатьох частинах гена – у багатьох сайтах.

**Сайт** – це відрізок гена, який змінений мутацією.

У зв'язку з вивченням складної структури гена було диференційовано поняття алелізму. Почали розрізняти два види алелей:

1) **Гомоалелі (ізоалелі)** – алелі, у яких відмінності між алелями торкаються тільки одного сайта.

2) **Гетероалелі** – алелі, у яких відмінності між алелями торкаються різних сайтів.

З'ясувалось, що розміри різних генів різні. Є короткі гени розміром біля 190 пар нуклеотидів (b.p.) –наприклад, гени тРНК і є крупні гени – розміром більше 16 000 пар нуклеотидів (16 kb) – наприклад, ген фіброїну шовку тутового шовкопряда. Пізніше було також виявлено, що у вірусів інколи один ген кодує абсолютно різні білки – за рахунок перекриття транскриптів і зсуву рамки зчитування. Аналогічне явище було виявлене і у еукаріот: у щурів один і той же ген в різних клітинах продукує різні білки – транскрипти мають різну довжину.

Після виявлення тонкої структури гена було запропоновано терміни:

**Цистрон** – мінімальна одиниця генетичної функції.

**Рекон** – мінімальна одиниця рекомбінації.

**Мутон** – мінімальна одиниця мутації.

### **Організація генома**

У вірусів геном організований відносно просто – геном містить виключно структурні гени. Іноді тільки один структурний ген.

У бактерій у геномі всі гени унікальні, крім генів рРНК і генів тРНК. Половина геному бактерій складають спейсери – невеликі некодуєчі ділянки ДНК. Функції цих спейсерів до кінця неясні. ДНК бактерій сильно спіралізована.

У еукаріот геном влаштований набагато складніше. Геном еукаріот містить величезну кількість генів, має складну систему контролю активності генів, гени повторюються багато разів в геномі, унікальних генів досить мало, є велике число

регуляторних генів, значна частина ДНК взагалі не містить генів.

Отже, геном еукаріот містить повтори послідовностей ДНК. Серед цих повторів можна виділити повтори середньої чисельності (повторюються в геномі десятки – сотні разів) і повтори високої чисельності (повторюються в геномі тисячі або й мільйони разів).

#### Повтори середньої чисельності це:

1) Повтори генів рРНК – гени 28S; 18S; 5,8S; 5S рРНК. Розташовуються гени 28S; 18S; 5,8S у геномі тільки трійками, таких повторів є до 1000 на геном. Трійки генів зібрані у кластери (блоки генів), що знаходяться у прицентромерних районах. Трійки генів відділені спейсерами, але ці спейсери транскрибуються. Три гени транскрибуються як єдине ціле, але потім у цитоплазмі розділяються. Генів 5S у геномі кілька тисяч. Також об'єднані у кластери. Причому ці кластери розташовані у хромосомі в інших місцях ніж кластери генів 28S; 18S; 5,8S

2) Повтори генів тРНК і гістонів. Організовані ці повтори у кластери. Генів гістонів по одному в кожному кластері кожного з усіх п'яти генів гістонів (H1, H2A і т.д.). Гени тРНК теж організовані у кластери. У кожному кластері є більше 200 генів тРНК.

Повтори середньої чисельності складають приблизно 25% геному.

#### Повтори високої чисельності:

1) Сателітна ДНК – кластери повтореної 150-300 разів короткої послідовності ДНК. У різних видів живих істот склад цієї послідовності різний:

Дрозофіла - пентамер АТААГ

Морська свинка – гексамер ТТТТТС

Миша домашня – СССТАА

Таких повторів у геномі є десятки мільйонів. У дрозофіли вони складають 4 – 12 % генома, у людини – 10 – 12 % генома, у крабів – більше 50 % генома. Кластери сателітної ДНК зосереджені переважно у прицентромерних районах і у інтерфазі являють собою гетерохроматин. Також містяться у теломерах. Є



у всіх еукаріот. Не несуть ніякої генетичної інформації. Відіграють чисто механічну роль у мітозі та мейозі.

2) Повтори АТ-пар, polyA-последовності до 200 нуклеотидів. Такі повтори складають до 1 % генома.

Але надлишкова ДНК цими повторами не пояснюється.

### Процесінг

У еукаріот у структурних генах містяться так звані інтрони – последовності ДНК, яких немає у зрілій мРНК і з яких не відбувається трансляції поліамінокислотної последовності. Під час трансляції у еукаріот утворюється в ядрі так звана гігантська ядерна РНК – гяРНК або промРНК. Під час виходу цієї РНК з ядра в районі ядерної пори відбувається процес вирізання інтронів і зшивання екзонів (кодуючих амінокислотну последовність ділянок РНК). Процес дозрівання мРНК називається процесінг, процес зшивання екзонів називається сплайсінг. Виявилось, що всі гени еукаріот містять інтрони крім генів гістонів. Інтрони виявлені також у генах багатьох вірусів еукаріот. Гени бактерій та бактеріофагів не містять інтронів. Але процесінг у бактерій теж є і зводиться до розпаду поліцистронних (полігенних) транскриптів на менші за розміром продукти окремих генів. Прикладом такого процесінгу є утворення тРНК і рРНК. Транскрипт-попередник синтезується на оперонах, що складаються з 16S, 23S, 5S і тРНК. У хромосомі *E. coli* є 7 таких *gpn*-оперонів, які відрізняються один від одного типами і кількістю генів тРНК. Спільний транскрипт цих генів, що включає 5600 нуклеотидів підлягає дії ендонуклеаз. Вирізання про-тРНК зі складу первинного транскрипту здійснюється РНК-азою III. У еукаріот зшивання фрагментів молекули РНК по схемі “кінець в кінець” після вилучення інтрона часто здійснюється без ферментів і без затрат енергії, тобто шляхом **самосплайсінгу**. У цих випадках молекула проРНК виступає в ролі автокаталізатора своєї перебудови. РНК, що здатні до біокаталізу, називаються **рибозимами**. Після вилучення інтронів та сплайсінгу розміри РНК значно зменшуються. Одночасно здійснюється модифікація 5'-кінця

РНК-продукту – до РНК пришивається специфічна нуклеотидна структура – так званий **кеп** (cap). До 3'- кінця щойно синтезованого попередника мРНК ядерний фермент poly(A)-полімераза добудовує поліаденіловий хвіст (тейлор) довжиною 150-200 нуклеотидів. Зазначена будова промРНК необхідна для нормального сплайсінгу і трансляції. Дозліджуючи сплайсінг про-РНК виявили, що сплайсінг одної і тої ж молекули РНК може відбуватись по різному при цьому можуть утворюватись різні мРНК. Тобто існує **альтернативний сплайсінг**, оснований на використанні різних екзонів (а деколи і інтронів) при утворенні зрілої мРНК. У ряді випадків окрема послідовність нуклеотидів у гені слугує екзоном за одного варіанту сплайсінгу і інтроном – за іншого. Різні способи експресії одного і того ж гена можуть призводити до утворення різних поліпептидів (так званих ізотипів або ізоформ). В окремих випадках у еукаріот наявний **транссплайсінг** – процес об'єднання в одній молекулі іРНК екзонів, що походять від первинних транскриптів різних генів. Прикладом транссплайсінгу є формування іРНК тубулінів трипаносом, що формуються з міні-екзонів та екзонів тіла які розміщуються у різних хромосомах.

### Сучасні уявлення про ген

Протягом прозвитку генетики уявлення про ген змінювались. Після відкриття ДНК ген уявляли як ділянку ДНК, що несе інформацію про синтез одного білка. Пізніше стало зрозуміло, що таке визначення гена не коректне – виявлено ряд регуляторних генів, що не транскрибуються. Тому було запропоновано нові визначення гена:

**Ген** – це ділянка молекули геномної нуклеїнової кислоти, що характеризується специфічною послідовністю нуклеотидів, являє собою дискретну одиницю функції, що відрізняється від функції інших генів і здатна змінюватись шляхом мутування. Або:

**Ген** – це послідовність нуклеотидів, якій може бути притаманна певна функція в організмі.

## Лекція XIII. МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ МУТАЦІЙ І РЕКОМБІНАЦІЙ

Всі пошкодження ДНК здатні клітиною репаруватися – виправлятися особливими репаруючими ферментами, що відновлюють нормальну будову молекули ДНК. Якщо репарація має місце – мутація не відбувається. Якщо ж репарація не спрацьовує, то основні механізми виникнення мутацій слідує:

1) Розрив вуглеводно-фосфатного скелету нуклеїнових кислот без відновлення, воз'єднання розірваних кінців. Такі розриви приводять як правило до хромосомних мутацій.

2) Вставки або випадання окремих нуклеотидів – привносять або до викривлення транскрипції або до зсуву рамки зчитування. Іноді, якщо відбулось дві мутації зсуву рамки зчитування поруч, то вони можуть бути супресорними адна відносно одної і нормальна функція гена буде відновлена. Аналогічно три однакових мутації зсуву рамки зчитування якщо вони однозначні і розташовані поруч нормалізують зчитування інформації.

3) Зміни азотистих основ. Розрізняють:

Транзиції: заміни типу пурин – пурин, піримідин – піримідин

Трансверсії: заміни типу пурин – піримідин або навпаки.

Зміни азотистих основ можуть привести до порушення нуклеотидного складу кодонів, серед яких розрізняють:

**Нонсенс мутації** – мутації при яких утворюється кодон, що не кодує ніякої амінокислоти.

**Міссенс мутації** - мутації при яких утворюється кодон, що кодує іншу амінокислоту аніж вихідний кодон.

Нонсенс мутації утворюють термінуючий стоп-кодон: UAG або UAA або UGA – ці кодони припиняють синтез поліпептидного ланцюга. Наприклад з кодону AAG, що кодує лізин може при мутації утворитись кодон UAG, що є стоп-кодомом. В такому випадку поліпептидний ланцюг білкової молекули вкорочується. Нонсенс мутації часто бувають летальні. Розрізняють **полярні нонсенс мутації** – нонсенс мутації, що знижують синтетичну активність всіх структурних

генів, що зчитуються в опероні пізніше. Причина цього – дія нуклеаз: мРНК обліплена рибосомами – це захищає її від дії нуклеаз (РНКази). Але якщо наявний зайвий нонсенс кодон, звільнюється від рибосом довга ділянка мРНК і збільшується імовірність руйнування її нуклеазами.

Розрізняють три типи нонсенс мутацій: амбер-мутація (UAG), охра-мутація (UAA), опал-мутація (UGA).

У бактерій існує явище супресії нонсенс-кодонів: існує ряд супресорних генів, що подавляють нонсенс-мутації. Це гени: *supD*, *supE*, *supF* – супресують кодон UAG, *supC*, *supG* – супресують *amber* і *ochre*-кодони. Ефективність дії генів-супресорів складає від 5 до 60 %. Механізм дії генів-супресорів нонсенс-кодонів полягає в тому, що ген-супресор (наприклад, *supD*) спричинює появи незвичайної різновидності тРНК (в цьому випадку серинової тРНК, антикодон якої здатний впізнавати UAG і включати у поліпептидний ланцюг амінокислоту серин на його місце). *SupF* кодує незвичайну різновидність тирозинової тРНК.

Міссенс мутації зустрічаються набагато частіше. Багато при місенс мутаціях залежить від того, яка саме заміна відбулася. Наприклад, заміни типу Val → Leu, Gly → Ala, Tyr → Phe несуттєві, це так звані консервативні заміни. Тоді як заміни типу Leu → Arg, Asp → Val суттєво змінюють заряд поліпептидного ланцюга. Дуже сильно впливають на поліпептидний ланцюг заміни типу Cys → ... - змінюється третинна і четвертинна структура протеїну, бо цистеїн – амінокислота, що містить сірку, і за рахунок неї утворюються дисульфідні містки у білковій молекулі. Особливо сильні порушення викликають міссенс-мутації, що зачіпають в генах тРНК ділянки, що кодують антикодони – в результаті цього змінюється дуже багато точок всіх білків.

### **Молекулярні механізми дії мутагенів**

1) Дія аномальних азотистих основ – 5-бромурацилу, 2-амінопурину та ін. та азотистої кислоти полягає в тому, що утворюються таутомерні форми азотистих основ за рахунок

зміщення атомів водню. Крім того, аномальні нуклеотиди таутомеризуються частіше. Так, аденін існує у двох формах: амінна форма – спарюється з тиміном (норма); імінна форма – спарюється з цитозином (аномалія). Тимін існує у таких формах: кето-форма – спарюється з аденіном (норма); енольна форма – спарюється з гуаніном (аномалія). В результаті виникнення таких таутомерних форм нуклеотидів утворюється мутантна молекула ДНК. Азотиста кислота дезамінує азотисті основи, в результаті чого аденін перетворюється у гіпоксантин, що спарюється з цитозином, а цитозин перетворюється в урацил, що спарюється з аденіном.

2) Дія алкілюючих сполук – змінює нуклеотиди, утворюються, наприклад, 7-метилгуанін, 7-етилгуанін, 3-метиладенін, 1-метилцитозин і т.д. Ці нуклеотиди утворюють водневі зв'язки з помилковими партнерами.

3) Ультрафіолетові промені викликають гідратацію нуклеїнових кислот та утворюють димери піримідинів.

Всі ушкодження ДНК здатні репаруватися. Розрізняють багато різновидностей репарації ДНК. Найбільш вивчені різновидності репарації – фотореактивація і темнова (ексцизійна) репарації.

**Фотореактивація** – усунення димерів піримідинів з ДНК під дією квантів світла певного діапазону спектра. Розрізняють неферментативну і ферментативну фотореактивації. Неферментативна фотореактивація – безпосереднє руйнування димерів при потраплянні у них кванту світла. Ферментативна фотореактивація відбувається з участю особливих ферментів – фотореактивуючого ферменту – фотоліази. Цей фермент впізнає димери тиміну одразу після їх утворення. Утворюється комплекс димер-фотоліаза, який є стабільним до того часу, поки на нього не потрапить квант світла певної довжини хвилі, який активізує фотоліазу. У результаті дії фермента димер роз'єднується.

Темнова або ексцизійна репарація виправляє різні дефекти ДНК. У цій репарації задіяно багато ферментів:

- 1) ендонуклеаза – впізнають пошкодження і надрізають ДНК.
- 2) Інша ендонуклеаза здійснює другий надріз і повністю вирізає пошкоджену ділянку.
- 3) Екзонуклеаза – розширює утворений проміжок у ДНК.
- 4) Полімераза – будує проміжок у ДНК.
- 5) ДНК-лігаза скріплює синтезовані кінці ДНК.

## **Лекція XIV. ГЕНЕТИКА ІНДИВІДУАЛЬНОГО РОЗВИТКУ**

Під час індивідуального розвитку організмів мають місце такі генетичні явища: пенетрантність, експресивність, плейотропність, взаємодія генів, генний баланс, комплементация, генетичний фон.

**Пенетрантність** - це здатність гена проявлятися у фенотипі. Вимірюється як частка особин гомозиготних по певному гену, у яких цей ген фенотипічно проявляється. При 100 % пенетрантності всі гомозиготні особини по цьому гену (наприклад, aa) мають фенотипічні особливості, що відрізняють їх від AA та Aa особин. Варіабельне співвідношення фенотипічних класів залежно від умов середовища або генотипічного фону носить назву **варіабельності пенетрантності**.

**Експресивність** – ступінь впливу гена на фенотип, інтенсивність (ступінь) прояву досліджуваної ознаки в залежності від генотипу та зовнішніх умов. Для аналізу експресивності визначають діапазон фенотипів від найменшого вираження до такого, де цей ген виражений найсильніше, загальну кількість особин ділять на кілька класів, що відрізняються ступінню вираження гена. Створюють систему цифрових балів вираження гена. Підраховують число класів і кількість особин у кожному класі. Наприклад, ген *eyeless* (*ey*) викликає у дрозофіли зменшення розмірів очей, але цей ген може по-різному проявлятися у фенотипі, відповідно, можна визначити експресивність і пенетрантність цього гена.

Пенетрантність і експресивність можуть залежати від умов середовища, в якому розвивається організм, і від інших генів геному. Є гени, які мають повну (100%) пенетрантність у будь-яких умовах і при будь-якому наборі інших генів. Істотне значення для пенетрантності і експресивності має **доза гена** – кількість копій гена у геномі, а також **положення гена** – місце розташування гена у хромосомі.

**Плейотропність** – це явище, при якому один ген впливає на кілька ознак. Плейотропність проявляє переважна більшість генів. Прикладом плейотропності є синдроми, характерні для багатьох мутацій. Так, моногенна домінуюча мутація, що викликає арахнодактилію (видовження пальців рук і ніг), одночасно викликає розвиток вад серця і порушення кришталика. Моногенна мутація, що викликає галактоземію (дефект фермента, що розкладає галактозу), одночасно викликає розвиток розумової відсталості, цирозу печінки, сліпоти. У дрозофіли виявлена моногенна мутація *rolupomorh* – ця мутація одночасно викликає розвиток рубінових очей, безколірних очок, неправильної будови тіла, вкорочених і хвилястих крил з вирізкою по краях, відсутність першої жилки на крилі, тонкі щетинки, знижену життєздатність, безпліддя самців і самок.

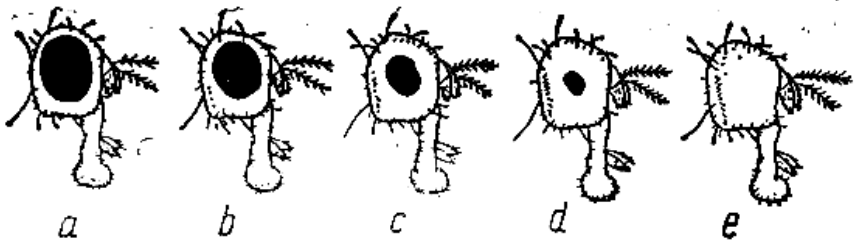


Рис. 37. Зміна експресивності гена *eyeless* у дрозофіли. а – нормальне око, б – е – різні ступінь редукції очей у мух, гомозиготним по гену *eyeless*.

Під час онтогенезу гени взаємодіють між собою. На дію конкретних генів на фенотип еукаріот впливає так званий генний баланс.

**Генний баланс** – це залежність ознаки від відповідного числа різних хромосом в клітинах організму, співвідношення числа генів, що містяться у хромосомах. Прикладом генного балансу може бути визначення статі у дрозозфіли. Стать у дрозозфіли визначається співвідношенням числа X-хромосом до аутосом. Якщо це співвідношення (S) рівне 1,5 -  $S=X/A=1,5$  то розвивається з такої зиготи так звана суперсамка – особина, у якої статеві ознаки самки гіпертрофовані. Суперсамки, як правило, безплідні. Якщо  $S=X/A=1$ , то розвиваються нормальні самки, якщо  $S=X/A=0,67$  – розвивається інтерсекс – безплідні особини, ознаки яких займають проміжне значення між ознаками самки і самця. Якщо  $S=X/A=0,5$ , то розвиваються нормальні самці. Якщо  $S=X/A=0,33$ , розвиваються суперсамці, які є безплідними.

**Комплементация** – це синтез кінцевого продукту з продуктів кількох генів. Наприклад, фермент лужна фосфатаза збирається з двох різних поліпептидних ланцюгів. Білок фібриноген – з трьох різних поліпептидних ланцюгів. Причому, кожен ланцюг кодується окремим геном.

**Міжallelна комплементация** – це комплементация алельних генів. Причому, молекула, зібрана з двох по-різному мутантних ланцюгів, може мати нормальну активність.

**Генетичний фон** – це вплив на прояв і вираз гена інших генів геному.

## Імуногенетика

Імуногенетика – це наука, яка вивчає спадкові фактори, які визначають синтез, різноманітність і специфічність антитіл – імуноглобулінів.

Імуноглобуліни являють собою білки, що виробляються у відповідь на введення в організм антигенів – чужорідних білків або полісахаридів, з якими імуноглобуліни специфічно зв'язуються, нейтралізуючи їх шкідливу дію. В розвитку



імунітету беруть участь в основному лімфоцити, що утворюються в кістковому мозку. Ці лімфоцити є двох типів: одні потім диференціюються у тимусі і називаються Т-лімфоцити, інші – в селезінці та лімфоїдних органах і називаються В-лімфоцити. Біосинтез антитіл здійснюється В-лімфоцитами або їх нащадками. Для цього потрібно щоб антиген зв'язувався на поверхні В-лімфоциту з імуноглобуліновими рецепторами, що мають спорідненість з цим антигеном. Але для більшості антигенів цього недостатньо. В-лімфоцит певної специфічності починає розмножуватись і диференціюється у зрілий плазмоцит, що синтезує імуноглобулін, тільки після того, як цей В-лімфоцит отримав позитивний сигнал від Т-лімфоцита, який теж повинен «впізнати» цей же антиген. Це процес кооперації В- і Т-лімфоцитів.

Процес синтезу антитіл контролюється різними структурними генами імуноглобулінів і генами інтенсивності імунної відповіді. Цей процес характеризується двома наступними особливостями. По-перше, це здатність лімфоцитів впізнавати молекули величезного числа антигенів і виробляти стільки ж різних імуноглобулінів, кожний з котрих специфічно реагує з тим чи іншим антигеном; при цьому роль Т- і В-лімфоцитів у впізнаванні антигенів різна – перші ідентифікують характер антигену, інші впізнають не тільки сам антиген, але і специфічний сигнал про цей антиген, отриманий від Т-лімфоцитів. По друге, це здатність лімфоцитів «запам'ятовувати» антиген, для зв'язування з яким вони синтезували відповідний імуноглобулін, і відповідати на повторне потрапляння в організм цього антигена прискореною і посиленою продукцією цього ж імуноглобуліну. Генетичні механізми, що визначають перераховані властивості обох типів лімфоцитів, вивчені головним чином у В-лімфоцитів.

Імунна система людини здатна синтезувати мільйони різних антитіл, що взаємодіють з мільйонами різних антигенів, багато з яких навіть не зустрічаються в природі. Постало закономірне питання – яким чином в геномі кодується така

колосальна різноманітність імуноглобулінів. Перша гіпотеза, яка була висунута, стверджувала – всі імуноглобуліни складаються з однакових поліпептидних ланцюгів, які змінюють свою конфігурацію, взаємодіючи з антигенами. Але ця теорія виявилась невірною. Антитіла виявились різними – кожне специфічне антитіло мало унікальну послідовність амінокислот. Наступна гіпотеза, яка висувалась, стверджувала: кожен імуноглобулін кодується окремим геном. Тоді ніякого найбільшого геному не вистачило б для такої кількості генів, і більша частина геному тоді б кодувала саме імуноглобуліни, що не відповідає стану речей. Пізніше виявилось, що геном людини містить всього біля 30 000 генів, а не мільйони. Дослідження 60-тих років ХХ століття виявили, що кожне антитіло складається з легких і важких ланцюгів. Кожен ланцюг має константну частину (С), яка однакова у всіх антитіл, і варіабельну (V), яка відрізняється у різних антитіл. В. Дрейер та К. Беннет висунули сміливу гіпотезу, яка потім була блискуче підтверджена дослідженнями Сусуми Тонегави. Виявилось, що по ходу дозрівання лімфоцитів у їхньому геномі відбувається перетасовка ділянок ДНК і формуються в кожному дозріваючому лімфоциті інакші гени, що кодують варіабельну частину імуноглобулінів. Таких ділянок ДНК, що комбінуються, є декілька – це V, D, J, C – послідовності, кожна з яких представлена серією різних ділянок – V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub>, .... і т.д. Ген варіабельної частини антитіла формується внаслідок перетасовки цих ділянок: наприклад, може сформуватися ген V<sub>3</sub>D<sub>2</sub>J<sub>1</sub>C<sub>3</sub>, або якийсь інший ген з іншої комбінації. За рахунок такої рекомбінації і виникає вся різноманітність антитіл.

При дозріванні В-лімфоцитів відбуваються три транспозиції, які докорінно змінюють генетичну структуру. До основної частини якогось V-гена прикріплюється одна з D-послідовностей. Потім утворений таким чином VD-ген сполучається з однією з J-послідовністю, що доповнює його. Відрізок ДНК, що знаходиться між ними вирізається. Наступний етап полягає в тому, що до такого VDJ-гена присувається один C-генів, знову ж таки з вирізанням ділянки ДНК, що лежить між

ними. В результаті в хромосомі зрілого лімфоцита є лише один VDJ-ген, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга молекули імуноглобуліну, один С-ген, що кодує її константну частину і поділяючий їх невеликий спейсер. Ця структура повністю транскрибується, так, що отримані при цьому промРНК мають транскрипти VDJ-гена, спейсера і С-гена. Під час процесінгу транс крипт спейсера викидається, а транскрипти VDJ-гена і С-гена виявляються локалізовані щільно один до одного. По такому ж принципу синтезуються легкі ланцюги імуноглобулінів.

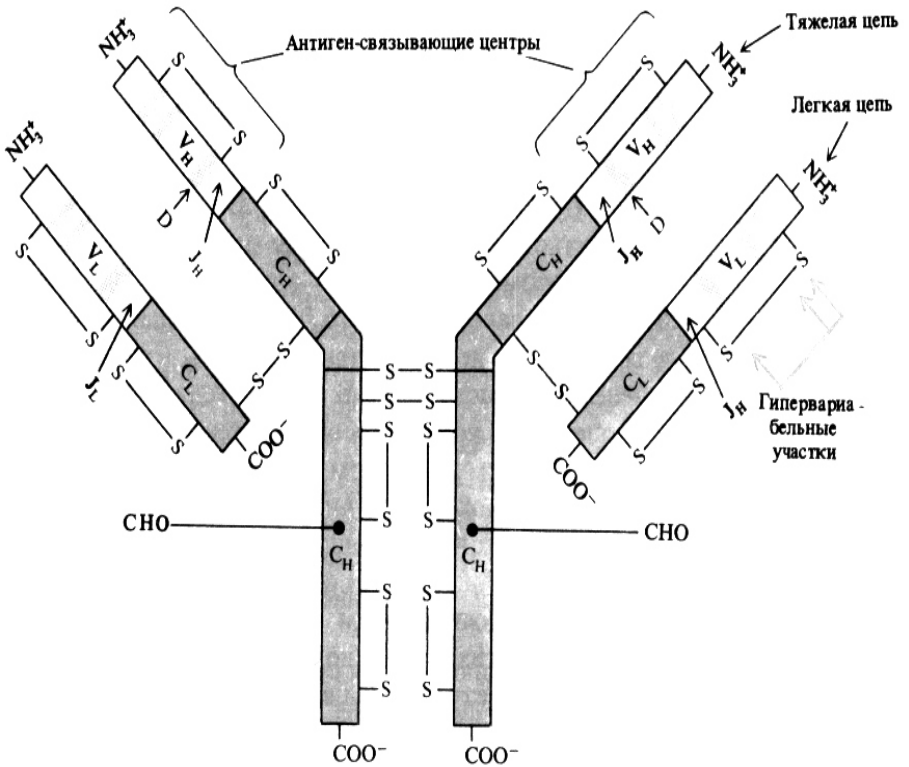


Рис. 38. Схема будови молекули імуноглобуліну.

## Онкогенетика

Дослідження соматичних клітин багатоклітинних еукаріот методом генетичної трансформації культур клітин за допомогою чужорідної ДНК призвело до відкриття генів, що беруть участь у **канцерогенезі** – виникненню і розвитку онкологічних захворювань. Ці гени були названі **онкогенами**. Окремі онкологічні захворювання обумовлюються одним єдиним геном – наприклад, ретинобластома, що успадковується по аутосомно-домінантному типу. Це захворювання проявляється в дитинстві як захворювання очей, що метастазує в мозок і призводить до ранньої смерті. Хоча лише для деяких онкозахворювань продемонстровано спадковий характер чи успадкування схильності до них, вважається, що на клітинному рівні переважна більшість онкозахворювань мають визначено генетичну природу. Ракова клітина передає свої неопластичні властивості дочірнім клітинам. Цим можна пояснити високу проліферативну активність ракових клітин. Тобто, перетворення нормальної соматичної клітини в ракову пов'язано з певними генетичними змінами в клітинах – найчастіше мутацією протоонкогена в онкоген або утворення химерного гена в результаті транслокації або мутації регуляторної частини протоонкогена. Було також виявлено, що деякі віруси викликають онкологічні захворювання шляхом вбудовування в геном клітини певних генів. Такі перетворення клітин називаються **онкотрансформацією**. Деякі ретровіруси високоонкогенні. Онковіруси були, зокрема, виявлені у щурів, мишей, мавп, котів, курей, індиків (наприклад, віруси саркоми Харвея і саркоми Малоні в щурів та мишей відповідно). Крім генетичної інформації необхідної для реплікації ці віруси мають специфічні гени, що викликають онкотрансформацію клітин. На сьогодні відомо, зокрема, 15 генів *onc*, включаючи ген *src* вірусу саркоми Рауса, ген *mos* вірусу саркоми мишей та ген *ras* вірусу саркоми щурів. Було виявлено, що онкогени гомологічні генам нормальних клітин ссавців не інфікованих онковірусами. Це дозволило припустити, що онкогени виникли з нормальних генів шляхом мутації. Крім того, онкотрансформація можлива в

результаті аномальної експресії нормального гена. Допускаючи існування **протоонкогенів** в нормальних клітинах дослідники зіштовхнулись з питаннями: який нормальний продукт активності цих генів? Як вони функціонують під час нормальної життєдіяльності клітини? Як ці онкогени викликають онкотрансформацію? Як виявилось, більшість протоонкогенів – це гени, які контролюють синтез ДНК та клітинні поділи. Розвиток злоякісної пухлини може бути викликано порушенням регуляції активності генів, які забезпечують процес клітинного поділу. До цих генів належать гени факторів росту різних типів клітин. Прикладом може бути онкоген *v-sis* вірусу саркоми мавп. (У цих позначеннях генів *v* – вірусний, *c* – клітинний). Цей онкоген кодує фактор росту тромбоцитів. Вірус саркоми мавп викликає пухлини тільки в тих тканинах які мають рецептори до ФРТ (фактору росту тромбоцитів). Механізми функціонування факторів росту наступні: пептидний фактор росту з оточення клітини зв'язується з рецептором фактору росту її плазматичної мембрани. У результаті рецептор фактору росту змінює конформацію, його цитоплазматична область отримує тирозинкіназну активність або здатність індукувати тирозинкіназну активність в інших молекулах мембрани. Це стимулює активність певних компонентів фосфоатидилинозитольного шляху. У результаті цих процесів виникає індукція деяких ядерних білків, що веде до змін транскрипційної активності клітини і початку синтезу ДНК. При інфікуванні вірусом клітин починається транскрипція гену *v-sis*, а потім трансляція з утворенням субодиниць ФРТ. Ця субодиниця розпізнається власними рецепторами клітин до ФРТ і служить сигналом для поділу цих клітин. Описаний процес називають **аутокринною стимуляцією**, яка не властива для організму, що розвивається. Проте, бувають випадки коли аутокринна стимуляція має місце і під час нормального ембріогенезу. Мова йде про цитотрофобласт ссавців. Ці ембріональні клітини здатні не тільки синтезувати ФРТ але і зв'язувати його. Відомі інші онкогени, що кодують білки, які імітують рецептори факторів росту. Онкоген *v-erb-B* вірусу

еритробластозу птахів кодує білок, що майже ідентичний до людського рецептора епідермального фактора росту (ЕФР). Цей білок являє собою цитоплазматичні і трансмембранні домени і тільки невелика частина його дійсно зв'язується з ЕФР. Вважається, що рецептори фактора росту, такі як рецептор ЕФР, активують фосфоліпазу С або прямо, або посередньо за допомогою білку G. Це викликає низку змін в клітині, які стимулюють поділ клітин. Інший онкоген, що імітує рецептор фактора росту – це онкоген *v-fms* вірусу саркоми Мак-Доноу кішок. Він імітує рецептор для КСФ-І фактора росту, специфічного по відношенню до макрофагів і їх попередників. Людський протоонкоген для рецептора КСФ-І подібний до *v-fms* картований на довгому плечі хромосоми 5 людини. Індивідууми з мікрodelеціями в цій ділянці хромосоми втрачають цей ген і характеризуються аномальним дозрівнням клітин крові. Екстракопії гена *v-fms* в клітинах кісткового мозку мишей стимулюють злоякісний ріст багатьох ліній кровотворних клітин. Деякі онкогени імітують елементи, що переносять сигнал, що стимулює поділ клітин, від мембрани до ядра. Вивчення таких месенджерів – одна з найбільш хвилюючих областей у вивченні раку і клітинного росту, оскільки ці продукти онкогенів можуть допомогти в ідентифікації гіпотетичних сполук-переносників. Онкоген *v-ras* вірусів саркоми Гарвея і Крістена кодує зв'язаний з мембраною білок з молекулярною масою 21 000 D, який зв'язує ГТФ та ГДФ. Ці ГТФ-зв'язані білки беруть участь в регуляції клітинного росту, контролюють ефекторні функції, відкривання в клітинній мембрані йонних каналів або активації протеїнкінази С. Ще один клас онкогенів – варіанти ядерних факторів. Функція цього класу онкогенів приурочена до періоду, коли сигнал до поділу надійшов і сприйнятий ядром. Ці онкогени кодуєть білки, які здійснюють відповідь ядра на цитоплазматичний стимул, що викликає мітоз. Подібна ситуація має місце у випадку дії онкогенів *v-myc* та *v-fos*. Протоонкоген *c-fos* експресується протягом дуже короткого часу, коли клітина переходить з фази G<sub>0</sub> до фази G<sub>1</sub> клітинного циклу. Продукт *c-fos* димеризується з

продуктом іншого протоонкогену *c-jun* утворюючи людський фактор транскрипції AP-1. Онкоген *v-fos* вірусу остеосаркоми FBV мишей забезпечує клітину такою ж інформацією.

Формування більшості людських пухлин обумовлено не вірусами. Існують інші механізми перетворення протоонкогенів в онкогени в результаті дії яких відбувається онкотрансформація клітин. Ці механізми включають соматичні мутації, ампліфікацію генів і перебудову хромосом. Ще у 60-тих роках ХХ століття стало відомо, що мутагени є одночасно канцерогенами (речовинами, що викликають розвиток злоякісних пухлин). Дослідження клітин раку сечового міхура людини дозволило виділити з цих клітин онкоген, який виявився гомологом онкогену *ras* вірусу саркоми Гарвея та Крістена шурів. Виявилось, що цей ген відрізняється від нормального людського гену всього одним нуклеотидом – кодон 12-тої амінокислоти замість GGG (кодон гліцину) стає GTG (кодоном валіну). Онкогенез шляхом ампліфікації генів був продемонстрований на прикладі нейробластоми людини. В клітинах цієї пухлини виявлені чисельні копії послідовності ДНК спорідненої з онкогеном *v-myc*. Цей ген був названий *N-myc* (N – нерв). Вважається, що ампліфіковані гени транскрибують велику кількість мРНК для відповідних білків. Надлишок матриці *myc* обумовлює велику кількість білка в клітині який в нормі швидко руйнується. Оскільки білок *myc* в нормі синтезується у відповідь на сигнали росту, що йдуть від клітинної поверхні, в результаті постійної присутності білка *c-myc* ядро буде отримувати сигнали росту, тоді коли насправді їх немає.

Онкогенез іноді відбувається шляхом **інсерції промотора**. Наприклад, у курей деякі онковіруси не несуть ніяких онкогенів, але мають сильний промотор, який вбудовується перед клітинним протоонкогеном і в результаті протоонкоген отримує під вірусний контроль.

Для лімфоцитарних пухлин людини виявлено онкогенез у результаті перебудов хромосом. Зокрема, при дослідженні лімфоми Беркітта (пухлина, утворена трансформованими В-

клітинами) виявлено, що в результаті перебудови хромосоми 8 ген *c-myc*, що контролює ріст потрапляє під контроль промотора чи інхансера імуноглобулінів.

Ще один шлях онкогенезу – онкогенез шляхом втрати генів, що подавляють пухлинний ріст (генів-супресорів пухлинного росту). Це було продемонстровано щодо різних форм ретинобластоми – спорадичної та спадкової. Серед членів сімей в роду яких спостерігались випадки ретинобластоми виявлено відсутність певної ділянки довгого плеча хромосоми 13. Було виявлено, що саме в цій області локалізований ген стійкості до ретинобластоми *p53*, таким чином, в їх клітинах наявний тільки один алель цього гену – будь-яка соматична мутація цього гену може бути причиною того, що клітина продовжить проліферацію і дасть початок пухлині. Білок RB, який кодується цим геном являє собою фосфопротеїн розміром 105 kD і здатний зв'язуватись з ДНК і фосфорилування якого залежить від стадії клітинного циклу. Було виявлено, що білок RB служить мішенню для трансформуючих білків онковірусів. Високомолекулярний T-білок вірусу SV-40, білок E1A аденовірусів, білок E7 вірусу папіломи людини – всі вони зв'язуються з нефосфорильованим (активним) білком RB. Ці білки можуть проявляти свою дію шляхом функціонального усунення клітинного білку RB, внаслідок чого виникають безперервні клітинні цикли.

## Лекція XV. ПОПУЛЯЦІЙНА ГЕНЕТИКА

### Закон Харді-Вайнберга-Кастла

Популяція – це група особин певного виду живих організмів, які здатні вільно схрещуватись між собою. Популяція – реально існуюча комірка, з якої складається вид.

Для вивчення генетики популяцій була запропонована модель – **ідеальна популяція** – популяція, в якій є повна панміксія (вільне невпорядковане схрещування особин), відсутні природний добір, мутаційний тиск, дрейф генів і потік генів. В реальному житті таких популяцій не існує. В реальних



популяціях є певні обмеження щодо схрещування, існує певна статева структура популяції – моногамія (рівне співвідношення самців і самок, що вступають у статевий процес), полігамія (явище, при якому у статевому процесі на одного самця припадає кілька самок), поліандрія (явище, при якому у статевому процесі на одну самку припадає кілька самців). Крім того, далеко не всі особини з популяції можуть вступати у статевий процес, співвідношення самців і самок, що вступають у статевий процес, може бути різним. Тому розрізняють поняття чисельність популяції – загальне число особин у популяції, і ефективна чисельність популяції, що вираховується за формулою:

$$N_e = \frac{4N_m N_f}{N_m + N_f}$$

де  $N_e$  – ефективна чисельність популяції,  $N_m$ ,  $N_f$  – число самців і самок, від яких утворюється нове покоління.

Генетику ідеальної популяції характеризує **закон Харді-Вайнберга-Кастла**, який виражається **формулою Харді-Вайнберга**, що характеризує частоти зустрічі в популяції генотипів та алелей:

$$p^2 AA + 2pq Aa + q^2 aa = 1$$

Де:  $p$  – частота зустрічі алеля  $A$

$q$  – частота зустрічі алеля  $a$

$p^2$  – частота зустрічі генотипу  $AA$

$q^2$  – частота зустрічі генотипу  $aa$ .

При цьому:  $p + q = 1$

Згідно закону Харді-Вайнберга, в ідеальній популяції в стані рівноваги частоти зустрічі генотипів повинні необмежено довго лишатися постійними. Формулу Харді-Вайнберга можна використовувати для розрахунку рівноважних частот зустрічі генотипів та алелей. Наприклад: припустимо, що у популяції чисельність генетичних класів співвідноситься так:  $2 : 2 : 1$ , тобто  $4AA : 4 Aa : 2aa = 8AA : 8 Aa : 4 aa$ , тоді чисельність алеля  $A$  буде становити  $8 + 4 = 12$ , алеля  $a$   $4 + 4 = 8$ . Тоді, прийнявши

загальне число генів за 1, отримуємо частоти зустрічі алелей: (А)  
 $p = 12/20 = 0,6$  (а)  $q = 8/20 = 0,4$   $p + q = 1$ . Тепер можна  
розрахувати, яке буде співвідношення частоти зустрічі у  
популяції алелей у наступному поколінні панміктичної  
популяції:  $p^2AA + 2pqAa + q^2 = 0,6^2 + 2 \times (0,6 \times 0,4) + 0,4^2 = 0,36$   
 $+ 0,48 + 0,16$ .

Формула Харді-Вайнберга справедлива при будь-якому  
співвідношенні генотипів, уже в наступному поколінні вони  
розподіляються згідно формули. Якщо гени зчеплені, то  
рівновага встановлюється через тим більше число поколінь, чим  
тісніше зчеплені гени.

Але у природних популяціях закон Харді-Вайнберга-  
Кастла порушується. Причин цьому є багато:

**1. Відсутність панміксії** або її обмеження. Крайній варіант  
обмеження панміксії – самозапліднення. При наявності  
виключно самозапліднення у популяції з кожним поколінням  
частка гетерозигот у популяції зменшується наполовину, а  
частота гомозигот невинно зростає, поки вся популяція не  
розпадеться на **чисті лінії**. Частку гетерозигот (К) у такій  
популяції можна визначити за формулою:

$$K = 2pq(1/2)^n$$

Де  $n$  – число поколінь,  $2pq$  – частка гетерозигот в  
поколінні  $F_0$ .

Порушення панміксії може відбуватись у формі, у якій  
особини з певними генотипами (однаковими чи різними)  
схрещуються частіше, ніж цього варто очікувати на основі теорії  
імовірності. Такі схрещування називаються **асортативні  
схрещування**. Вони не змінюють частот генів, але змінюють  
частоти генотипів. Формою асортативних схрещувань є  
**інбридинг** – схрещування між спорідненими особинами. У  
популяціях інбридинг приводить до збільшення частот  
гомозигот, що призводить до **інбердної депресії** – зниження  
життєздатності популяції. Мірою інбердності служить  
коефіцієнт інбридингу (F), який вказує на ймовірність  
знаходження в даному локусі двох ідентичних за походженням

алелів. Якщо спільні предки неінбердовані, то цей коефіцієнт можна розрахувати за формулою Райта:

$$F = (1/2)^{s+d+1} (1 + F_A)$$

Де  $s$  – кількість поколінь під батька до спільного предка,  $d$  – кількість поколінь під матері до спільного предка  $A$  (враховуючи і його),  $F_A$  – коефіцієнт інбридингу спільного предка.

**2. Дрейф генів** – зміна генетичної структури популяцій під впливом коливання чисельності популяції. Виникнення нової популяції з поодиноких або дуже малочисельних особин називається **ефектом засновника**. Зміна частот алелів, що виникають тоді, коли популяція різко зменшується в чисельності, називається **ефектом пляшкової шийки** (ефектом колби). Якщо популяція не дуже мала, то навіть незначні зміни частот алелів можуть накопичуватися протягом поколінь, тобто виявляти **кумулятивний ефект**. Іноді внаслідок коливання чисельності популяцій нова популяція може виникати з поодиноких особин або з дуже мало чисельних груп виду. Тоді нова популяція може суттєво відрізнятися від інших популяцій по генетичній структурі. Таке явище називається **ефектом засновника**. Така ситуація особливо характерна для ізолятів. Це може обумовити інший шлях еволюції новоутвореної популяції.

**3. Потік генів** – зміна генетичної структури популяції під впливом міграцій. Зміни частот алелів у популяції, що приймає мігрантів, тим значніші, чим більша доля прибулих і чим істотніше вони генетично відрізняються від старожилів. Нехай частка прибулих у популяції складає  $m$ , тоді наступне покоління отримує від старожилів частку генів, яка рівна  $1 - m$ , а від мігрантів  $m$ . Припустимо, що у місцевій популяції частота алеля  $A$  складає  $p_0$ , а у прибульців  $p$ . Тоді в наступному поколінні частоту алеля  $A$  в місцевій популяції можна виразити так:

$$p_1 = (1 - m)p_0 + mp = p_0 - m(p_0 - p)$$

Отже, зміна частоти алеля за одне покоління складає:

$$\Delta p = p_1 - p_0$$

А значить:

$$\Delta p = p_0 - m(p_0 - p) - p_0 = -m(p_0 - p)$$

А після  $n$  поколінь:

$$p_n = (1 - m)^n (p_0 - p) + p$$

**4. Мутаційний тиск** – зміна генетичної структури популяції під впливом мутацій.

Кожен ген здатний мутувати з певною частотою у інший алель. Нехай частоти мутацій у популяції становлять:

$A \rightarrow a$  ( $u$ ) – імовірність прямих мутацій

$a \rightarrow A$  ( $v$ ) – імовірність обернених мутацій

тоді:

$$\Delta p = vq - up$$

Причому зміна співвідношення частоти зустрічі алелей йде тільки до певної межі. Потім встановлюється рівновага:  $vq = up$  – мутаційний тиск зникає і встановлюється рівноважний стан. Таким чином, мутаційний тиск не може спричинити високу концентрацію певного алеля:

$$up = v(1 - p)$$

$$p(u + v) = v$$

$$p = v / (u + v)$$

$$q = u / (u + v)$$

**5. Тиск добору** – зміна генетичної структури популяції під впливом природного добору.

Позначимо пристосованість особин з певним фенотипом чи генотипом як  $w$ . Тоді коефіцієнт добору  $s$  буде становити:

$$S = w_{AA} - w_{aa}$$

Нехай імовірність залишити нащадків для особин  $aa$  на 10 % менша, ніж для особин  $AA$  і  $Aa$ , тоді  $w_{AA, Aa} = 1$ ,  $w_{aa} = 0,9$ .

У наступному поколінні:

$$p_1 = p_0 + p_0 s$$

$$q_1 = q_0 - q_0 s$$

Зміна частоти зустрічі гена  $A$  за покоління буде становити:

$\Delta p = p_1 - p_0 = (p_0^2 + p_0 q_0) / (1 - s q_0^2) - p_0 q_0^2 / (1 - s q_0^2)$   
якщо  $s q_0^2$  мале, то:

$$\Delta p = s p q^2$$

Добір, який дає перевагу рідкісним генотипам за певних умов середовища, називають **частотно-залежним добром**. Якщо на певний момент часу генотип є рідкісним, то добір буде

сприяти підвищенню його частоти; однак поступово, в міру того, як це відбувається, пристосованість цього генотипу зменшується, а пристосованість альтернативного генотипу зростає. Якщо існує частота, за якої пристосованість генотипів зрівнюється, до досягається стійка поліморфна рівновага навіть за відсутності гетерозису. Частотно-залежний статевий добір виникає, якщо ймовірність схрещувань певних генотипів залежить від їх частоти. Нерідко вибір статевих партнерів здійснюється на користь носіїв рідкісних генотипів та іммігрантів. Це явище називається **перевага статевих партнерів рідкісного типу**, було вивчене на дрозофілі, у якої воно виявляється в особливостях вибору самців самками. Самок і самців двох різних популяцій *Drosophila pseudoobscura* змішували в різних співвідношеннях. Виявилось, що в тих випадках, коли мухи однієї із популяцій були у виразній меншості (1:23) щодо мух іншої, то самці, що були в меншості, злучалися із самками в декілька разів частіше, ніж самці, що склали більшість. Частотно-залежний добір на користь рідкісних генотипів – це один із механізмів збереження генетичного поліморфізму популяцій, особливо важливий за появи у популяціях нових мутацій і генотипів.

Підсумовуючи основні закономірності змін генетичної структури популяцій, можна зробити такі висновки:

- 1) Коли  $p$  або  $q$  мале – добір не ефективний, тобто коли ген представлений у популяції єдиною аельною формою, добір може змінити генетичну будову популяції тільки в тому випадку, якщо в ній присутні альтернативні алелі.
- 2) Швидше всього добір діє при середніх значеннях  $p$  і  $q$ .
- 3) Виникаючі в популяції мутантні гени повинні досягти помітної частоти внаслідок мутаційного тиску або дрейфу генів раніше, ніж добір почне ефективно змінювати їх частоту.
- 4) Хід зміни генетичної будови популяції різний, в залежності від того домінантні чи рецесивні елімінуються гени.

## **Генетична гетерогенність природних популяцій**

Зміна генетичної будови будь-якої реальної популяції являє собою інтегральний результат загальної дії факторів: обмеження панміксії, дрейфу генів, потоку генів, порушення ізоляції, мутаційного тиску, тиску добору. У природних популяціях наявні чисельні рецесивні мутації, що приховано присутні у гетерозиготних фенотипічно нормальних особинах. Спектр цих мутацій не відрізняється від спектру рецесивних мутацій, що виникають спонтанно чи під дією мутагенів. Насиченість природних популяцій рецесивними мутаціями дуже велика і часто майже кожна фенотипічно нормальна особина є гетерозиготною по тій чи іншій мутації. Частота кожного окремого мутантного гена є низькою. Імовірність прояву мутантного гена є низькою. Набори рецесивних мутацій різні в різних популяціях. Таким чином, кожна природна популяція, ніби губка, вбирає в себе мутації.

Природні популяції за своєю гетерогенністю можна поділити на мономорфні і поліморфні популяції.

**Мономорфні популяції** – це популяції, що складаються з особин з типовими для даного виду ознаками, змінені особини трапляються у таких популяціях лише зрідка, бо рецесивні мутації із-за малої частоти ніколи не приходять у гомозиготний стан, а домінантні – низькопенетрантні і з'являються тільки у невеликої частини носіїв.

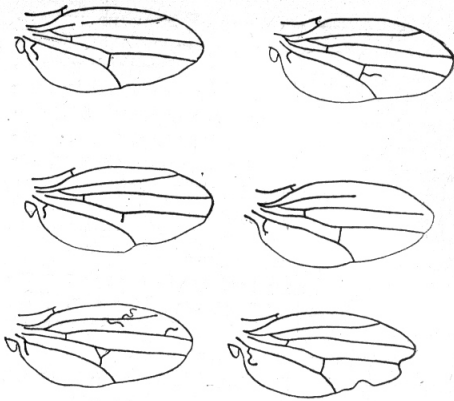
**Поліморфні популяції** – популяції, що утворені особинами кількох різних фенотипів чи генотипів. Кількісну оцінку поліморфізму популяцій провадять, використовуючи показники поліморфності (P) – доля поліморфних локусів з числа всіх досліджених локусів геному, і гетерозиготності (H) – відношення кількості гетерозигот до загальної кількості досліджених генотипів.

Причини поліморфізму природних популяцій:

- 1) модифікації;
- 2) генетичні, що реалізуються в результаті добору – гетерозиготи часто мають більше шансів лишити нащадків ніж

гомозиготи. Або ж добір може сприяти то одному, то іншому алелю в силу зміни умов середовища.

Поліморфізм або генетичну гетерогенність природних популяцій пояснюють за допомогою **балансової моделі** природних популяцій, що була розроблена С. С. Четвериковим. Згідно цієї моделі в популяції не існує стандартних генів дикого типу. Більшість генних локусів, а може й усі генні локуси, що є у хромосомах особин, зайняті генами, що належать до серій множинних алелів; еволюційні зрушення у популяції йдуть не шляхом добору якогось гена, а шляхом добору комбінації багатьох генів, алелі яких перебувають у певному співвідношенні (балансі) один до одного. Явище, при якому обидві гомозиготи мають меншу пристосованість (адаптивність) і життєздатність, ніж гетерозиготи, називають наддомінуванням або **гетерозисом**. Розрізняють репродуктивний гетерозис – який проявляється у підвищеній плодючості; соматичний гетерозис –



який проявляється у підсиленому рості і розвитку; адаптивний гетерозис – який проявляється у підвищенні загальної життєздатності. Гетерозис, який стосується виключно одного гена, при якому  $AA < Aa > aa$ , називають **моногенним гетерозисом**.

Рис. 38. Низькопенетрантні напівдомінантні мутації дрозофіли широко поширені у природних популяціях.

Причину такої переваги гетерозигот пояснюють **теорією біохімічного збагачення**, яка полягає в тому, що у гетерозигот можливий прояв нових форм міжалельної комплементарності, утворення гібридних білків-мультимерів для великої кількості ізоформ. Географічно розділені групи популяцій, що генетично

відрізняються одна від одної, називають **расами**. Відмінності між расами відносяться до генофонду в цілому, складаються із змін частот алелів по багатьом локусах. Але раси часто виділяють по якійсь одній ідентифікаційній ознаці, наприклад по забарвленню крил у метеликів.

Розрізняють **спадковий поліморфізм** – існування в популяції цілого ряду морфологічних форм, обумовлених генотипічною мінливістю і відтворюваних під час розмноження; і **збалансований поліморфізм** – поліморфізм, при якому у популяції між гетерозиготами і гомозиготами встановлюються певні кількісні співвідношення. Адаптивну взаємодію між генами, що складають геном, називають генетичною коадаптацією. В процесі затяжної еволюції сукупність найбільш коадаптованих генів може перетворитися у міцно зчеплені блоки коадаптивних генів, наявністю яких пояснюються адаптивні особливості популяцій, що існують у різних географічних широтах (кліматальні відмінності).

В одних і тих же популяціях між одними алелями існує коадаптація, тоді як між іншими вона не виявляється. Коадаптивними у відношенні певних алелів одного локуса іноді можуть бути лише деякі, а не всі алелі іншого локуса. Якщо алелі різних локусів в одних комбінаціях (гаплотипах) зустрічаються частіше, ніж в інших, то це прояв **нерівноважності по зчепленню**. Якщо ж алелі різних локусів поєднуються один з одним згідно з теорією випадковості, то популяція вважається рівноважною по зчепленню.

Природні популяції мають **генетичний вантаж (тягар)** – наявність генетичного вантажу – це явище, при якому генетична гетерогенність природних популяцій призводить до того, що середня пристосованість популяції завжди нижча тої, яка характеризувала б дану популяцію, якби всі її особини мали б генотип, притаманний найбільш пристосованим особинам.

Генетичний вантаж знижує пристосованість популяцій. Генетичний вантаж обумовлюється постійним утворенням менш пристосованих генотипів в результаті розщеплення і комбінування генів, безперервного виникнення мутацій,



більшість з яких негативні. Але в цілому для виду генетичний вантаж – це плата за можливість подальшого вдосконалення, бо процеси комбінації генів і мутації можуть бути корисними за тих чи інших умов існування. Генетичний вантаж є мобілізаційним резервом, з якого добір черпає матеріал для подальшої еволюції.

Здатність популяції зберігати свою генетичну структуру у відповідь на вплив чинників зовнішнього середовища називають **генетичним гомеостазом** в основі якого лежать механізми: збереження рівноважного стану структури популяції у відповідності до закону Харді-Вайнберга-Кастла; підтримка гетерозиготності і поліморфізму; збереження певного темпу і напрямку мутаційного процесу. Гени існують і відтворюються в цілісних організмах, де вони взаємодіють, утворюючи єдиний **генний баланс**. Тому прояв і збереження тих чи інших алелів у популяції залежить не тільки від факторів динаміки, але й від інших генів, що входять у геноми особин популяції. Природний добір сприяє збереженню в кожному локусі лише тих алелів, які найкраще взаємодіють з алелями інших локусів, тобто утворюють **оптимальний генний баланс**. Кожна нова генна або хромосомна мутація під впливом природного добору вилучається з популяції або зберігається з невисокою частотою, поки вона не потрапить у сприятливе генне оточення. Адаптивну взаємодію між генами, що складають геном, називають **генетичною коадаптацією**. Слабка експресія генів, пересаджених в інший геном, нежиттєздатність або стерильність міжвидових гібридів переконливо свідчать про важливість генетичної коадаптації. В процесі затяжної еволюції сукупність найбільш коадаптивних генів може перетворитися у досить у досить міцно зчеплені **блоки коадаптивних генів**, наявністю яких пояснюються адаптивні особливості популяцій, що існують у різних географічних широтах (**клінальні відмінності**). В одній і тій же популяції між одними алелями існує коадаптація, тоді як між іншими вона не виявляється. Коадаптивними по відношенню певних алелів одного локуса іноді можуть бути лише деякі, а не всі алелі даного локуса. Якщо алелі різних

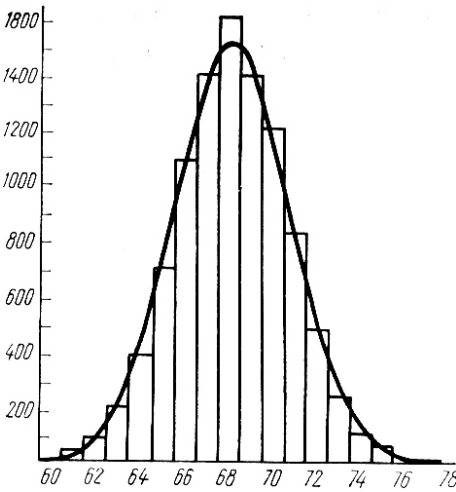
локусів в одних комбінаціях (**гаплотипах**) зустрічаються частіше, ніж в інших, то це є проявом **нерівноважності по зчепленню**. Якщо ж алелі різних локусів поєднуються один з одним згідно з теорією випадковості, то популяція вважається **рівноважною** по зчепленню. Рекомбінації зменшують нерівноважність по зчепленню, отже ймовірність збереження сприятливих сукупностей алелів у стані, нерівноважному по зчепленню, зростає за зниження частоти рекомбінацій між відповідними локусами. Це може бути наслідком транслокацій або інверсій. Якщо добір сприяє нерівноважності по зчепленню, то він буде сприяти також хромосомним перебудовам, які збільшують зчеплення між локусами. Декілька тісно зчеплених локусів, що впливають на прояв однієї ознаки або на цілу серію взаємопов'язаних ознак, називають **супергеном, складним локусом** або **множинним локусом**. Прикладом супергенів у людини слугують кластери гемоглобінових генів. Гени поліпептидних ланцюгів  $\alpha$ -типу, що входять до складу гемоглобіну, тісно зчеплені в послідовність довжиною 30 kb, локалізовані в хромосомі 16. Гени імуноглобулінів також утворюють супермени. Розташований у хромосомі 6 суперген HLA містить 4 локуси, які кодують антигени гістосумісності, а також деякі гени з близькими функціями.

Адаптивні зрушення в генетичній будові популяції, які спочатку є цілком зворотними, під час еволюційного процесу можуть закріпитися шляхом незворотних перебудов структури генотипів і це, очевидно, є основою подальшої дивергенції і видоутворення. Наука, яка вивчає процес адаптивності комбінацій генів, що виникають в популяціях називається **екологічна генетика**.

### **Генетика кількісних ознак як основа селекції**

Ознаки які простежуються у будь-якому організмі можна розділити на дві групи – **якісні**, які характеризуються дискретністю, альтернативністю і **кількісні** по яким між різними особинами спостерігаються поступові малопомітні переходи, а при розщепленні немає ясно виражених

фенотипічних класів. Ці ознаки доводиться вивчати шляхом вимірювань чи підрахунків, що дозволяють дати ознаці цифрову характеристику. До таких ознак належать вага, розміри тіла, плодovitість, вміст білків і жирів, число однакових частин в певному органі і т.д. Суворої межі між кількісними і якісними ознаками часто провести неможливо: деякі кількісні ознаки можуть мати дискретний характер (високий – карликовий та ін.) Але якісне описання таких ознак можливе лише в деяких випадках. Для дослідження успадкування кількісних ознак досліджувану ознаку вимірюють у всіх особин досліджуваної групи і отримані дані розбивають на довільне але невелике число класів в кожному з яких об'єднані особини більш чи менш схожі по значенню ознаки. Сукупність таких класів становить **варіаційний ряд** який зручно зображати у вигляді **гістограми** – стовбчиків з основами, що відповідають класовому інтервалу і висотою, що відповідає числу **варіант** (вимірених особин) в класі або у вигляді **кривої розподілу**. Кількісні ознаки більш



мінливі ніж якісні. Це пояснюється тим, що успадкування відмінностей особин по тій чи іншій кількісній ознаці обумовлені взаємодією багатьох пар полімерних генів, причому кожний ген виявляє суттєвий вплив на розвиток ознаки. Крім того кількісні ознаки сильніше залежать від зовнішніх факторів середовища ніж якісні.

Рис. 39. Розподіл по росту 10004 американських індіанців (чоловіків) по Девенпорту і Лав. Накладена теоретична крива нормального розподілу при тій же середній арифметичній і тій же мінливості. Ріст вказаний у дюймах. По горизонталі: ріст в дюймах, по вертикалі – число особин.

В якості мірила мінливості в цих випадках використовують **середнє квадратичне відхилення ( $\sigma$ )** яке вираховують по формулі:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum fa^2}{n-1}},$$

Де  $f$  – число варант в класі,  $a$  – виражене в числі класів відхилення кожного класу від класу в якому знаходиться умовна середня,  $n$  – число особин.

При схрещуванні особин, що відрізняються по кількісній ознаці в першому поколінні як правило не спостерігається домінування ознаки одного з батьків, в другому поколінні немає чіткого розщеплення на невелике число фенотипічних класів, що знаходяться між собою в певних і характерних чисельних співвідношеннях. Але кількісні ознаки теж підпорядковуються законам Менделя. Вперше це продемонстрував Нільсон-Еле. На основі результатів своїх досліджень він висунув гіпотезу згідно якій особливості успадкування кількісних ознак обумовлюються полімерними генами. Мінливість будь-якого кількісної ознаки в будь-якій групі особин обумовлена сумісною дією генетичних факторів і різноманітних факторів оточуючого середовища (сукупність яких об'єднують загальним поняттям **паратипічних факторів**). Коефіцієнт успадкування являє собою величину, що показує яка частка генетичної компоненти у фенотипічній мінливості кількісної ознаки яка вивчається. Фенотипічна мінливість ознаки характеризується середнім квадратичним відхиленням або квадратом цього відхилення – **варіансою ( $\sigma^2$ )**. Загальна фенотипічна варіанса ( $\sigma^2_P$ ) складається з варіанси, що обумовлена генетичною різноманітністю особин ( $\sigma^2_G$ ) та варіанси, що обумовлена паратипічними впливами ( $\sigma^2_E$ ). Тоді частка генетичної компоненти може бути виражена співвідношенням:

$$h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_E^2} = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_P^2}.$$

Це і є коефіцієнт успадкування. Цей коефіцієнт дозволяє судити лише про питому вагу генотипічної мінливості і тільки в конкретній групі особин.

## **Лекція XVI. ОСНОВИ ГЕННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

Сучасна генетика це перш за все технології маніпулювання з генами і методи роботи з рекомбінантними ДНК. Перші роки становлення генної інженерії не були радісним періодом захопленого змагання, що зазвичай буває на початку нової наукової ери. Замість того, щоб мріяти про нові захоплюючі відкриття, що очікують їх найближчим часом, вчені тривожились з приводу того, чи не будуть ці відкриття відкинуті на невизначено довгий час введенням суворих правил, що регламентують використання рекомбінантних ДНК. На щастя, найгірші прогнози і побоювання виявились безпідставними і сьогодні генна інженерія швидко розвивається і не обмежується заборонами. Ті неспокійні роки, які були відмічені спочатку введенням заборон і мораторію на роботу з рекомбінантними ДНК, а потім їх відміною, пов'язують з Асиломарською конференцією, на якій провідні вчені в області молекулярної біології і генетики прийняли правила, що регулюють роботу з ДНК. Сучасна генна інженерія має колосальні перспективи і покликана вирішити цілий ряд проблем, якими обтяжена нинішня цивілізація.

**Генна інженерія** – сукупність прийомів, методів, способів і технологій введення генів, виділених з певного організму чи штучно синтезованих у геном іншого живого організму з метою отримання нових сортів, порід чи видів живих організмів з корисними для людини властивостями.

### **Актуальність генної інженерії**

Розглядаючи актуальність **генної інженерії**, слід у першу чергу зауважити такі аспекти:

- **Екологічний аспект.** Сучасні існуючі хімічні, фізичні, енергетичні технології є екологічно брудні і небезпечні,

створюють цілий ряд складних екологічних проблем і ставлять людство на межу екологічної катастрофи. Сучасні класичні технології часто використовують невідновлювальні ресурси, які рано чи пізно вичерпаються і поставлять людство перед енергетичною і сировинною кризою. Генна інженерія покликана створити екологічно чисті технології, поєднані з повним кругообігом речовин у біосфері і використанням відновлювальних джерел сировини і енергії.

- **Соціальний аспект.** Чисельність людства продовжує інтенсивно зростати. Перед людством стоять проблеми регуляції чисельності населення, забезпечення населення продуктами харчування в умовах нестачі сировини, виснаження ґрунтів та інших екологічних та соціальних проблем. Ці проблеми можна було б вирішувати шляхом запровадження нових культурних рослин, тварин та мікроорганізмів, що здатні забезпечити людство екологічно чистою сировиною для сучасних технологій і харчування.
- **Медичний аспект.** В умовах перенаселення, інтенсивних міграцій населення, порушення екосистем, накопичення в біосфері мутагенів з'являються нові патологічні мікроорганізми (віруси та бактерії), що спричинюють виникнення епідемій (СНІД та ін.) Генна інженерія покликана створити нові засоби лікування та розробку більш дешевих технологій виготовлення медичних препаратів.

### **Історія генної інженерії**

Основні віхи появи та розвитку генної інженерії такі:

1871 рік – швейцарський вчений Фрідріх Мішер відкрив ДНК у спермі рейнського лосося.

1943 рік – Освальд Евері довів, що ДНК здатна змінювати спадковість бактерій.

1953 рік – Уотсон і Крік довели, що ДНК – комплементарна дволанцюгова структура.

1956 рік – Френк Сталь і Мет'ю Мезелсон довели, що спадкова інформація, що міститься у ДНК, кодується послідовністю пар основ.

1958 рік – доведено, що при реплікації ДНК відбувається розходження комплементарних ланцюгів. Виділена ДНК-полімераза-I – перший фермент, що каталізує синтез ДНК *in vitro*.

1960 рік – відкрита РНК-полімераза – фермент, що каталізує синтез РНК на основі ДНК-матриці. Відкрита мРНК та її функція.

1961 рік – синтезована перша штучна мРНК – polyU, розшифровані перші знаки генетичного коду.

1965 рік – встановлено, що резистентність до антибіотиків у бактерій обумовлена плазмідами.

1966 рік – повністю розшифрований генетичний код.

1967 рік – виділено ДНК-лігазу – фермент, що зшиває між собою фрагменти ланцюга ДНК.

1970 рік – відкрита перша рестриктаза.

1972 рік – вперше фермент ДНК-лігазу використали для зшивання фрагментів ДНК, отриманих за допомогою рестриктаз.

1973 рік – вперше у плазмідну ДНК вбудовані фрагменти чужорідної ДНК – створені химерні плазміди. Продемонстровано принципова можливість клонування в бактеріях будь-якого гена.

1974 рік – заклик до загального мораторію на дослідження в області молекулярної генетики.

1975 рік – Асіломарська конференція. Введення суворих правил роботи з рекомбінантними ДНК.

1976 рік – розроблені правила Національного інституту охорони здоров'я США щодо роботи з рекомбінантними ДНК. Заклик не присуджувати Нобелівські премії за дослідження в області вивчення ДНК.

1977 рік – створена перша генно-інженерна компанія (“Genetech”) по виробництву медичних препаратів з використанням методик рекомбінантних ДНК. Отримані перші рекомбінантні молекули ДНК, що містили гени ссавців. Відкриті мозаїчні гени. Розроблені методи секвінування ДНК.

1978 рік – присуджена Нобелівська премія за відкриття рестриктаз. З використанням методів рекомбінантних ДНК отримано перший людський гормон – соматостатин.

1979 рік – пом'якшення правил роботи з ДНК. Початок вивчення вірусних ДНК. ДНК пухлинних клітин використана для трансформації культури нормальних клітин. Початок вивчення ракових генів.

1980 рік – перше промислове виготовлення інсуліну з використанням методів рекомбінантних ДНК. Присуджена Нобелівська премія за створення рекомбінантних ДНК і за розробку методів секвенування ДНК.

1981 рік – населенню запропоновані акції компанії “Genetech”. На Уолл-стріт ці акції були оцінені у 200 млн. доларів. Вперше пренатально було діагностовано спадкове захворювання – серповидноклітинну анемію з використанням методик рестриктазного аналізу ДНК.

1982 рік – доведено, що чужорідні гени, введені у клітини тютюну, успадковуються згідно з законами Менделя. Виділено і клоновано в E. coli онкоген раку сечового міхура. Показано, що нуклеотидна послідовність гену раку сечового міхура відрізняється від його нормального гомологу єдиною нуклеотидною заміною.

1983 рік – розшифрована повна нуклеотидна послідовність ДНК фагу  $\lambda$ .

1986 – 2000 роки – здійснена програма “Геном людини” – повністю розшифрована нуклетидна послідовність геному людини.

### **Основна генетична речовина**

Після перевірки законів Менделя довгий час сподівалися, що внаслідок вдосконалення мікроскопічної техніки вдасться візуально побачити гени, що розташовані один за одним на хромосомі. Але після створення у 1940 році перших електронних мікроскопів ці надії виявились невиправданими. (Точніше ці надії пішли прахом, як піде колись все). На електронних мікрофотографіях на хромосомах не було виявлено



впорядкованих структур. Стало очевидно, що гени влаштовані складніше ніж очікувалось.

Під час перших досліджень окремо взятих хромосом, відокремлених від інших частин клітини, було виявлено в хромосомах два компоненти – ДНК і гістони – позитивно заряджені білки, що нейтралізують кислі групи ДНК. Ще у 20-ті роки ХХ століття Роберт Фольген винайшов барвники, які специфічно зв'язуються з ДНК. Виявилось, що ДНК локалізована виключно в ядрі, там, де міститься генетичний матеріал. Гістони виключалися з претендентів на роль носіїв генетичної інформації, бо вони відсутні в сперматозоїдах, які замість гістонів містять позитивно заряджені білки протаміни. Але вчені того часу продовжували вважати, що ДНК в клітині гомогенна і не може бути носієм генетичної інформації. Вони ще довгий час вважали, що якісь неловимі білки є носіями спадкової інформації.

РНК була відкрита ще в кінці ХІХ століття, але лише у 1920 році Фебус Левін (Рокфелерівський інститут) довів, що в ДНК цукор – дезоксирибоза, а в РНК цукор – рибоза.

Довгий час вважалось, що ДНК та РНК являють собою регулярні структури, в яких набір з чотирьох нуклеотидів весь час повторюється. Але існувала і альтернативна думка.

У 1928 році Фреді Гріффіт (Великобританія) провів досліди з бактеріями *Diplococcus pneumoniae*, які викликають летальну пневмонію у щурів. Вбиті нагріванням вірулентні бактерії при змішуванні з життєздатними невірулентними клітинами здатні трансформувати невелику частину невірулентних бактерій у вірулентні. Ці бактерії, стаючи вірулентними, виробляли полісахаридну клітинну стінку, наявність якої необхідна для прояву вірулентності. Таким чином, Гріффіт продемонстрував наявність якоїсь активної генетичної речовини, яка лишилась неушкодженою при нагріванні і яка може входити у невірулентні клітини і викликати їх генетичну трансформацію. Сам Гріффіт не зміг ідентифікувати цю речовину. Ці спроби продовжив Освальд Евері (США), який вважав, що ця речовина є складним

полісахаридом. Потім в результаті багаторічних досліджень Евері встановив, що трансформуючим фактором є ДНК. До цих висновків він прийшов на основі того, що трансформуюча активність специфічно подавлюється високоочищеним ферментом ДНК-азою, що руйнує виключно ДНК. Результати ці були вперше опубліковані у 1944 році. Але не дивлячись на це, більшість науковців вважало, що Евері просто не вловив певний “генетичний білок”, а його ДНК-аза була не досить чистою від протеїназ.

У 30-ті роки було встановлено, що ДНК являє собою лінійний полімер довжиною більше 1000 нуклеотидів. До 1951 року було встановлено, що цей полімер має 5' і 3' кінці. Також було ясно, що чотири азотні основи присутні у ДНК в майже рівних кількостях, але у організмів, що є еволюційно віддаленими, співвідношення кількості азотистих основ може суттєво відрізнятись. Чарграфф помітив, що зміна співвідношення азотистих основ відбувається не незалежно: вміст аденіну завжди рівний вмісту тиміну, а вміст гуаніну завжди рівний вмісту цитозину, тобто число пуринових основ рівне числу піримідинових. Цей висновок отримав назву **правило Чарграффа**. Сенс цього явища і правила довго лишався неясним.

У 1953 році Джеймс Уотсон і Френсіс Крік провели свої знамениті досліди і продемонстрували рентгеноструктурним аналізом те, що ДНК є подвійна спіраль. Стало зрозуміло, що ДНК є носієм спадкової інформації. Причому азотисті основи розташовуються всередині спіралі, цукор і фосфорна кислота – назовні. В нормальних умовах обидва ланцюги самостійно ніколи не роз'єднуються, але якщо ДНК проінкубувати при 100<sup>0</sup>С, то водневі зв'язки руйнуються, спіраль розпадається. Цей процес називається процесом денатурації ДНК.

Ще у 1940 році Полінг і Дельбрук висунули гіпотезу, що ген функціонує як шаблон або матриця, з якої робляться копії. У 1958 році були отримані докази того, що ланцюги ДНК роздвоюються при реплікації внаслідок успішних дослідів **Мет'ю Мезелсона і Франкліна Сталя**. Суть цих дослідів:

Виростили *E. coli* на середовищі, що багате на важкі ізотопи  $C^{13}$  та  $N^{15}$ . ДНК таких бактерій була важча ніж нормальна ДНК. Важку ДНК можна було легко відділити від нормальної центрифугуванням у  $CsCl$ . Коли клітини, що містили “важку” ДНК, перенесли у нормальне середовище, клітини поділились і вся “важка” ДНК була замінена на ДНК, що була проміжною по щільності між важкою і легкою. Повна відсутність важкої ДНК свідчила про те, що реплікація не є консервативним процесом, при якому комплементарні ланцюги лишаються зв’язаними. Поява ДНК з “гібридною” щільністю вказувала на напівконсервативність процесу реплікації, при якому два батьківських важких ланцюги розходяться і служать матрицями для утворення комплементарних ланцюгів.

### **Денатурація і ренатурація ДНК**

У фізіологічних умовах два ланцюги ДНК майже ніколи самовільно не розходяться. Але в процесі інкубації ДНК при температурі близькій до  $100^{\circ}C$  або при високих значеннях рН ( $pH < 3$  або  $pH > 10$ ) подвійна спіраль швидко розпадається (денатурує) на окремі ланцюги. Спочатку денатурацію вважали незворотнім процесом, але у 1960 році Джіліус Мармур та Пол Доті з Гарварда показали, що існує явище ренатурації – відтворення подвійних спіралей, якщо дві послідовності ДНК суворо комплементарні. Ренатурація може відбуватися між ДНК і РНК з комплементарними послідовностями. Саме так Хол і Спігелман у 1961 році довели, що ДНК при синтезі білку функціонує як матриця, на якій синтезуються ланцюги РНК.

### **Стабільність пар основ**

GC пари більш стабільні ніж AT пари. В результаті цього подвійні спіралі, що мають переважно GC пари більш стабільні, тобто денатурують при більш високих температурах ніж спіралі з перевагою AT пар. Більше того: відношення AT/GC у ДНК можна визначити, вимірявши температуру, при якій дволанцюгова ДНК наполовину денатурована.

## **Паліндроми і утворення внутрішньоланцюгових водневих зв'язків**

Пари основ можуть формуватися не тільки між основами протилежних ланцюгів, але і в межах одного ланцюга, який випадково чи не випадково містить близько розташовані повторювальні послідовності взаємопротилежної направленості (паліндроми), що створює можливість утворення шпильок з петлями. Таким чином короточасна денатурація паліндромних ділянок ДНК приводить до утворення метастабільних хрестоподібних петель, що здатні взаємодіяти зі специфічними ДНК-зв'язаними білками.

### **Метилування основ ДНК**

У ДНК живих організмів значна частина залишків цитозину модифікована: ці залишки містять метильну групу, приєднану до 5-го атому вуглецю піримідинового кільця, утворюючи 5-метилцитозин. Причому ця метилова група не шкодить утворенню водневих зв'язків між комплементарними ланцюгами. Зв'язки метилцитозину з гуаніном і цитозину з гуаніном ідентичні. У еукаріот метильовані залишки цитозину завжди у ланцюгу сусідні з гуаніном:  $[5' \text{C}(\text{CH}_3)\text{G}-3']$ . ДНК, що має багато послідовностей  $[5' \text{-CG}-3']$  значно більш метильована ніж ДНК, що не має таких послідовностей. У вищих рослин метильовано біля 20 % цитозину. Виявилось, що метилування ДНК відіграє дуже важливу біологічну роль у регуляції активності генів. Крім того, у бактерій система метилування дозволяє розпізнавати свою ДНК і ДНК бактеріофагів і вирізати її з геному.

### **Плазмід**

**Плазмід** – маленькі додаткові кільцеві хромосоми бактерій і дріжджів, що складаються всього з кількох тисяч пар основ, мініатюрні голі кільцеві ДНК, що здатні автономно реплікуватися, свого роду мініхромосоми бактерій. У бактерій плазмід функціонують у цитоплазмі, у дріжджів – у нуклеоплазмі. Величина плазмід як правило біля 1 %

бактеріальної хромосоми, але є дуже дрібні плазміді, величина яких становить всього 0,05 – 0,1 % бактеріальної хромосоми.

Розрізняють такі типи плазмід:

**Нетрансмісібельні плазміді** – плазміді, що не здатні включатися у бактеріальну хромосому.

**Епісоми** - плазміді, що здатні включатися у бактеріальну хромосому.

**Плазміді під сильним контролем** бактеріальної хромосоми – існують у вигляді 1 або 2 копій у цитоплазмі.

**Плазміді під слабким контролем** бактеріальної хромосоми – існують у вигляді сотень (більше 200) копій у цитоплазмі.

Крім того розрізняють плазміді:

**F-фактори** – статеві фактори бактерій

**R-фактори** – фактори стійкості до антибіотиків

**C-фактори** – коліциногени.

R-фактори (від англ. Resistance – стійкість) – доволі крупні плазміді, несуть гени стійкості до антибіотиків. Крім того, ці плазміді часто мають гени, що викликають здатність бактерій створювати кон'югаційний місток навіть з бактеріями іншого виду. Наприклад, бактерія кишківникового тифу може стати стійкою до дії антибіотиків внаслідок проникнення у неї генів з *E. coli*. R-фактори можуть втрачатися бактерією і не відновлюватись при цьому, зокрема під дією акридинів, які перешкоджають реплікації плазмід.

Коліциногени – дрібні плазміді, передаються при поділі клітини нащадкам, можуть утворювати кон'югаційний місток і передаватися іншим бактеріям, деякі можуть вбудовуватися у хромосому бактерій. Коліциногени містять гени, що продукують особливі речовини – коліцини – речовини, що здатні навіть у дуже низьких концентраціях вбивати бактерій того ж виду, але які не мають відповідного коліциногену. Коліциногенів відомо декілька. Носії коліциногену імунні до відповідного коліцину, що дає їм відповідну перевагу в порівнянні з бактеріями, незахищеними таким чином. У клітині може бути більше 20 різних коліциногенів одночасно. Коліцин виробляється

бактерією-носієм не завжди, а тільки у випадку певної індукції, під час якої активуються гени коліциногена. Індукція часто самовільна, іноді можна викликати індукцію штучно, наприклад опромінюючи ультрафіолетом чи діючи алкілюючими сполуками. При індукції коліцин вбиває не тільки чужі для популяції бактерії, але і саму бактерію-носія, що приноситься в жертву для блага всієї колонії. Іноді коліциногени взаємодіють з F-факторами, і бактерія втрачає можливість утворювати кон'югаційні містки. Крім бактерій, плазмиди описані у синьо-зелених водоростей і дріжджів. Є підстави вважати, що плазмиди зустрічаються і у еукаріот. Також носіями цитоплазматичної спадковості можуть бути фаги і профаги.

Плазмиди здатні суперспіралізуватися. Суперспіралізацію плазмід здійснює фермент гіраза в присутності АТФ, релаксацію плазмід здійснює фермент топоізомераза.

### **Спіралізація ДНК**

Більшість ДНК являє собою правозакручені спіралі (A і B-форми), але існують і лівозакручені спіралі ДНК (Z-форма). Переважає в ДНК B-форма. Цікаво, що метилювання цитозину стабілізує лівозакручені форми ДНК.

## **МЕТОДИ СТВОРЕННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ МОЛЕКУЛ ДНК**

На початку 70-тих років ХХ століття багато біологів вважали, що з відкриттям репресорів і оперона закінчується певна епоха в біології, і в молекулярній біології немає майбутнього. Багато молекулярних генетиків переключилися на інші області досліджень, дехто просто спився, дехто зайнявся нейробіологією, що зрештою майже те саме, що спитися. Ніхто навіть не підозрював, які відкриття і перспективи виникнуть незабаром.

Для подальшого дослідження ДНК в першу чергу необхідно було розробити **методи секвінування нуклеїнових кислот** – розшифрування послідовності нуклеотидів. Вперше

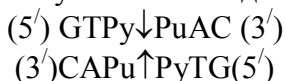
послідовність нуклеотидів була визначена не для ДНК, а для тРНК, які мають довжини всього 75-80 нуклеотидів. Вперше було встановлено послідовність аланінової тРНК дріжджів. Це здійснив Роберт Холлі. Для цього довелось знайти ферменти, які розщеплюють тРНК на все більш і більш короткі дискретні фрагменти. Цей метод отримав назву “метод ступінчатої деградації”. Цей метод вдосконалювався і у 1975 році Уолтер Фірс з Генту розшифрував цим методом повну нуклеотидну послідовність РНК-хромосоми бактеріофага MS2 (РНК-вірус). Було виявлено 3 гени, сигнали термінації і трансляції. Виявилось, що ці три гени розділені всього кількома нуклеотидами, але на кінці РНК-хромосоми виявились довгі нетранслюючі ділянки. (129 нуклеотидів на 5'-кінці і 174 нуклеотиди на 3'-кінці). Методи секвінування ДНК були ще тоді невідомі. Відомі на той час ДНК-ази, руйнуючи ДНК, давали дуже гетерогенний матеріал коротких фрагментів; встановити, в якому вони порядку в нативній ДНК, було неможливо. Всі відомі на той час ДНК-ази були неспецифічні.

### **Специфічні нуклеази**

Перша специфічна нуклеаза, яка була відкрита – РНК-азаТ1, що вносила розрив тільки біля гуаніну. Вважалося, що високоспецифічні нуклеази ніколи не будуть одержані. Єдиним оптимістичним фактом було те, що у 1953 році виявили, що ДНК певного штаму *E. coli*, введена у клітини іншого штаму, як правило, не проявляє генетичної активності і швидко руйнується – розщеплюється на дрібні фрагменти. Лише дуже рідко чужорідна ДНК в *E. coli* не фрагментувалася, бо з ДНК відбувалася якась модифікація і ця ДНК реплікувалася у новому бактеріальному штамі. У 1966 році в результаті аналізу вірусної ДНК було показано, що ця ДНК (що не фрагментувалася) містить метильовані основи, що відсутні у немодифікованій ДНК. Метильовані основи не включалися в ДНК в готовому вигляді, вони утворювалися в результаті ферментативного метилювання нуклеотидів у вже синтезованій ДНК.

Стюарт Лінн та Вернер Арбер з Женевського університету у 1970 році виявили у екстрактах клітин *E. coli* специфічний модифікуючий фермент, що метилує ДНК і рестриктазу (рестрикуючу нуклеазу), яка розщеплює неметильовану ДНК.

В наступні роки було виявлено ще кілька інших рестриктаз і метилаз в інших штаммах *E. coli*. Прийшли до висновку, що існують багато сайт-специфічних нуклеаз. Але ці перші рестриктази не виправдали сподівань вчених: ці рестриктази хоч і розпізнавали неметильовані ділянки ДНК, але розрізали ДНК у випадкових точках. Але дуже скоро були виявлені рестриктази, які розщеплювали специфічні послідовності ДНК. Перша така рестриктаза була відкрита Гамільтоном Смітом (університет ім. Джона Гопкінса). Гамільтон Сміт випадково виявив, що бактерія *Haemophilus influenzae* швидко розщеплює ДНК чужорідних фагів. Потім цю нуклеазну активність він знайшов у безклітинному субстраті і було показано, що ця активність обумовлена дією істинного ферменту рестрикції, що руйнує ДНК *E. coli*, але не діє на ДНК *Haemophilus influenzae*, з якого цей фермент і виділили. Цю рестриктазу назвали Hind II. Було показано, що Hind II зв'язується з послідовностями:



Після цього рестриктази, що розщеплюють специфічні послідовності були виділені з більш ніж 300 штамів бактерій, було ідентифіковано більше 200 сайтів рестрикції. Одні рестриктази впізнають специфічні групи з чотирьох нуклеотидів (тетрануклеотидні рестриктази), інші – з шести нуклеотидів (гексануклеотидні рестриктази). Тетрануклеотидні рестриктази вносять у ДНК набагато більше розривів ніж гексануклеотидні. Гексануклеотидний сайт може бути взагалі відсутній у вірусній ДНК. Так у фага T7 (40 kb) відсутній сайт рестрикції GAATTC, який впізнає рестриктаза EcoRI.

Наведу приклади деяких найбільш популярних рестриктаз:



Мікроорганізм, з якого добули рестриктазу	Назва рестриктази	Сайт рестрикції
<i>Bacillus amyloliquefacies</i> H	BamH I	G↓GATCC CCTAG↑G
<i>Brevibacterium albidum</i>	Bal I	TGG↓CCA ACC↑GGT
<i>Escherichia coli</i>	EcoR I	G↓AATTC CTTAA↑G
<i>Haemophilus aegyptus</i>	Hae II	PuGCGC↓Py Py↑CGCGPu
<i>Haemophilus aegyptus</i>	Hae III	GG↓CC CC↑GG
<i>Haemophilus haemoliticus</i>	Hha I	GCG↓C C↑GCG
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	Hind III	A↓AGCTT TTCGA↑A
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa I	GTT↓AAC CAA↑TTG
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa II	C↓CGG GGC↑C
<i>Povidencia stuartii</i> 164	Pst I	CTGCA↓G G↑ACGTC
<i>Streptomyces albus</i> G	Sal I	G↓TCGAC CAGCT↑G
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Xor II	CGATC↓G G↑CTAGC

По розташуванню сайтів рестрикції в геномі були визначені рестрикційні карти. Ці рестрикційні карти виявились високоспецифічними. Різні фрагменти, що утворюються при розщепленні специфічної вірусної ДНК якоюсь рестриктазою, легко розділити за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Швидкість міграції фрагментів ДНК залежить від їх довжини:

короткі фрагменти мігрують швидше, ніж довгі. При високій концентрації агарози великі фрагменти можуть взагалі не заходити в гель. При міграції в таких гелях фрагменти ДНК не деградують – їх можна елюїрувати з гелю і використовувати. При забарвленні цих гелей утворюється набір смуг. Молекулярну масу кожного фрагменту ДНК можна визначити, провівши калібрування за допомогою ДНК з відомими молекулярними масами. Різні рестриктази дають різні рестрикційні карти одної і тої ж вірусної ДНК. Найбільш корисні в цьому контексті рестриктази, які впізнають невелике число фрагментів, що добре розділяються в агарозному гелі. Перша рестрикційна карта була складена у 1971 році Даніелем Натансом (фермент Hind II розщеплював вірус SV40 на 11 специфічних фрагментів). Повторення дослідів з іншими ферментами привело до створення детальних рестрикційних карт. Завдяки застосуванню рестриктаз був здійснений пошук біологічно активних ділянок ДНК: було показано, що реплікація SV40 завжди починається в одному і тому ж специфічному Hind II-фрагменті і поширюється в обох напрямках. Пізніше було точно картовано місце ініціації транскрипції з використанням крім рестриктаз радіаційної мітки.

### **Методи секвінування ДНК**

Ще у 60-тих роках ХХ століття Фред Сенгер припинив роботи по секвінуванню білків і зайнявся розробкою методів секвінування довгих ділянок нуклеїнових кислот. У 1975 році він запропонував так званий “плюс-мінус-метод”, що бів оснований на елонгації ланцюгів ДНК ДНК-полімеразою. Метод дозволяв секвінувати ділянки ДНК довжиною 100-500 нуклеотидів. В той же час (у 1977 році) Алан Максам і Уолтер Гілберт з Гарварду розробили метод секвінування ДНК, оснований на хімічній деградації нуклеотидів. Пізніше ці методи були вдосконалені.

#### **Секвінування ДНК по Максому-Гілберту.**

Фрагмент ДНК, що отриманий у великій кількості методом клонування у *E. coli*, мітять радіоактивною міткою P<sup>32</sup> з

5'-кінця. Мічену ДНК розділяють на 4 порції. ДНК переводять у одноланцюгову форму. Кожну порцію обробляють реагентом, що руйнує певну основу ДНК – аденін, або тимін, або гуанін, або цитозин. Ланцюг ДНК руйнується у певних точках. Умови реакції підбирають так, щоб встигали зруйнуватися в кожній точці тільки деякі з ланцюгів. Реакцію зупиняють, здійснюють електрофорез у поліакріламідному гелі. Фрагменти, що мають радіоактивну мітку, виявляються за допомогою рентгенівської плівки. По довжині виявлених фрагментів здійснюють аналіз і визначають послідовність нуклеотидів.

### **Секвінування ДНК по Сенгеру.**

Фрагмент ДНК, що отриманий у великій кількості методом клонування у *E. coli*, мітять радіоактивною міткою  $P^{32}$  з 5'-кінця. Мічену ДНК розділяють на 4 порції. ДНК переводять у одноланцюгову форму. Попередньо синтезують 2'-3'-дидезоксинуклеотиди для кожної з чотирьох основ ДНК. ДНК-полімераза може включати ці молекули в ДНК (бо вони мають нормальну 5'-трифосфатну групу, але включившись в ДНК ddNTP не можуть утворити фосфодієфірний зв'язок з наступним dNTP. Тому ріст ДНК у цій точці зупиняється. В якості затравки використовують коротку комплементарну по кінцю ділянку ДНК. Додають суміш цих нормальних і аномальних нуклеотидів, ДНК-полімеразу до кожної із чотиньох порцій ДНК, причому у кожен порцію додають тільки один вид аномальних нуклеотидів. Утворюється набір мічених молекул, довжини яких рівні відстані від залишків даного нуклеотиду до кінця ланцюга ДНК. Здійснюють електрофорез у поліакріламідному гелі. Фрагменти, що мають радіоактивну мітку, виявляються за допомогою рентгенівської плівки. По довжині виявлених фрагментів здійснюють аналіз і визначають послідовність нуклеотидів.

### **Хімічний синтез олігонуклеотидів**

Одразу за розробкою швидких методів секвінування ДНК з'явилися прості і швидкі методи порівняно довгих олігонуклеотидних послідовностей. На сьогоднішній день за три

дні можна синтезувати олігонуклеотид довжиною 20 нуклеотидів. Методи синтезу основані на специфічному захисті (тобто модифікації, що запобігає вступу у хімічну реакцію) 5' або 3' кінця моно- або олігонуклеотиду. Для цього до 5' або 3'-гідроксиду приєднується об'ємну блокуючу групу. Використовуючи різні блокуючі групи, деякі з них можна видалити обробкою кислотою, інші – лугом. 5'-блокуючий мононуклеотид може вступати в реакцію конденсації з 3'-блокованим мононуклеотидом, в результаті чого утворюється динуклеотид, блокований по обидвох кінцях. Потім або 5' або 3'-блокуюча група видаляється (кислотою або лугом) і динуклеотид реагує з відповідним чином деблокованим моно- або динуклеотидом. Цей цикл, що включає конденсацію, видалення тої чи іншої блокуючої групи і подальшу конденсацію, можна повторити багато разів, поки не отримуємо олігонуклеотид потрібної довжини. Потім вдалось розробити модифікацію методу, в якому перший нуклеотид конденсують з твердим носієм і додають слідувачі нуклеотиди по одному, промиваючи носій після кожного кроку. Ця процедура була автоматизована. Блокуючі групи у цьому методі являють собою залишки великих органічних молекул, що перешкоджають утворенню фосфодієфірного зв'язку.

### **Липкі і тупі кінці ДНК, що утворилися внаслідок рестрикції**

Hind II розщеплює ДНК в середині сайту рестрикції і утворює фрагменти з так званими “тупими” кінцями, в яких два ланцюги ДНК повністю спарені і не злипаються. EcoR I вносить розриви, що розташовані так, що на кінцях кожного фрагменту лишаються короткі одноланцюгові “хвости” з чотирьох нуклеотидів. Подібні розриви вносять багато інших рестриктаз, утворюючи специфічні одноланцюгові ділянки. Ці комплементарні ділянки мають тенденцію до асоціації за рахунок спарювання основ, тому їх назвали комплементарними або липкими кінцями. Розрізані молекули ДНК (наприклад, вірусу SV40) часто знову замикаються в кільце за рахунок спарювання основ.

Спарювання липких кінців відбувається тільки між комплементарними послідовностями, тому липкі ААТТ-кінці (EcoR I) не будуть спарюватись з АGСТ-кінцями (Hind III). Але якщо рестриктаза одна – кінці різних ДНК пожуть злипатися, а потім цю сполуку можна “зшити” за допомогою ДНК-лігази. Такі досліди вперше виконали у 1972 році в Станфорді Дженет Мерц і Рон Девіс.

### **Приєднання липких кінців до тупих кінців ДНК**

Використання фермента кінцевої трансферази з тимусу теляти, що приєднує нуклеотиди до 3'-кінців ланцюгів ДНК, є універсальним методом перетворення фрагментів ДНК з тупими кінцями у фрагменти з липкими кінцями. Так, наприклад, якщо до обох 3'-кінців дволанцюгового фрагмента приєднати poly(dA), а до 3'-кінців іншого фрагмента poly(dT), то при змішуванні цих двох фрагментів між комплементарними одноланцюговими кінцями буде відбуватися спарювання. Потім до цієї суміші можна додати відповідні ферменти для заповнення всіх, що є одноланцюгових пробілів і скористуватися ДНК-лігазою для ковалентного з'єднання двох фрагментів. Ці процедури розробили у 1972 році у Станфорді Пітер Лоббан, Дейл Кайзер, Девід Джексон, Пол Бегр. Недолік цього методу – наявність у новоутвореній рекомбінантній ДНК ділянок типу poly(A), що може заважати функціонуванню клонованих генів.

### **Використання маленьких плазмід для клонування чужорідних генів**

Перший метод створення рекомбінантних плазмід базувався на випадковому вбудовуванні EcoR I-фрагментів молекули ДНК в кільцеву плазмиду ДНК, розщеплену теж EcoR I. Це здійснили Герберт Бойер і Стенлі Коен з Каліфорнійського університету у 1973 році. Була використана плазмідка рSC101, що містить один сайт рестрикції EcoR I. Змішували з фрагментами рестрикованої EcoR I іншої плазмиди. В результаті отримали плазмиди, кожна з яких мала як мінімум один

фрагмент чужорідної ДНК. Таким чином, отримали химерні плазміди, кожна з яких мала дві точки початку реплікації. Стало зрозуміло, що можна клонувати в плазмідах будь-яку чужорідну ДНК. Бактеріальна хромосома *E. coli* має 500 сайтів рестрикції *EcoR* I. Шляхом випадкового вбудування *EcoR* I-фрагментів у рSC101 можна клонувати всі гени *E. coli* у вигляді фрагментів, які потім виділити і використовувати для досліджень. Тоді з'явилась можливість клонування і вивчення різних генів людини, включно з онкогенами. Роберт Поллак запланував клонувати гени вірусу SV40 в *E. coli*. І тоді здійнялась паніка. Науковці і широкі кола громадськості були стривожені, чи не призведуть подібні дослідження до непередбачуваних наслідків. На дослідження в галузі молекулярної генетики і біотехнології з використанням рекомбінантних ДНК було накладено мораторій.

## **Лекція XVII. КЛОНУВАННЯ ГЕНІВ**

### **Отримання безпечних штамів бактерій і безпечних плазмідних векторів**

Після Асиломарської конференції почались роботи по розробці безпечних штамів бактерій для роботи з рекомбінантними ДНК. Перші штами, що відповідали правилам Асиломарської конференції (категорія ЕК2) з'явилися у 1976 році. Через рік, у 1977 році були створені перші безпечні вектори рMB9 і рBR322. Перший безпечний штам *E. coli* K12 отримав Рой Кертіс Третій (університет штату Алабама). Він його назвав  $\chi$ 1776 (з патріотичних міркувань). Цей штам має ряд особливостей, що виключає його "втечу" з лабораторії: потреба діамінопімелінової кислоти, що відсутня у кишківнику людини; руйнування клітинної стінки при низькій концентрації солей або наявності слідів детергенту. Але працювати з таким штамом було важко. Потрібні були нові безпечні штами, які були скоро отримані. В якості векторів вимагалось використовувати тільки такі плазміди, які в результаті мутацій втратили здатність передаватись при кон'югації і не могли в кишківнику людини

перейти від “безпечних” господарів до “небезпечних”. Такі плазміди виявилось отримати досить просто.

### **Зонди для виявлення клонованих генів**

Були розроблені методи клонування чужорідних генів у *E. coli*. Були створені перші бібліотеки генів. Але це були бібліотеки без каталога. В кожній бібліотеці містилось мільйони різних клонів бактерій, що були носіями різних чужорідних генів. Постало питання – як у цій бібліотеці знайти потрібний нам ген ? Для цього створюють зонди – радіоактивно мічені послідовності нуклеїнових кислот, що комплементарно гібридизуються з конкретним геном. Першими зондами були мРНК специфічні для конкретного гена. Але виділити чисту мРНК дуже важко. Вихід був знайдений у використанні кДНК.

### **Синтез і клонування кДНК**

кДНК (сDNA) – це ДНК, що синтезована на основі мРНК. Всі мРНК еукаріот мають на 3'-кінці polyA-хвіст (тейлор). І це дуже зручно. Якщо змішати з мРНК oligo (dT) – вони будуть затравкою для фермента зворотня транскриптаза (ревертаза), що синтезує ДНК на основі РНК. Ревертазу виділяють з деяких РНК-містких онкогенних вірусів (ретровірусів), наприклад, з вірусів ретинобластоми курей. Під час синтезу ДНК на основі РНК утворюється “шпилька” – артефакт реакції *in vitro*, але вона служить затравкою для синтезу другого ланцюга ДНК.

Після синтезу кДНК вбудовують у плазмиду, наприклад, у pBR322 або за допомогою “хвостів”, побудованих кінцевою трансферазою або шляхом пришивання до кінців кДНК штучних сайтів рестрикції – **лінкерів** – хімічно синтезованих нуклеотидів. Лінкери пришивають до дволанцюгової кДНК за допомогою ДНК-лігази, а потім розщеплюють їх рестриктазами. кДНК, що містить такі липкі кінці вбудовують у плазмиду, гідролізовану тим же ферментом рестрикції. Отриману рекомбінантну плазмиду, що містить кДНК, вводять у клітини *E. coli* відповідного штаму, де вона і розмножується.

## Ідентифікація специфічних клонів кДНК

Гомогенну мРНК отримати дуже важко. Завжди працюють зі змішаною популяцією мРНК. В результаті утворюється суміш різних кДНК. Але дослід можна зробити так, щоб кожна бактеріальна клітина отримала тільки одну рекомбінантну плазмиду, що містить кДНК. В результаті клітина і всі її нащадки будуть містити тільки один вид кДНК. Проблема полягає в тому, щоб довідатись, яку саме кДНК містить кожна клітина. Для цього відбирають одиничні колонії бактерій і вирощують з них великі гомогенні культури. Потім з цих генетично однорідних клональних популяцій клітин виділяють кДНК-плазмиди і денатурують їх. Денатуровану кДНК можна іммобілізувати на нітроцелюлозних фільтрах. Коли через ці фільтри пропускають суміш мРНК, на фільтрах затримуються тільки ті молекули, які комплементарні даній гомогенній кДНК. Потім зв'язану мРНК можна елюїрувати з фільтру і додати до безклітинної системи трансляції. Синтезований при цьому білок, специфічний для даної кДНК, можна ідентифікувати хроматографічним аналізом. Коли це можливо зробити – в розпорядженні дослідників опиняється чиста кДНК, що служить зондом для пошуку індивідуального гена і відповідної мРНК. Чим більшу частку у препараті складає дана мРНК, тим легше отримати такий кДНК-зонд. Тому, природньо, технологія рекомбінантної ДНК була в першу чергу застосована для отримання зондів на гени білків, що синтезуються у великих кількостях (гемоглобін, антитіла мієлом). Потім була одержана кДНК для овальбуміну.

Коли кДНК-зонд для даного білка (і гена) отриманий, його можна застосувати з використанням методу гібридизації на нітроцелюлозних фільтрах для швидкого скринінгу великого числа бактеріальних колоній для визначення вмісту інших рекомбінантних (хімерних) плазмід, що несуть той самий або споріднений ген. За допомогою цих методів було отримано багато кДНК-зондів для різних білків, наприклад, для гемоглобіну, і у кожному випадку було встановлено чи є даний зонд повною чи частковою копією гену, який шукають. Один із



підходів для в'яснення цього питання полягав у вимірюванні розмірів гетеродуплексів РНК-ДНК, що утворювались при змішуванні даної мРНК з денатурованими кДНК-зондами. Ті клони кДНК, які утворюють гетеродуплекси зі всією мРНК потім аналізували з метою визначити чи відповідає їх нуклеотидна послідовність амінокислотній послідовності даного білка. Як і очікувалось, така відповідність виявилась точною, крім того було виявлено, що багато мРНК мають на 5'-кінці додаткові нуклеотидні послідовності. Вони кодують лідерні сегменти білків, які відщеплюються після завершення синтезу і тому часто не виявляються.

### **Клонування фрагментів геному у бактеріофазі $\lambda$**

Клонування кДНК у плазмідах дозволяє досліджувати безпосередньо структуру генів, а не РНК, що з них транскрибуються. Але для вивчення регуляторних послідовностей, що знаходяться за межами кодуєчої частини гена, може виникнути необхідність у маніпуляції значно більшими фрагментами хромосомної ДНК.

Виявилось, що плазміди, які мають великі вставки чужорідної ДНК, нестабільні і при реплікації поступово зменшуються в розмірі в результаті делецій чужорідної ДНК. Чим менший розмір плазміди, тим швидше вона реплікується. Тому генетичний матеріал, що не потрібний плазміді, поступово втрачається.

Великі фрагменти хромосомної ДНК (розміром біля 15 kb) нестабільні у складі плазмід, але стають стабільні при вбудуванні їх у ДНК спеціально сконструйованих штамів фага  $\lambda$ .

Можна отримати мутанти фага  $\lambda$ , що не здатні вбудовувати свою ДНК у хромосому *E. coli* і тому безпечні. Для отримання таких безпечних  $\lambda$ -векторів використовується та обставина, що вся центральна частина ДНК фага  $\lambda$  не потрібна для реплікації у *E. coli*, а функціонує тільки при інтеграції фагової ДНК у бактеріальну хромосому у лізогенній фазі

життєвого циклу фага. Були сконструйовані спеціальні штами фага  $\lambda$ , в ДНК яких сайти EcoRI розташовані так, що кінцеві фрагменти фагової ДНК, необхідні для реплікації, лишаються інтактними. Після розщеплення EcoRI ці кінцеві фрагменти завдяки їх відносно великих розмірів легко відділити від інших EcoRI-фрагментів і використати потім для отримання нових  $\lambda$ -подібних фагів, що містять крім кінцевих фрагментів вставку чужорідної ДНК розміром біля 15 kb. Зручним виявилось те, що для дозрівання фага  $\lambda$  його хромосома повинна мати розміри 45 kb. Завдяки цьому при конструюванні химерних ДНК *in vitro* для наступного розмноження автоматично відбираються тільки ті з них, які мають обидва кінці фагової хромосоми і вставку чужорідної ДНК певної довжини.

Коли отримана бібліотека фагів, що містить специфічні гени еукаріот, легко провести її скрінінг за допомогою клонованої у плазміді кДНК, користуючись радіоактивним зондом для ідентифікації фагових колоній (бляшок), що містять послідовності, які комплементарні даній кДНК. Гаплоїдний набір клітини ссавця біля 3 000 kb. Кожен фаг містить 15 kb чужорідної ДНК. Отже скрінінг лише мільона фагових бляшок дозволяє перевірити весь геном ссавця на наявність даного гена. Тому, якщо є специфічна кДНК, пошук потрібного гена в бібліотеці фагів  $\lambda$  займає кілька тижнів.

### **Косміди**

При клонуванні у фактеріофазі розміри клонованого сегмента еукаріотичного генома обмежується розміром 15 kb. Часто цього достатньо для отримання цілого гена і сусідніх послідовностей. Але багато генів виявились довшими ніж 15 kb – деякі гени виявились розміром біля 40 kb. Крім того, неможливо виділити два сусідніх гени у вигляді єдиної молекули рекомбінантної ДНК. Метод клонування довгих ділянок ДНК у *E. coli* отримав назву “метод клонування в космідах”.

Космиду отримують таким чином. На обох кінцях молекули ДНК бактеріофага  $\lambda$  є комплементарні одноланцюгові

ділянки (cos-сайти). При нормальному життєвому циклі фага  $\lambda$  сотні молекул фагової ДНК утворюють довгий ланцюг – **конкатемер**, причому кожний геном фага  $\lambda$  з'єднаний зі своїм сусідом через cos-сайт. Ферменти, що каталізують упаковку фагової ДНК, впізнають у складі цього конкатемеру два cos-сайти, що знаходяться на відстані 35-45 kb один від одного, вищеплюють розташований між ними фаговий геном і упаковують його в головку фага. Cos-сайти фага  $\lambda$  були клоновані у гені Amp<sup>R</sup> плазмиди pBR322, що містила інтактний ген Tet<sup>R</sup>. Еукаріотичну ДНК частково гідролізують рестриктазою з утворенням відносно довгих фрагментів ДНК. Потім цю суміш фрагментів лігують з плазмідною, що містить cos-сайти, що гідролізована тою ж рестриктазою. При цьому повинна утворитися суміш химерних ДНК з інтактним Tet<sup>R</sup>-геном, в яких кожний фрагмент еукаріотичної ДНК фланкований cos-сайтами. При додаванні цієї суміші екстракта, що каталізує упаковку ДНК фага  $\lambda$ , відбувається впізнавання і вищеплення фланкованих cos-сайтами фрагментів еукаріотичної ДНК розміром 35-40 kb і їх упаковка в головку фага. Більш короткі фрагменти еукаріотичної ДНК, навіть якщо вони мають cos-сайти, упаковані не будуть. Фагові головки, що містять таку ДНК не можуть розмножуватись як фаги; ними заражують *E. coli* і відбирають заражені клітини по стійкості до тетрацекліну. Потрапивши в клітину *E. coli* гібридна молекула, що містить фланковану cos-сайтами еукаріотичну ДНК розмножується як плазміда. Ефективність клонування в космідах нижча, ніж при використанні фага і космідні бібліотеки, що містять цілий геном, вдається отримати тільки для організмів з відносно малим вмістом ДНК (наприклад для дрозофіли). Але можна сконструювати кілька космідних бібліотек, що містять частину генома, що досліджується і провести їх скрінінг на присутність певного гена.

### **Метод “прогулянка по хромосомі”**

Часто буває необхідно проаналізувати безперервну ділянку еукаріотичного геному розміром в кілька сотень kb. Але ні у

бактеріофазі, ні у косміді такий довгий фрагмент ДНК клонувати не можливо. В той же час можна використовувати один рекомбінантний фаг або космиду для ідентифікації іншого, що містить у вигляді вставки ділянку генома, що перекривається з першим. Цей метод назвали “прогулянка по хромосомі”. Він оснований на виділенні короткого кінцевого фрагмента вставки, що міститься в одному з рекомбінантів і використанні цього фрагменту для повторного скрінінгу фагової або космідної бібліотеки з метою виявлення рекомбінанта, що містить даний фрагмент разом з сусідньою ділянкою генома. Цей другий рекомбінант потім використовується для ідентифікації третього і т. д. Утворюється набір клонованих сегментів генома, що перериваються.

Короткий фрагмент ДНК, що використовується для скрінінгу бібліотеки, повинен бути унікальним елементом геному, якщо він являється послідовністю, що повторюється, рекомбінанти, виділені при такому багатоступінчатому скрінінгу, можуть не містити безперервної ділянки геному. Повтори дуже поширені в геномах хребетних, часто буває важко отримати фрагменти ДНК, що не містить таких послідовностей. Тому “прогулянка по хромосомі” виявилась набагато успішнішою для аналізу геномів таких організмів як дрозофіла, що містять мало повторів. Для аналізу геномів вищих еукаріот був використаний інший прийом: він оснований на тому, що багато білків цих організмів кодуються кількома генами, що зчеплені у хромосомі. Проводячи скрінінг бібліотеки фагів  $\lambda$  за допомогою кДНК можна виділити всі ці гени в різних клонах фага. Якщо гени розділені в геномі відстанями не більше 10-15 kb, то ДНК рекомбінантів фага або космиди, що містить у вигляді вставки один із цих генів, може перериватися з клоном, що містить інший ген. Якщо досліджувати достатньо велику кількість рекомбінантних клонів, можна отримати кілька груп фрагментів, що перекриваються і складають в сумі безперервну ділянку хромосоми розміром 50-100 kb. За допомогою цього методу було картовано багато генів, що кодують різні класи

імуноглобулінів. А також гени, що кодують білки головного комплексу тканинної сумісності.

### **Клонування ДНК у бактеріофазі М 13**

Бактеріофаг М 13 виявся дуже зручним вектором для клонування. Фаг М 13 містить одноланцюгову ДНК, що упакована у нитковидний білковий капсид. Коли фаг, що містить такий “+” ланцюг інфікує *E. coli*, ДНК реплікується з утворенням дволанцюгових (“+”/”-“) проміжних продуктів, “+” ланцюги яких потім знову упаковуються з утворенням багатьох дочірніх фагових частинок. Дволанцюговий проміжний продукт (реплікативну форму - РФ) можна використовувати як вектор для клонування: вона має невеликий розмір (біля 7,2 kb) і містить унікальні сайти рестрикції, за якими в неї можна легко вбудувати фрагменти ДНК. Коли у реплікативну форму ДНК М 13 вбудовується гетерологічна послідовність, у фагові частинки упаковується тільки один з ланцюгів цієї вставки. Клонуючи фрагмент у М 13 в обох орієнтаціях, можна отримати великі кількості кожного ланцюга. Безумовно, найважливіше застосування М 13 – це отримання одноланцюгових ДНК-матриць для секвінування по Сенгеру.

Місце генома М 13, в яке вбудовується ДНК, точно відоме, тому можна отримати 10-ти членний нуклеотид, комплементарний ділянці М 13, що безпосередньо розташована біля послідовності, яка клонована. Цей олігонуклеотид може служити затравкою для секвінування будь-якого фрагмента ДНК, клонованого в М 13, немає ніякої необхідності отримувати затравку для секвінування кожного індивідуального фрагмента. Цей метод дозволяє значно збільшити швидкість секвінування ДНК.

### **Блотінг по Саузерну і «Північний блотінг»**

При наявності відповідної мРНК або кДНК в якості зонда структуру індивідуальних генів еукаріот можна попередньо досліджувати без клонування в бактеріях, користуючись методом, що розробив Саузерн з Едінбургу. В рамках цього

методу – блотінга по Саузерну високомолекулярну ДНК розщеплюють однією або кількома рестриктазами і отримані фрагменти розділяють по розміру за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Потім гель кладуть на лист нітроцелюлози і пропускають через нього відповідний буферний розчин в напрямку, перпендикулярному напрямку електрофорезу. При цьому фрагмент ДНК елюїрується з гелю і зв'язується з нітроцелюлозним фільтром на якому отримується репліка геля. Потім проводять гібридизацію ДНК на цьому фільтрі з міченим зондом, що специфічний до гена, який вивчається. В якості такого зонда можна використовувати очищену мРНК, кДНК або фрагмент ДНК, клонований у E. coli. Мічений зонд гібридується зі специфічним фрагментом (або фрагментами), що містять комплементарні йому послідовності. Після радіоавтографії нітроцелюлозного фільтру виявляється чіткий відтворювальний набір смуг, що відповідає фрагменту або фрагментам ДНК, які містять досліджуваний ген.

Блотінг по Саузерну, що розроблений незалежно від технології рекомбінантної ДНК, виявився виключно корисним методом для аналізу генома еукаріот. Разом з методом клонування він дозволяє:

- 1) Встановити, чи є у даному гені сайти рестрикції тої чи іншої рестриктази і визначити їх число.
- 2) Встановити число копій даного гена в геномі.

Часто метод блотінга по саузерну використовують для попереднього аналізу гена або сімейства генів з метою вибору оптимальної стратегії клонування.

Аналогічна методика для аналізу РНК отримала назву “Північний блотінг”. Сумарну клітинну РНК або мРНК розділяють по розміру за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, як правило, в присутності сильного денатуруючого агента, такого як гідроксилметилртуть або формальдегіду, щоб усунути вплив вторинної структури РНК на їх електрофоретичну рухомість. Потім матеріал з геля переносять на оброблений спеціальним хімічним методом папір, що ковалентно зв'язує РНК або (якщо в якості денатуруючого

агента був використаний формальдегід) на нітроцелюлозний фільтр. При гібридизації з відповідним міченим зондом після радіоавтографії отримуються смуги, за якими можна зробити висновок про число і розмір РНК, що комплементарні даному зонду.

“Північний блотінг” корисний як доповнення до техніки клонування ДНК, бо він дозволяє порівнювати розміри специфічної мРНК і відповідних клонуваних кДНК і виявити таким чином, які з послідовностей є повними копіями мРНК.

### **Процедури клонування генів, що кодують мінорні білки**

**Мінорні компоненти** – це білки, що синтезуються у малих кількостях.

Найбільш прямий шлях збагачення сумарного препарату мРНК якимось мінорним компонентом – центрифугування у градієнті концентрації сахарози. При цьому вся мРНК розділяється на популяції з різним розміром молекул, які потім можна транслювати окремо в безклітинній системі, щоб визначити до якого класу відноситься мРНК, що кодує білок, який нас цікавить. Наприклад, мРНК, що кодує легкі ланцюги імуноглобулінів, седиментується при 13 S, РНК, що кодує  $\alpha$  і  $\beta$ -ланцюги глобіну, седиментують при 9 S. Для подальшого очищення препаратів мРНК, збагачених за допомогою седиментації, їх можна розділити електрофорезом у поліакріламідному гелі при денатуруючих умовах – при цьому знову відбувається розділення молекул по розміру, але набагато краще, ніж при центрифугуванні. Таким чином можна досягти чистоти мРНК 90 %.

Але для білків, що синтезуються в дуже малих кількостях, навіть після застосування описаних процедур шукома мРНК присутня в препараті в дуже невеликій кількості. Але існують інші методи, які ефективні для мінорних білків, що синтезуються у спеціалізованих клітинах. Наприклад: частка білку  $\alpha_2\text{u}$  складає менше 1% сумарного протеїну, що синтезується в печінці щурів, а у самок цей білок повністю відсутній. Синтез мРНК цього протеїну стимулюється

чоловічим статевим гормоном тестостероном і сильно подавлюється жіночими статевими гормонами естрогенами. Механізм регуляції синтезу цього білка досліджений слабо. Дослідження гену  $\alpha 2u$  стало системою для пошуку вирішення цієї наукової проблеми. Клонували ген цього мінорного компоненту наступним чином. Гетерогенну популяцію одноланцюгової кДНК, що отримана при зворотній транскрипції з фракцією мРНК з печінки самців щурів, змішали у відповідних умовах, що спряють гібридизації, з великим надлишком мРНК з печінки самок, єдиним видом кДНК, що не утворює гібридів кДНК-мРНК виявляється кДНК для протеїну  $\alpha 2u$ . Оскільки одноланцюгові нуклеїнові кислоти на відміну від дволанцюгових не зв'язуються з гідроксиапатитом, можна за допомогою однієї лише хроматографії на колонці отримати препарат, сильно збагачений одноланцюговою кДНК для протеїну  $\alpha 2u$ . В такому препараті ця ДНК може складати більше половини всієї кДНК і плазмиди, в які вона вбудовується, вже не важко ідентифікувати.

Якщо відома амінокислотна послідовність мінорного протеїну який досліджується, можна використати інший метод для вибору кДНК-зонду. Наприклад: Для  $\beta$ -субодиниці хоріонічного гонадотропіну людини (ХГЛ) амінокислотна послідовність (145 амінокислотних залишків) була однозначно встановлена, були передбачені нуклеотидні послідовності відповідних мРНК і кДНК і стало ясно, які рестриктази повинні розщеплювати цю кДНК і де саме. Потім був проведений скрінінг змішаної популяції клонуваних кДНК за допомогою рестриктаз, що підходили. Ті кДНК, що давали фрагменти очікуваного розміру, були відібрані для подальшого аналізу.

### **Скрінінг бібліотек генів за допомогою олігонуклеотидних зондів**

В якості специфічних зондів для даного гена або мРНК, що кодує білок з відомою амінокислотною послідовністю, можна використовувати правильно підібраний набір синтетичних олігонуклеотидів. Виходячи з амінокислотної послідовності



ділянки білкової молекули довжиною 5-6 амінокислотних залишків передбачають всі можливі послідовності мРНК, які можуть кодувати цю ділянку і синтезують відповідний набір комплементарних олігонуклеотидів. Ці олігонуклеотиди можна використовувати безпосередньо для скрінінгу суміші кДНК або геномної бібліотеки або як затравки для ревертази, щоб синтезувати кДНК, суттєво збагачену послідовностями, які шукають.

### **Використання векторів, що експресуються**

Специфічні еукаріотичні кДНК можна виділяти також, використовуючи їх експресію в бактеріях після клонування у відповідно сконструйованих плазмідах - векторах, що експресуються. Такі досліди часто починають з кДНК, що отримана на основі збагачених препаратів мРНК. Ці кДНК вбудовують потім у ділянки генома плазмід, які можуть ефективно експресуватися після введення в бактеріальну клітину. Для цього уекаріотичну послідовність вбудовують за сильним бактеріальним промотором. Наприклад, при включенні кДНК інсуліну в ген  $\beta$ -лактамази (ген стійкості до ампіциліну) плазміди рBR322 був отриманий химерний поліпептид -  $\beta$ -лактамаза-інсулін. Після ферментативного видалення більшої частини амінокислотної послідовності  $\beta$ -лактамази вдалось отримати біологічно активний інсулін.

Але використання нерегулярних сильних промоторів, таких як промотор гена  $\beta$ -лактамази, не завжди зручно: велика кількість чужорідного білка, що утворюється може блокувати ріст бактерій; інколи інтенсивна транскрипція плазмідного гена може заважати реплікації плазміди і плазміда втрачається бактеріальними клітинами. Тому краще використовувати регульовані сильні промотори і було сконструйовано кілька векторів, що експресуються з такими промоторами.

Дуже корисні експресуючі вектори, в яких використовується промотор рL – регулюючий промотор, відповідальний за експресію кількох генів бактеріофага  $\lambda$ . У присутності  $\lambda$ -репресора дія цього промотора блокована, але в

його відсутності він активний. Ген, що кодує репресор, можна вбудувати у сам вектор, що експресується, але він може знаходитись і в бактеріальній хромосомі. Регуляція кількості репресора, що синтезується здійснюється за допомогою термочутливого репресора, активного при 31<sup>0</sup>С, але не при 38<sup>0</sup>С. Таким чином, еукаріотичні послідовності, розташовані слід за промотором рL при 31<sup>0</sup>С не транскрибуються. Але коли бактерій інкубують при більш високій температурі, λ-репресор інактивується і спостерігається високий рівень експресії цих послідовностей. Використання векторів, що експресуються і містять цей промотор дозволяє отримати чужорідний білок в кількості, що складає 10 % сумарного протеїну, що синтезується в бактеріальній клітині.

Ефективність трансляції мРНК у бактерій суттєво залежить від наявності в ній ділянки зв'язування з рибосомою – **послідовності Шайна-Дальгарно** і відстані між цією послідовністю і ініціюючим кодоном AUG. Для ефективної експресії еукаріотичних протеїнів у випадку використання експресуючих векторів послідовність Шайна-Дальгарно включають у склад самого вектора. Досягти точної локалізації не завжди вдається, ініціюючий кодон ATG іноді включають в сам вектор, це забезпечує оптимальне взаємне розташування послідовності Шайна-Дальгарно і ініціюючого кодона. При експресії векторів такого типу утворюється гібридний протеїн, в якому кілька N-кінцевих амінокислотних залишків походять від прокаріотичного протеїну, а інші від протеїну, що кодований еукаріотичною вставкою. Ці гібридні білки часто виявляються більш стабільні у бактеріальних клітинах, ніж нативні еукаріотичні білки, інколи їх вдається так хімічно чи ферментативно обробити, щоб виділити еукаріотичну частину поліпептидного ланцюга. Частіше всього в таких векторах використовується lac-промотор з відповідною послідовністю Шайна-Дальгарно або гібридна структура, що складається з trp- (триптофанового) промотора (більш ефективного ніж lac-промотор) і послідовності Шайна-Дальгарно lac-операона з ініціюючим кодоном ATG або без нього. Для клонування

векторів, що містять гібридний промотор *lac- trp*, більше всього підходить штам бактерій, що продукує репресор Iq. Цей мутантний “суперрепресор” підтримує промотор у виключеному стані до тих пір, поки в середовище не додають індуктор (ізопропіл-β-D-тіоґалактозид – IPTG).

### **Імунологічний скрінінг продуктів векторів, що експресуються**

Специфічні еукаріотичні протеїни, що утворюються в бактеріях з використанням векторів, що експресуються, легше всього рееструвати за допомогою імунологічних тестів. Цей підхід був успішно застосований при клонуванні кДНК для β-форми тропоміозину курей, основного компоненту гладеньких м'язових волокон. На першому етапі була отримана кДНК для сумарної мРНК клітин гладеньких м'язів. Два ланцюги кДНК були з'язані шпилькою на кінці, що кодував N-кінцеві послідовності протеїнів. До 3'-кінця кДНК пришивали лінкери для Sall, шпильку гідролізували нуклеазою S1 і до 5'-кінця пришивали лінкери для EcoRI. Після розщеплення лінкерів за допомогою Sall та EcoRI отримувалась популяція молекул кДНК з відповідними липкими кінцями. Цю суміш кДНК вбудовували у вектор pUC8, що експресується, гідролізований Sall та EcoRI. В цьому векторі EcoRI-сайту на невеликій відстані передує сильний *lac*-промотор. Таким чином, всі кДНК, вбудовані в pUC8, опинилися у потрібній для експресії орієнтації. Отримані колонії бактерій, що містили клони кДНК, гідролізували парами хлороформу і колонії, що продукували тропоміозин, ідентифікували шляхом скрінінгу з міченими I<sup>125</sup> антитілами до цього протеїну. Даний метод і його модифікації (наприклад, попередній скрінінг мРНК шляхом введення їх у ооцити жаб з метою ідентифікації фракції, що кодує потрібний протеїн, повинні призводити до успішного клонування кДНК для будь-якого протеїну до якого отримані антитіла.

## **Лекція XVIII. ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ ДРІЖЖІВ**

### **Дріжжі *Saccharomyces cerevisiae* як об'єкт генної інженерії**

Пекарські дріжжі *Saccharomyces cerevisiae* виявилися дуже зручним об'єктом для сучасних біотехнологій і також для вивчення регуляції експресії генів еукаріотичних організмів завдяки малому розміру геному (тільки в 4 рази більшому ніж у *E. coli*) та короткому часу генерації (кілька годин). В той же час дріжжі – еукаріоти, їх можна використовувати для дослідження явищ, що властиві тільки еукаріотам (будову хромосоми, мітоз, мейоз, сплайсінг, процесінг і т.д.) Генетика дріжжів добре вивчена: виділено і картовано сотні мутацій, що впливають на харчові потреби виду, тип спарювання, поділ клітин, чутливість до опромінення і т.д. Крім того, ці дріжжі можна підтримувати як у гаплоїдному так і в диплоїдному стані. Комплементацию між генетичними маркерами легко досліджувати, схрещуючи пари гаплоїдних штамів, кожний з яких несе один з цих маркерів. По фенотипу отриманих диплоїдів судять про те, чи пройшла комплементация. В таких диплоїдних клітинах можна потім індукувати мейоз; в результаті мейотичного поділу з'являються чотири гаплоїдні клітини, на яких дуже легко простежити долю рецесивних маркерів. Це дуже спрощує аналіз зчеплення і рекомбінації. На дріжжах активно вивчається будова і функції центромер, теломер, тандемних повторів, рибосомної РНК, транспозонів. Наявність клонуваних генів дозволило вивчати структуру хроматину на рівні індивідуальних генів, роль білків хроматину у регуляції експресії. Можна клонувати гени у дріжжах, вносити мутації, вбудовувати ці гени у їх нормальне положення в геномі і визначати вплив мутацій на функції генів.

### **Використання сферопластів дріжжів**

Чужорідну ДНК дуже легко ввести в клітини дріжжів. Для цього необхідно:

- 1) Ферментами (целюлазами) видалити целюлозну клітинну стінку – отримати так звані сферопласти – клітини дріжжів, що позбавлені клітинної стінки.

- 2) Сферопласти інкубувати з чужорідною ДНК, хлоридом кальцію ( $\text{CaCl}_2$ ) і полімерним спиртом (поліетиленгліколем), який робить мембрану проникною (створює можливість для проникнення ДНК в клітини).
- 3) Сферопласти інкубувати в середовищі, що містить агар, де вони відновлюють свою клітинну стінку.

### **Експресія генів дріжжів у *E. coli***

Деякі гени дріжжів можуть комплементувати мутації *E. coli*. Дріжжевий ген *leu2*, що кодує один із ферментів біосинтезу лейцину ( $\beta$ -ізопропілмалатдегідрогеназу), коіплементує з мутацією *leuB* у *E. coli*. Це обумовлено не специфічним впізнаванням дріжжевого промотора РНК-полімеразою *E. coli*, а тим, що ця полімераза іноді транскрибує ділянки дріжжевої ДНК чисто випадково. Якщо один із таких транскриптів захоплює дріжжевий структурний ген, то синтезована РНК може транслюватися з утворенням функціонально активного ферменту (якщо, звичайно, даний дріжжевий ген не містить інтронів). Виявилось, що біля 30 % генів дріжжів можуть функціонувати в *E. coli*. І хоча це можна вважати артефактом клонування, цей артефакт є дуже зручним. Тотальну ДНК дріжжів можна клонувати в плазмідах клітин *E. coli*, що несуть відповідні мутації. Серед отриманих трансформантів неважко відібрати ті, які отримали плазмід з даним дріжжевим геном. Так були клоновані гени дріжжів, що кодують ферменти біосинтезу триптофану, гістидину, аргініну, урацилу (гени *trp1*, *his3*, *arg8*, *ura3*). Плазмідну ДНК можна виділити з *E. coli* і використовувати для трансформації сферопластів мутантних штамів дріжжів.

### **Човникові вектори**

Човникові вектори – це плазмідні, що містять як бактеріальні сигнальні послідовності, що запускають реплікацію ДНК в клітинах *E. coli*, так і послідовності, що необхідні для ініціації реплікації у дріжжевих клітинах.

Дріжжеву ДНК, гідролізовану відповідною рестриктазою, клонують у човниковому векторі і розмножують у *E. coli*. Суміш отриманих плазмід вводять у сферопласти дріжжів. Плазміді, комплементуючи мутацію у сферопластах-реципієнтах, можна ідентифікувати у селективних умовах, потім знову ввести у *E. coli* і розмножити у великій кількості.

### Плазміді дріжжів

Більшість штамів дріжжів містять автономно реплікуючі кільцеві ДНК – так зване 2 $\mu$  кільце. Ця дріжжева плазмідіа розміром 6,3 kb міститься у нуклеоплазміді дріжжів в кількості біля 50 копій на клітину. 2 $\mu$ -ДНК утворює нуклеосоми з нормальним набором гістонів. 2 $\mu$ -кільце має одну точку реплікації, кодує два так звані Rep-фактори, що викликають ампліфікацію плазмідіа. У нормі 2 $\mu$ -кільце реплікується з тою ж швидкістю, що і інша частина геному. Але коли число копій знижується, Rep-білки можуть порушувати спряження реплікації плазмідіа з клітинним циклом, число копій зростає до 50.

Розрізняють слідуєчі плазмідіа дріжжів:

- 1) **Інтегруєчі** – містять дріжжевий селективний маркер, але немає точки початку реплікації дріжжевої ділянки. Можуть стабільно зберігатися у дріжжевих клітинах тільки при інтеграції з дріжжевою хромосомою.
- 2) **Реплікуєчі** – більш стабільні, але число копій в клітині мале. Містять дріжжевий селективний маркер і фрагмент дріжжевого 2 $\mu$ -кільця, що має ділянку початку реплікації, а також Rep-гени, що забезпечують підтримку плазмідіа у екстрахромосомному стані у невеликому числі копій.
- 3) **Епісомні** – містять фрагмент ДНК (EAP-послідовності), що забезпечує можливість автономної реплікації у дріжжевій клітині, але механізми, що підтримують високе число копій таких екстрахромосомних плазмід при мітозі, відсутні. Ці EAP-плазмідіа стабільні.
- 4) **Центромерні** – перебувають у клітині у вигляді однієї стабільної копії, включенням SEN-послідовності досягається стабільність плазмідіа.

## **Підвищення ефективності трансформації за допомогою додаткових точок реплікації**

Трансформуюча ДНК може зберігатися у дріжжєвих клітинах або шляхом інтеграції з хромосомою або шляхом автономної реплікації у вигляді епісоми. Доля введеної в клітини ДНК визначається присутністю або відсутністю в ній елементів автономної реплікації (EAP-елементів). Високоєфективна епісомна трансформація досягається включенням в кільцеву плазмиду сегмента ДНК, що містить точку початку реплікації, що обумовлює незалежну реплікацію епісоми у дріжжєві клітини. Послідовності EAP були виділені з ендогенної дріжжєвої плазмиди (2 $\mu$  кільця) і з клонованих сегментів дріжжєвих хромосом. Вони складаються з 60 нуклеїнових пар, збагачені АТ-парами і містять канонічну послідовність AAAC(абоT)TAAA. В якості EAP у дріжжєвих плазмідах функціонують також певні клоновані сегменти ДНК кукурудзи, дрозофіли і міксоміцета *Dictyostelium*. У всіх випадках ці послідовності служать сигналами для екстрахромосомної реплікації ДНК, введеної у дріжжєві клітини, але поки що немає чітких доказів того, що вони ініціюють реплікацію хромосомної ДНК у дріжжів або у інших організмів.

## **Стабілізація дріжжєвих плазмід центромерною ДНК дріжжів**

Коли рекомбінантні бактеріальні плазмиди, наприклад, pBR322, що містять у вигляді вставки EAP і чужорідні гени, вводять у дріжжєві клітини, відбувається високоєфективна трансформація. Але при розмноженні трансформованих клітин у неселективних умовах вони втрачають плазмиди. Після 10 генерацій плазмиди зберігається лише у 5 % клітин. При клітинному поділі плазмиди не розподіляються порівну у дві дочірні клітини. Щоб подолати цю перешкоду в плазмиду можна ввести фрагменти ДНК, що містять послідовності центромер (CEN) дріжжєвих хромосом. Вони забезпечують приєднання хромосоми до ниток мітотичного веретена, що необхідно для їх точної сегрегації при поділі клітини. Таким чином, плазмиди, що

містять CEN-послідовності, підтримуються в клітинах за допомогою того ж механізму, що забезпечує рівний розподіл хромосом.

CEN-послідовності вдалось клонувати, ідентифікувати та ізолювати методом “прогулянка по хромосомі”. Для цього були вибрані два генетичних меркера, що були раніше картовані методом класичної генетики поблизу центромери по обидві сторони від неї. У бібліотеці клонованих фрагментів дріжжевої ДНК були ідентифіковані клони, що містили послідовності цих генів. Потім були відібрані ті клони, які перекриваються які перекриваються з двома першими і т. д. Відібрані клони секвіювали і визначили всю послідовність сегмента ДНК, що лежить між двома вихідними маркерами і містить центромеру. Клоновані фрагменти ДНК окремо вбудовували в човниковий вектор, розмножували у *E. coli* і вводили у сферопласти дріжжів. Плазміді, що мали один з цих фрагментів, стабільно підтримувались у дріжжевих клітинах, з чого був зроблений висновок, що саме в цьому фрагменті локалізована центромера хромосоми 3. Сегменти ДНК, що мали стабілізуючу активність були виділені також з хромосом 4 і 11 при використанні маркерів, зчеплених з центромерами цих хромосом. Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей центромерних районів хромосом 3 і 4 виявив наявність декількох коротких гомологічних ділянок, що фланкують АТ-багату область розміром 90 b.p.

Сегменти ДНК, що претендують на роль центромер, повинні забезпечувати правильний розподіл хромосом при мітозі і крім того, підпорядковуватись правилам сегрегації центромер в мейозі, що веде до утворення гамет. Плазміді, що містять догі ділянки ДНК з області центромери (біля 10 k.b.), ведуть себе в мейозі саме так як і очікувалось: кожна плазміда відходить до одного з полюсів при першому поділі мейозу, потім, при другому поділі, в кожному з дочірніх клітин потрапляє по одній копії. Більш короткі клоновані фрагменти з тої ж області здатні стабілізувати плазміді в мітозі, але не забезпечують правильної сегрегації при мейозі. Таким чином,



повноцінна центромерна область може мати більші розміри, ніж це слідує з дослідів з мітотичними клітинами.

Плазмід, що містить *CEN*-послідовності підтримуються в трансформантах в невеликій кількості копій (в середньому одна на клітину). Це ще одна перевага таких плазмід, оскільки для вивчення регуляції експресії бажано мати систему, в якій дозу гена можна контролювати.

Таким чином ефективний плазмідний вектор для трансформації дріжджів повинен містити ділянку плазмід *pBR322*, що необхідна для реплікації у *E. coli* (елемент автономної реплікації), центромеру, а також якийсь дріжджевий селективний маркер (наприклад *leu2*). Крім того, до складу вектора повинні входити унікальні сайти рестрикції для однієї або кількох рестриктаз, що дозволяють вбудовувати у вектор чужорідну ДНК.

### **Теломери на кінцях дріжджевих хромосом**

Метод трансформації дріжджів виявився корисним для вивчення теломер – структурних кінців еукаріотичних хромосом. Механізм реплікації кінців лінійної дволанцюгової ДНК є проблемою. ДНК-полімераза здатна синтезувати ДНК тільки починаючи з затравки. Тому на кінцях лінійних ДНК хромосом після реплікації могли б знахотитись отвори, що утворюються після вищеплення 5'-кінцевої РНК-затравки. Деякі віруси з лінійною ДНК, наприклад, бактеріофаг  $\lambda$ , вирішують цю проблему шляхом утворення кільцевих проміжних продуктів реплікації. Інші віруси (фаги T7 і T4) мають на кінцях своїх лінійних ДНК ідентичні послідовності, завдяки цьому проміжні продукти на ранній стадії реплікації можуть з'єднуватися між собою з утворенням довгих лінійних конкатемерів, які потім нарізаються на молекули з довжиною, характерною для фагового генома. Інший спосіб вирішення проблема реплікації кінців полягає в утворенні кінцевої ковалентної зшивки між нитками ДНК, тобто “шпильки”. Коли реплікативна вилка доходить до кінця такої структури її вершина стає центром симетрії оберненого повтору, який може утворювати

хрестоподібну структуру – структуру Холідея. Якщо у протилежні нитки такої молекули ДНК вносять розриви, то утворюються дві дочірні молекули, кожна з яких має отвір або одноланцюговий розрив.

Першими детально вивченими структурами, що містили теломери, стали ампліфіковані гени рибосомної РНК (рРНК) вільчастої інфузорії *Tetrahymena*. Виявилось, що кінці цих екстрахромосомних молекул ДНК дійсно мають структуру шпильок. Теломери цієї ДНК склалися з одиниць, що повторюються зі структурою ССССАА. Число таких С<sub>4</sub>А<sub>2</sub> одиниць варіює в різних молекулах ДНК рибосомальної РНК (умовно ці ділянки ДНК можна назвати рибосомальна ДНК – рДНК) від 20 до 70, що обумовлює гетерогенність розмірів кінцевих рестрикційних фрагментів цієї ДНК. Шпильки з ДНК *Tetrahymena* були пришиті за допомогою ДНК-лігази до кінців лінійної плазмиди, що містила дріжджевий ген *leu2* I EAP. Така плазміда при введенні у сферопласти дріжджів реплікувалася у вигляді лінійної молекули. Це означає, що теломери *Tetrahymena* функціонують у дріжджевих клітинах. Виявилось, що найважливіша структура теломери рДНК, її шпилька при цьому зберігається.

Теломери *Tetrahymena* використовували надалі для клонування дріжджевих теломер. Для цього було сконструйована лінійна плазміда, яка містила теломеру *Tetrahymena* лише на одному кінці. Інший кінець цих лінійних молекул лігували з тотальною дріжджевою ДНК, гідролізованою рестриктазою *Pvu II*. Відомо, що при розщепленні дріжджевої ДНК, 34 з них повинні містити теломери (дріжджі мають 17 хромосом). Цю ліговану ДНК потім використовували для трансформації дріжджевих клітин. Було виявлено кілька *leu+* колоній, що містили лінійні плазмиди з фрагментами дріжджевої ДНК на одному кінці. Всього в геномі дріжджів виявлялось 30-40 таких фрагментів, це відповідає гіпотезі, що були клоновані всі дріжджеві теломери. Подальші дослідження показали, що теломери різних хромосом дріжджів майже ідентичні по своїй первісній структурі на ділянці довжиною біля 4 kb починаючи з

кінця хромосоми. Далі послідовність різних хромосом відрізняється.

### **Направлене вбудовування клонованої ДНК в хромосоми дріжджів**

При трансформації сферопластів дріжджів введена ДНК може інтегруватися з хромосомами. Інтеграція майже завжди відбувається шляхом кросинговера між гомологічними послідовностями введеної ДНК і хромосоми. Якщо ДНК вводиться у дріжджеву клітину у вигляді кільцевої молекули, інтеграція відбувається дуже рідко (приблизно в одній клітині з мільона) навіть тоді, коли розміри гомологічної ділянки більші за 10 kb. Але якщо плазмиду вводять у сферопласти дріжджів у рестрикованому вигляді, то вона інтегрує з ділянкою хромосоми, гомологічному сайту розщеплення, приблизно у 100 разів частіше ніж кільцева молекула. Таким чином плазмиду можна направлено вбудовувати у певну ділянку хромосоми, вносячи рестриктазний розрив у потрібному місці.

Направлене вбудовування трансформуючої ДНК у дріжджеві хромосоми можна використати для заміни гена дикого типу мутантним геном. Цей метод, що називається “алельним заміщенням”, дозволяє досліджувати вплив специфічних внесених *in vitro* мутацій якогось гена на його експресію. Те, що мутантний ген обов’язково потрапляє у “правильне” місце дріжджевої хромосоми, дає дослідникам впевненість в тому, що будь-які спостережені зміни дійсно обумовлені внесеною мутацією, а не зміною локалізації гена в хромосомі або число його копій. Даний метод був використаний для заміни нормального алеля гена актину у дріжджів мутантним, отриманим за допомогою сайт-специфічного мутагенезу. Ця мутація виявилась рецесивною летальною, що вказує на важливу роль актину у життєвому циклі дріжджів.

## Вектори-“рятівники”

Інтеграція плазмід з хромосомами дріжджів відбувається шляхом гомологічної рекомбінації. Маючи клонований ген дикого типу ми можемо виділити природні мутантні алелі дріжджевого гена. Існує два способи вирішення цього завдання:

1) Дріжджевий ген дикого типу разом з фланкуючими послідовностями вбудовується в плазмиду між двома унікальними сайтами рестрикції. Плазміда-вектор (pBR322) містить ген стійкості до ампіциліну - Amp<sup>R</sup> і селективний дріжджевий маркер (uga3), але немає дріжджевої ділянки початку реплікації. Єдиний спосіб для даної плазмиди трансформувати дріжджеві клітини до фенотипу uga<sup>+</sup> полягає в її інтеграції з хромосомою (хоча для кільцевої плазмиди – це рідкісна подія, але в даному випадку частота події – достатня). Якщо при рекомбінації з хромосомою ДНК плазмиди вбудовується у фланкуючу послідовність даного гена, трансформована дріжджева клітина буде містити дві тандемно розташовані копії цього гена: знову інтегровану (дикий тип) і ендогенну (мутантну). Потім хромосомну ДНК з трансформованих клітин розщеплюють окремо кожною рестриктазою, сайти впізнавання яких фланкують дріжджевий ген в плазміді, що використана для трансформації. В залежності від того, з якої сторони від мутантного гена, що знаходиться в хромосомі відбулась рекомбінація, розщеплення однією з цих рестриктаз і послідуєча циркуляризація приведуть до утворення стійкої до ампіциліну плазмиди, що несе мутантний (з хромосоми трансформованої клітини) алель, в той час як при розщепленні іншою рестриктазою отримується плазміда з клонованим геном дикого типу.

2) Більш ефективний метод – метод “порятунку” мутантних алелей дріжджевих хромосом оснований на використанні плазмиди, що містить дріжджевий селективний маркер, точку початку реплікації, а також дріжджевий ген з фланкуючими послідовностями. Цей ген вирізають рестриктазами, лишаючи тільки фланкуючі послідовності. В результаті отримується плазміда з великою делецією. Коли така

плазмiда вводиться у дріжджеві клітини, вона може реплікуватися тільки після репарації з утворенням кільцевої молекули. Найпростіший шлях такої репарації полягає в рекомбінації фланкуючих ген послідовностей з гомологічними послідовностями в хромосомі. Природньо, в хромосомі ці послідовності фланкують той же, що підлягає “рятуванню” ген, тому при рекомбінації відбувається дуплікація цього гена і одна з його копій опиняється у складі плазмiди. Тепер вже кільцева плазмiда, що містить копію хромосомного алеля, реплікується у дріжджевих клітинах і може бути виділена з них.

## **Лекція XIX. ГЕННА І ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ ВИЩИХ РОСЛИН**

У 60-70 роках ХХ століття були розроблені методи вирощування повноцінних рослин з культивованих рослинних клітин. У 80-тих роках було відкрито природну здатність плазмід деяких ґрунтових бактерій, що викликають утворення корончатих галів, інтегруватися з хромосомами клітин рослин при їх зараженні цими бактеріями. В руках дослідників з’явився зовсім новий метод введення індивідуальних генів в рослини. Значення цього методу для селекції – величезне. Розробляються і інші методи введення чужорідної ДНК у геноми вищих рослин, але цей метод є найбільш розробленим.

### **Клітини рослин в культурі**

Якщо рослину пошкодити, то рана, що утворилася через деякий час вкривається м’якою “латкою” з клітин, так званим каллусом. Поступово в цих клітинах накопичуються фенольні сполуки які, твердіючи, ефективно заживляють рану. Твердий каллус у рослин – еквівалент шраму. Якщо взяти шматок молодого, ще не затвердлого каллусу і помістити його у культуральне середовище, що містить солі, цукри, вітаміни, амінокислоти і певні рослинні ростові гормони, то клітини не тверднуть, а продовжують ділитися і дають початок неупорядкованій масі слабо диференційованих клітин –

культури каллуса. Шматочки тканини, взяті з внутрішніх частин рослини або з молодих проростків, вирощених у стерильних умовах, в присутності відповідних гормонів утворюють схожі культури.

### **Регенерація цілих рослин з культивованих рослинних клітин**

При інкубації клітин деяких рослин в середовищі, що містить необхідні гормони росту, відбувається їх диференціація з утворенням проростків, коренів або цілих рослин, в залежності від концентрації і типу присутніх гормонів. Як мінімум деякі клітини тотипотентні в своєму розвитку, тобто можуть розвиватися в цілу рослину. Крім гормонального балансу на регенерацію впливає ще ряд факторів:

- 1) фактор віку культури: чим більше пасажів в середовищі проходять клітини. Тим менша їх частина зберігає тотипотентність;
- 2) фізичні фактори: вологість, температура, світло, рН та ін.

Індукувати регенерацію можливо не в усіх рослин, наприклад, у злаків, бобових, букових викликати її вдавалось лише в дуже рідкісних випадках. З іншого боку, тютюн, томати регенерують дуже легко. Диференціація культур каллуса – цінний метод селекції, бо він дозволяє швидко отримувати в стерильних умовах багато генетично однорідних рослин. Особливо це важливо для квітництва. Переважна більшість орхидних, що культивуються отримані саме таким способом.

### **Протопласти**

При обробці целюлозної клітинної стінки рослин ферментом целюлазою, що виділяється з грибів, утворюються клітини позбавлені оболонки – **протопласти**. Протопласт намагається відновити клітинну стінку, відбувається синтез її компонентів з утворенням культури каллуса. Для деяких видів, в тому числі тютюну, томатів, картоплі, петунії, дурману з індивідуальних протопластів вдається регенерувати цілі рослини. Оскільки протопласти позбавлені клітинної стінки,

можна індукувати їх злиття, додаючи у культуральне середовище поліетиленгліколь і йони кальцію. Якщо у досліді використовувались протопласти різних видів, то в результаті злиття утворюється гібридний протопласт, який теж буде намагатися відновити клітинну стінку. У деяких випадках гібридні протопласти здатні до поділу і регенерації. Крім того, протопласти можуть поглинати макромолекули, в тому числі ДНК, що в нормі не проходить через клітинну стінку.

### **Створення гібридних рослин шляхом злиття протопластів**

З гібридних соматичних клітин, що утворилися при злитті протопластів, іноді вдається ренерувати цілі рослини. Такі “вегетативні” гібриди були отримані шляхом злиття протопластів деяких видів пегунії, тютюну, моркви, дурману. При злитті протопластів кортопли і томату вдалось отримати міжродовий гібрид **помато**, який нажаль не мав комерційної цінності. Щоб відрізнити гібридні протопласти від пар протопластів одного виду, що злилися використовують слідуючий скрінінг: використовують мутантні клітини як певні маркери (наприклад здатність синтезувати хлорофіл). Якщо мутації в клітинах комплементують, колонії міжвидових гібридів отримують зелене забарвлення.

Клітини культури каллуса спочатку мають диплоїдний набір хромосом. Але фактори, що суворо підтримують диплоїдність *in vivo*, в культурі (*in vitro*) не діють, і з часом каріотип і плоїдність змінюються. Іноді це приводить до серйозних наслідків – до втрати здатності регенерувати цілу рослину. Найпростіший спосіб подолати цю проблему – використовувати свіжі культури, в яких більшість клітин диплоїдні. В деяких випадках каріологічна варіабельність може виявитись корисною, якщо з клітин з незвичайним каріотипом вдається отримати цілі рослини. Так були отримані міжвидові гібриди ячменю.

При злитті протопластів двох диплоїдних клітин утворюються тетраплоїдний гібрид. Для деяких видів вдалося у спеціальних умовах культивування індукувати розвиток

гаплоїдних рослин з пилкових зерен. При злитті таких гаплоїдних протопластів можна отримати плодовиті диплоїдні рослини.

### **Генетична інженерія вищих рослин**

**Генетична інженерія** – це методи селекції з використанням технологій злиття протопластів. Але цьому методу бракує точності переносу конкретних генів, якої можна досягти під час роботи з бактеріями. Для маніпуляції з конкретними генами вищих рослин з метою введення нових генів у вищі сорти потрібно:

- 1) Отримати певні гени у чистому вигляді у достатній кількості;
- 2) Вбудувати ці гени у хромосому рослини.

Нажаль, дуже важко ідентифікувати такі гени, які детермінують такі ознаки як урожайність, смакові якості, стійкість до хвороб – такі ознаки мають полігенну природу.

### **Корончаті гали – пухлини рослин**

У групі ґрунтових бактерій *Agrobacteria* є кілька видів. Які можуть інфікувати рослини з утворенням так званих корончатих галів – пухлин з недиференційованою тканиною, що росте у місці інфікування. Майже всі дводольні чутливі до цих бактерій, а однодольні – нечутливі. Клітини корончатих галів нагадують ракові клітини тварин: ці клітини отримують здатність до необмеженого росту. Коли клітини корончатих галів культивувати *in vitro*, вони ростуть навіть при відсутності гормонів, які необхідні при культивуванні нормальних рослинних клітин. Крім того, клітини корончатих галів, які вже отримали властивості пухлинних клітин під дією агробактерій, продовжують зберігати трансформований фенотип, навіть якщо вбити всі бактерії антибіотиками. Вивчення особливо сильного індуктора пухлин *Agrobacterium tumefaciens* показало, що пухлинним агентом у цієї бактерії є плазміда, що діє шляхом інтеграції з хромосомами клітини вищих рослин.



## **Плазміди, що індукують пухлини (Ті-плазміди)**

Клітини галових пухлин, що індуковані *Agrobacterium tumefaciens*, починають синтезувати незвичайні амінокислоти, так звані **опіни**, що є похідними аргініну. Опіни ніколи не виявляються у здорових рослинах. Штами *Agrobacterium tumefaciens*, що індукують синтез опінів, можуть використовувати їх в якості джерела вуглецю і азоту. Здатність індукувати синтез опінів і використання цих сполук детермінується плазмідами. Клітини рослин не здатні утилізувати ці незвичайні амінокислоти; бактеріальна інфекція не тільки викликає пухлинну трансформацію клітин рослини, але і модифікує метаболізм – починається синтез амінокислот, що необхідні тільки для бактерій. Найпоширеніші опіни – це октопін і нопалін.

Здатність індукувати пухлини рослин, викликати синтез опінів і їх використання залежить від присутності в бактеріальних клітинах особливих плазмід – Ті-плазмід (від англ. Tumor inducing – індукування пухлин). Ті-плазміди являють собою кільцеві ДНК, що складають приблизно 5 % розміру хромосоми *Agrobacterium tumefaciens*, мають незалежну реплікацію. Ті-плазміди класифікують по типу індукованого опіну. Більшість Ті-плазмід – октапінові або нопалінові плазміди.

Кожна клітина *Agrobacterium tumefaciens* має тільки один тип Ті-плазміди. Аналіз нуклеотидних послідовностей ДНК нопалінових і октапінових плазмід показав наявність всього чотирьох ділянок з вираженою гомологією, одна з цих ділянок має гени, відповідальні за галову трансформацію клітин рослини. Октапінові і нопалінові плазміди, хоча і схожі між собою, але мають різну еволюційну історію.

## **Мутанти Ті-плазмід**

Докази того, що саме Ті-плазміди, а не хромосомні гени бактерій відповідають за підтримку трансформованого клітин корончатих галів були ортимані:

- 1) шляхом гібридизаційного аналізу ДНК;

- 2) при вивченні безплазмідних штамів *Agrobacterium*;
- 3) при вивченні мутантних Tі-плазмід.

*Agrobacterium*, позбавлені Tі-плазмід, не індукують у зараженій рослині ні утворення корончатих галів, ні синтезу опінів. Транспозон-індуковані мутації Tі-плазмід діляться на три основні класи:

- 1) мутанти, що не індукують синтез опінів, але викликають утворення корончатих галів;
- 2) мутанти, що втрачають здатність індукувати пухлини;
- 3) мутанти, що стимулюють аномальне диференціювання нормальних клітин, що розташовані поруч з пухлиною (надлишковий ріст коренів і пагонів)

Дуже рідко виявляються пухлинні клітини, які самі можуть розвиватися у цілу рослину. Дослідження Tі-плазмід показали, що ДНК Tі-плазмід відповідальна за індукцію пухлин, синтез опінів подавлення диференціації. Гени, що кодуєть ці три функції, картується дуже близько один від одного в одному з локусів ДНК плазмиди, що названа трансформуючою ДНК – тДНК. Саме ця частина плазмиди вбудовується в хромосому клітини при інфекції.

### **Інтеграція тДНК з хромосоною рослини**

Коли онкогенний вірус тварин (наприклад, SV40 або аденовірус) трансформує клітину, вся вірусна ДНК інтегрує з клітинною хромосоною. Коли дослідили ДНК Tі-плазмід і геноми трансформованих рослинних клітин, то виявили, множинні копії T-сегменту плазмідної ДНК (розміром біля 20 kb) ковалентно зв'язані з ДНК пухлинних клітин. T-сегменти ДНК октопінових і нопалінових плазмід вбудовуються в різні, випадкові точки хромосом господаря (при цьому не інтегруються з ДНК мітохондрій і хлоропластів). Інтегрована т-ДНК обумовлює трансформований фенотип галових клітин і синтез опінів. Кілька ліній пухлинних рослинних клітин підтримувались у середовищі, що не містило гормонів більше 20 років, при цьому постійно спостерігалось утворення опінів.

У клітинах октопінових пухлин т-ДНК складається з 7 генів, з кожного з яких транскрибується унікальна РНК. Кожен з цих генів регулюється окремими промоторами. 5 генів подавляють диференціювання пухлинних клітин, 1 ген – кодує фермент, що каталізує синтез опіну. 2 гени – подавляють утворення коренів, діють подібно до рослинного гормону ауксину, який навпаки, стимулює ріст коренів. 1 ген, що подавляє утворення пагонів імітує дію цитокініну (що стимулює ріст пагонів). У нормі шлях диференціювання рослини визначається співвідношенням між ауксинами і цитокінінами. Клітини корончатих галів, що містять у високих концентраціях аналоги і цитокінів і ауксинів здатні рости в середовищі без гормонів і в той же час лишатися недиференційованими.

### **Т-ДНК і транспозони**

Єдиний сегмент ДНК Ті-плазмід, який переходить в хромосоми клітини рослини – це т-ДНК. Постає питання – чи не є тДНК елементом типу транспозону. Але результати вивчення структури т-ДНК не виявили аналогії між цим сегментом і відомими мобільними генетичними елементами.

Т-ДНК не містить кінцевих обернених повторів, характерних для транспозонів бактеріального типу, ні повторів, що схожі з LTR ретровірусів. Але нопалінова тДНК має на межі з хромосомною ДНК прямі повтори розміром біля 25 b.p. Схожа послідовність виявлена і на кінцях інтегрованої октопінової т-ДНК, що вказує на функціональну значимість цієї структури.

Проблема ускладнюється тим, що видалення послідовностей, що обмежують т-ДНК, знижує, але не подавляє повністю здатність Ті-плазмиди викликати утворення пухлин. Дослідження за допомогою направленого мутагенезу (індукція великих делецій або вставок) не вказують на те, що у ДНК закодована транспозаза або якийсь інший білок, що бере участь у рекомбінації. Ферменти, відповідальні за вбудовування т-ДНК в хромосоми рослинної клітини, кодуються або іншими ділянками Ті-плазмиди або клітинними хромосомними генами.

## **Менделівське успадкування т-ДНК**

Була отримана мутантна октопінова плазмідна, що має знижену онкотрансформуючу здатність. У популяції трансформованих нею клітин окремі рідкісні клітини можна примусити регенерувати у цілу рослину. Всі тканини таких рослин продовжують синтезувати октопін завдяки присутності в них т-ДНК. Ці рослини схрещували з нормальними рослинами і вирощували отримані насіння. Було показано, що синтез октопінів (і відповідно т-ДНК) успадковується і по чоловічій і по жіночій лінії як менделівська ознака. Після вбудування в хромосому, т-ДНК стає звичайним геном рослини.

## **Ті-плазмід в якості вектора**

Т-ДНК Ті-плазмід має 2 властивості, що роблять її ідеальним вектором для введення чужорідних генів в клітини рослин:

- 1) коло господарів агробактерій дуже широке – вони трансформують клітини майже всіх дводольних рослин;
- 2) інтегрована т-ДНК успадковується у відповідності із законами Менделя, її гени мають власні промотори, під контролем яких можуть експресуватися чужорідні гени.

Найпростіший спосіб введення т-ДНК в клітини рослин полягає в тому, щоб заразити рослину *Agrobacterium tumefaciens*, яка містить відповідну Ті-плазмідну. Необхідно тільки вміти вбудувати потрібні гени у т-сегмент ДНК плазмід. Але розміри цілої Ті-плазмідної суттєво більші розмірів молекул, які звичайно використовуються в роботі з рекомбінантними ДНК. Щоб подолати цю проблему використовують наступний метод. Т-сегмент вирізають з Ті-плазмідної за допомогою рестриктаз і вбудовують в один із стандартних плазмідних векторів для клонування в *E. coli*. Бактерії, що містять плазмідну т-ДНК, розмножують, після цього цю плазмідну виділяють. Потім у т-сегмент вставляють певний ген. Цей гібрид, що містить т-ДНК з вбудованим геном, знову розмножують у великій кількості в *E. coli*, потім вводять у клітини *Agrobacterium tumefaciens*, що несуть повну Ті-плазмідну.

У результаті гомологічної рекомбінації між т-сегментами нативної Ті-плазміді і клонованого вектора т-ДНК з вбудованим чужорідним геном включається у Ті-плазмиду, заміщуючи нормальну т-ДНК. Таким чином ми отримуємо клітини *Agrobacterium tumefaciens*, що несуть Ті-плазмиду, в якій в результаті гомологічної рекомбінації між Т-сегментами нативної Ті-плазміді і клонованого вектора т-ДНК з вбудованим чужорідним геном включається в Ті-плазмиду, заміщуючи нормальну т-ДНК. Отримуємо клітини *Agrobacterium tumefaciens*, що несуть Ті-плазмиду з вбудованим у т-сегмент потрібним геном. Останній етап полягає в зараженні рослин цими модифікованими агробактеріями. Клітини отриманих корончатих галів будуть містити інтегровану т-ДНК з вбудованим чужорідним геном.

### **Трансформація рослинних клітин і протопластів**

Традиційний спосіб трансформації рослинних клітин т-ДНК полягає у нанесенні агробактерій, що містять Ті-плазмиду на спеціально пошкоджений пагін. Вдосконалений метод пропонує зараження і трансформацію клітин *in vitro*. Для цього отримують культуру протопластів клітин листка. На початковій стадії її росту, коли протопласти щойно регенерували клітинну стінку і почали ділитися, культуру заражують агробактеріями. Через кілька годин додають антибіотики, щоб вбити бактерії, і вирощують клітини протягом кількох тижнів в середовищі, що містить рослинні гормони, до того часу, поки не утворяться невеликі калуси. Після цього інкубацію продовжують в середовищі без гормонів. При цьому виживають і продовжують розмножуватись тільки трансформовані клітини. Щоб переконатися в цьому, можна перевірити клітини або прямо на присутність т-ДНК або на синтез опінів. Іноді з клітин таких культур спонтанно регенерують пагони або цілі рослини, що містять т-ДНК і здатні синтезувати опіни.

Можна, хоча і з набагато нижчою ефективністю, прямо трансформувати протопласти за допомогою ДНК Ті-плазміді. Для цього свіжоприготовані протопласти інкубують з

плазмідною ДНК у присутності поліетиленгліколя і йонів кальцію, тобто в середовищі, що близьке по складу до того, яке використовується для злиття протопластів. Т-ДНК потрапляє в протопласти, які потім культивуються в присутності гормонів, що забезпечують регенерацію клітинної стінки і поділ клітин. Через кілька тижнів, коли утворюються каллуси, інкубацію продовжують у середовищі, що не містить гормонів. І в цьому випадку виживають і розмножуються тільки трансформовані клітини.

### **Мобілізація т-ДНК за допомогою *vir*-сегмента Ті-плазмід**

Одна із проблем при використанні Ті-плазмід в якості вектора пов'язана з її великими розмірами (біля 180 kb). Тому більшість ранніх дослідів з Ті-плазмідами проводились по вже описаній схемі (з використанням рBR322). Але подальші дослідження показали, що цю процедуру можна спростити: виявилось, що для зараження і трансформації рослинних клітин агробактеріями необхідні інтактна т-ДНК, і ще одна ділянка Ті-плазмід, яку називають ***vir*-сегмент**. Ще більш важливо з практичної точки зору, що ці дві ділянки ДНК не обов'язково повинні знаходитись в одній плазміді. Якщо клітини агробактерій мають Ті-плазмід з сегментом *vir* і іншу плазмід з т-ДНК, ці бактерії можуть трансформувати клітини рослин, причому т-ДНК (і будь-які вбудовані в неї гени) інтегрують з геномом рослини. Для цього не потрібна гомологічна рекомбінація в бактеріальних клітинах.

### **Аттенуйовані вектори на основі т-ДНК і регенерація рослини з однієї клітини**

Ще одне обмеження використання Ті-плазмід в якості вектора пов'язане з тим, що з трансформованих т-ДНК клітин як правило не вдається регенерувати цілі рослини. Але відомі природні і отримані за допомогою транспозонів так звані **rooty-мутанти** т-ДНК, що трансформують рослинні клітини, але не блокують їх регенерацію. Вони картовані в певній ділянці т-ДНК. Спостереження за цими мутантами підказали дослід по

направленому мутагенезу локуса *gooty* для отримання т-ДНК, що не перешкоджає регенерації рослин. Мутація полягає в тому, що в т-ДНК вбудовується ген, який дослідник хоче ввести в клітини рослини. В одному з таких дослідів ген алкогольдегідрогенази (АДГ) дріжджів вбудували в локус *gooty* клонованої т-ДНК, і такою аттенуйованою т-ДНК трансформували клітини тютюну, з яких потім регенерували цілі рослини. Було показано, що всі клітини отриманих рослин містили багато копій АДГ-Т-ДНК. Ці рослини рано плодоносили, вирощені сіянци теж мали множинні копії химерної т-ДНК. Але ген дріжджової АДГ не експресувався в регенерованих рослинах тютюну. Були застосовані специфічні рослинні промотори для експресії генів, що вводились у рослинний геном. Для цього було виділено і секвіновано ген *Ti*-плазмід, що кодував нопалінсинтетазу. У цьому гені вдалось ідентифікувати ділянку, що містила промотор. Цей промотор був вбудований перед початком структурних генів октопінсинтетази і прокаріотичної хлорамфеніколацетилтрансферази. Отримані гібридні гени клонували і ввели в клітини рослин. Було показано, що ці гени дійсно експресуються в рослинних клітинах під контролем промотора гена нопалінсинтетази. Таким чином введення чужорідних генів в рослинні клітини і регенерація з них цілих рослин, в яких ці гени експресуються, стало реальною справою. Цей підхід відкрив широкі перспективи для вивчення регуляції генів вищих рослин і для генної інженерії.

### **Т-ДНК і виділення генів вищих рослин**

При трансформації т-ДНК вбудовується в різні ділянки генома рослини. Місце інтеграції при кожному акті трансформації випадкове. Коли т-ДНК вбудовується в структурний ген, що кодує який-небудь фермент рослини, цей ген інактивується і трансформовані рослини стають інсерційними мутантами. Цей ефект можна використати для виділення визначених генів рослини після того, як буде встановлено, який саме ген інактивований. Для цього т-ДНК,

яку можна ідентифікувати гібридизацією, за допомогою певної рестиктази вирізають з геному рослини разом з фланкуючими послідовностями. Цю ДНК можна потім використати як зонд для скрінінгу бібліотеки клонів тотальної ДНК рослини. Ділянки ДНК, фланкуючі т-сегмент, будуть при цьому гібридизуватися з нормальними копіями гена, що інактивовані вставкою. Відповідні клони можна розмножувати і отримувати інтактний ген у кількостях, що достатні для подальшої роботи.

### **Практичне застосування геної інженерії рослин з використанням Ті-плазмід**

Кінцева мета всіх досліджень Ті-плазмід полягає в тому, щоб надати селекціонерам новий метод введення індивідуальних генів в геном рослин, а молекулярним біологам – зонди для вивчення їх розвитку. Серйозне обмеження цих підходів – неможливість трансформувати Ті-плазмідами клітини однодольних рослин. Крім того, гени які підвищують урожайність та інші цінні властивості рослин ще слід ідентифікувати. Посилено вивчаються транспозони з метою використання їх як векторів. Зокрема вивчаються рухомі генетичні елементи дрозофіли – Р-елементи. Також перспективними є транспозони кукурудзи - Ac(Ds)-система мобільних елементів. Один із мобільних елементів кукурудзи – **мутатор Робертсона – Mu-елемент** – транспозон розміром 1,5 kb з повторами на кінцях розміром 200 b.p. є перспективним вектором.

## **Лекція XX. ВВЕДЕННЯ ЧУЖОРІДНИХ ГЕНІВ У КЛІТИНИ ССАВЦІВ**

### **Йони кальцію і поглинання ДНК клітинами хребетних**

ДНК окогенних вірусів, вільна від капсидних білків, здатна входити в чутливі клітини і індукувати в них розмноження вірусу і відповідно злякисну трансформацію. Але ефективність таких дослідів була довгий час дуже низькою. Ситуація змінилась після того, як було зроблено методичне відкриття:



трансформація моношарової культури нормальних клітин щура очищеною ДНК аденовіруса йде набагато швидше, якщо до трансформуючої ДНК додати йони кальцію. Механізм переважного поглинання клітинами кальцієвого преципітату ДНК полягає у фагоцитозі гранул ДНК з подальшою інтеграцією з хромосоною. Природньо було висунути гіпотезу, що поглинання будь-якої функціонально активної еукаріотичної ДНК (**трансфекція**) також повинно стимулюватися йонами кальцію. Оскільки лише невелика частина доданої ДНК інтегрує з геномом клітини і функціонує в ньому, необхідно було розробити метод маркера, що забезпечує можливість виявлення і розмноження клітин, що містять інтегровану ДНК.

### **Тимідінкіназа як прототип селективних маркерів у досліджах по трансфекції**

У генетичних дослідженнях еукаріотичних клітин використовувались деякі селективні маркери. Найбільш детально з імовірних селективних маркерів вивчений ген тимідінкінази (tk), фермента допоміжного шляху біосинтезу піримідинів. Фермент фосфорилує тимідін, що утворюється при деградації ДНК з утворенням dTMP, який потім в результаті приєднання двох фосфатних груп перетворюється у dTTP, що знову включається у ДНК. Але нормальний шлях біосинтезу dTTP йде через dCDP, тому присутність тимідінкінази не суттєва для виживання клітин, і клітини позбавлені цієї активності, почувають себе цілком нормально. Tk-мутанти легко ізолювати, ікубуючи клітини в середовищі з бромдезоксипуридином (BrUdr). Включення цього аналога нуклеозиду в ДНК летально для клітин. Але BrUdr включається в ДНК тільки після фосфорилування з участю тимідінкінази. Тому клітини, що містять активний фермент, в присутності BrUdr гинуть, в той час як tk- мутанти виявляються життєздатними. З іншого боку, клітини, що мають генотип tk- гинуть в середовищі "HAT", що містить гіпоксантин, аміноптерин (речовину, що блокує нормальний синтетичний шлях dCDP → dTDP) і тимідин, бо в таких умовах єдиним

джерелом dTTP для біосинтезу ДНК стає реакція, що каталізується тимідинкіназою.

Інкубація tk- -клітин мишей з кальцієвим преципітатом ДНК, що містила ген тимідинкінази вірусу герпеса, приводить до виживання стійких клонів в середовищі “НАТ”. Аналіз методом блотінгу по Саузерну підтвердив, клітини, які вижили дійсно містили стабільно інтегрований ген tk вірусу герпесу. Це означало, що tk-ген можна використовувати як селективний маркер інтеграції інших зчеплених з ним генів.

### **Домінантні маркери для трансформації нормальних клітин**

Застосування клонованого tk-гена в якості вектора для введення генів у еукаріотичні клітини вимагає використання в ролі реципієнтів клітин з генотипом tk-. Хоча теоритично отримати такі мутанти можливо, на практиці цей процес часто виявляється вельми важким, бо для цього потрібно інакимвувати обидва tk-алелі диплоїдної клітини; неохідно, щоб tk- -клітини, що використовуються для трансформації, ревертували з дуже низькою частотою. Враховуючи це, проводиться велика робота по пошуку генних маркерів, що працюють у нормальних клітинах. Є два універсальних вектора, що збудовані по одному принципу: використовуються прокаріотичні гени, з'єднані з еукаріотичними регуляторними сигнальними послідовностями. Перший вектор має ген, що кодує фермент ксантингуанінфосфорибозилтрансферазу (КГФРТ), наявність якого дозволяє бактеріям використовувати ксантин в якості джерела пуринових нуклеозидів. Відповідний фермент з клітин ссавців, гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансфераза (ГГФРТТ), використовує як субстрат гіпоксантин; ксантин утилізується лише з дуже низькою ефективністю. Вектором був сконструйований вбудуванням клонованого бактеріального гена КГФРТ між промотором і сайтом поліаденілювання гена великого Т-антигена вірусу SV40. промотор цього вірусу виключно активний. В результаті утворюється велика кількість КГФРТ. Такий вектор (SVgpt) трансформує не тільки ГГФРТ-клітини ссавців до фенотипу ГГФРТ+, але і здатний

трансформувати клітини дикого типу (тобто виступати як доміантний маркер). У цьому випадку в якості селективного використовується середовище, що містить мікофенолову кислоту і ксантин. Мікофенолова кислота блокує активність ГГФРТ і єдиним джерелом пуринових нуклеотидів лишається ксантин. У таких умовах виживають тільки ті клітини, які отримали вектор SVgpt з активним бактеріальним геном, що дозволяє утилізувати ксантин.

Другий доміантний вектор складається з прокаріотичного гена стійкості до неоміцину ( $Neo^R$ ), вбудованого в ранню область генома SV40. Цей ген кодує фермент, що фосфорилує і тим самим інактивує антибіотик неоміцин, що діє на рибосомі. Еукаріотичні клітини чутливі до аналогу неоміцину G418, який теж інактивується продуктом гена  $Neo^R$ . Тому вектор Svneo можна використовувати для трансформації клітин до фенотипу G418<sup>R</sup>.

### **Котрансформація в результаті внутрішньоклітинного лігування**

Наявність селективних маркерів дає можливість дає можливість вводити в клітини ссавців будь-який ген, якщо зарані лігувати його з клонованим селективним маркером. Попереднє лігування його поза клітиною не обов'язкове: клітини миші, що поглинають tk-ген, разом з ним поглинають і іншу ДНК, що є у кальцієвому преципітаті. Клітини, трансформовані до tk+ фенотипу, поглинають частину ДНК-носія. Цей факт пояснюється тим, що в середовищі клітин мишей екзогенна ДНК лігує з утворенням великого конкатемеру (групи молекул, що зв'язані у єдиний ланцюг) довжиною до 800-1000 kb. Це крупне утворення вбудовується як єдине ціле у випадкові місця хромосом. Таким чином, ДНК, що додане до клітин миші разом з tk-геном ("котрансформуюча" ДНК), у середині клітин виявляється фізично зв'язаною з цим геном.

Користуючись методом котрансфекції, практично будь-який клонований сегмент ДНК легко можна ввести у культивовані клітини еукаріот (при умовах їх

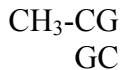
комплементарності і можливої селекції), включаючи цю ДНК разом з селективним маркером до складу суміші для утворення кальцієвого реципієнту.

### **Мікроін'єкції ДНК у клітини ссавців**

ДНК можна ввести у культивовані клітини шляхом прямої мікроін'єкції в ядро скляною мікропіпеткою дуже малого діаметра (0,1 – 0,5 мікрона). Ця методика вимагає складного і тонкого обладнання (спеціальний прилад для виготовлення мікропіпеток, мікроманіпулятор, що встановлює їх правильне положення). При наявності такого обладнання і достатньої практики дослідник може здійснити мікроін'єкцію ДНК в 500-1000 клітин за 1 годину. У найкращих дослідах у 50 % клітин спостерігається стабільна інтеграція і експресія введених генів. Перевага цього методу в тому, що будь-яку ДНК можна ввести в будь-які клітини. Для збереження введеного гену в клітинах не потрібно ніякого селективного тиску. Недоліки методу: необхідність складного обладнання і довгої практики для оволодіння цим методом.

### **Часткове успадкування картини метилювання трансфікованої ДНК**

Геномна ДНК будь-якого організму містить метильовані основи, що утворюються в результаті постреплікативної модифікації. У хребетних єдина метильована основа – це 5-метилцитозин, який виявляється майже виключно в послідовності (5'-CG-3'). У птахів і у ссавців 50 – 70 % таких динуклеотидів модифіковані метилюванням. Вважається, що метилювання знову синтезованих ниток ДНК здійснюється ферментом метилазою, що діє тільки на напівметилювані групи:



У відповідності до такої схеми, є тенденція до успадкування одного разу встановленої картини метилювання. Є гіпотеза, що функціональні гени в меншій степені метильовані,

ніж їх неактивні еквіваленти. Якщо це так. То повинні існувати вибіркові механізми, які:

- 1) деметилують ключові регуляторні послідовності, можливо, перешкоджаючи їх метилюванню після реплікації ДНК;
- 2) забезпечують точне зберігання наявної картини метилювання;
- 3) метилують ще не метильовані раніше послідовності.

Гіпотеза про те, що специфічна картина метилювання може успадкуватися, підтверджується результатами дослідів, в яких не метильовану раніше ДНК бактеріофага  $\phi 174$  метилювали *in vitro* і вводили в клітини миші. Через 25 клітинних поколінь були досліджені сайти метилювання у інтегрованій фаговій ДНК, виявилось, що більшість з них зберегли приєднані ферментативним шляхом *in vitro* метильовані групи. Але успалкування метилцитозину все таки було не повним: при кожному раунді реплікації невелика частина початково метильованих сайтів не метилювалася.

Під час іншого досліду метилювали еукаріотичний (курячий) tk-ген, що був клонований у *E. coli*. Метилювання привело до зменшення частоти трансформації в порівнянні з контрольованим неметилюваним tk-геном. Очевидно, зниження ефективності трансформації в результаті ферментативного метилювання ДНК відображає метилювання ключевих регуляторних послідовностей, що подавляє їх функціонування.

### **Виділення генів, введених в клітини шляхом трансфекції**

Існує два підходи до виділення введених генів в клітини миші: “скрінінг” і “порятунок”.

“Скрінінг” полягає в тому, що донорну ДНК спочатку обробляють великим числом рестриктаз для пошуку ферментів, що не розщеплюють даний ген і не порушують його здатність до трансформації. ДНК гідролізують цим ферментом і за допомогою лігази зшивають з якоюсь специфічною гетерологічною ДНК (часто – з pBR322). В результаті всі фрагменти еукаріотичної ДНК, в тому числі фрагмент, що містить селективний маркер, отримують прокаріотичний

“ярлик”. Трансформацію проводять, як звичайно; при цьому у мишиній клітині селективний ген виявляється розташований поруч з “ярликом” (наприклад, рBR322). ДНК цього “первісного реципієнту” виділяють і трансформують нею вторинну популяцію клітин. Цей етап необхідний, оскільки у вихідній ДНК були відмічені всі фрагменти і первісна клітина реципієнт може випадково містити кілька копій ДНК рBR322, крім тієї, що зв’язана з селективним маркером. Вторинний трансформант містить як правило тільки одну копію цієї послідовності – саме ту, яка зв’язана з досліджуваним геном. Потім конструюють бібліотеку цієї ДНК у бактеріофазі або в космідах і проводять її скрінінг гібридизацією з ДНК-“ярликом”, яка в принципі повинна бути присутня в тому ж бактеріофазі або в тій же косміді, що і ген, який шукають. Цей підхід був вперше успішно використаний для виділення гена аденінфосфорибозилтрансферази хом’яка.

Якщо в якості донора використовують ДНК людини, необхідність в “ярлику” відпадає, бо в людській ДНК присутні Alu-послідовності, які повторюються сотні разів і не дають помітної перехресної гібридизації з якимись послідовностями ДНК мишей. Alu-послідовності всюдисущі в геномі людини, їх можна виявити практично поблизу кожного гена. Тобто гени людини мають природні “ярлики”. Людською ДНК трансформують клітини миші, потім проводять другий раунд трансформації. Після цього конструюється бібліотека ДНК вторинного трансформанта і проводиться її скрінінг шляхом гібридизації з клонованою Alu-послідовністю. Присутність Alu-послідовностей слід очікувати у рекомбінантному бактеріофазі, який містить селективний маркер.

Метод “порятунку” оснований на приєднанні до ДНК початково використаного для трансформації функціонально активного маркера. Це може бути бактеріальний маркер стійкості до якого-небудь антибіотика або ген прокаріотичної супресорної тРНК. Перший етап дослідження полягає в підбірці рестриктази, що не розщеплює ген, який нас цікавить. Коли такі ферменти знайдені, ДНК гідролізують одним з них і отримані

фрагменти зшивають або з pBR322, що містить інтактний ген стійкості до антибіотика і розщеплюють тим же ферментом, або з клонованим геном супресорної тРНК *E. coli* (supF). ДНК вводять у клітини мишей, з первісних трансформантів виділяють ДНК і використовують її для другого раунду трансформації. При цьому потрібний еукаріотичний ген повинен виявитись поруч з прокаріотичним селективним маркером. Якщо вихідним вектором була плазміда pBR322, ДНК вторинного трансформанта розщеплюють відповідною рестриктазою і циркуляризують лігазою. Ген, що нас цікавит повинен бути у складі одної молекули з плазмідним геном стійкості. Всю отриману суміш ДНК використовують для трансформації *E. coli* і колонії трансформантів ідбирають на середовищі з відповідними антибіотиками. Всі клони, що повиростали містять плазміди з геном стійкості і селективним еукаріотичним геном.

Якщо вихідним вектором був ген супресорної тРНК, то з ДНК вторинного трансформанта отримують бібліотеку, використовуючи фаг  $\lambda$  з амбер-мутацією (стоп-кодоном) у гені, що відповідальний за лізис. Щоб такий фаг міг завершити літичний цикл, потрібний активний ген supF. Таким чином, хоча вся ДНК вторинного трансформанта може бути упакована у фагові частинки, розмноження фага і лізис бактерій після трансдукції буде спостерігатись тільки для тих фагів, які містять ген supF. Поруч з цим геном повинен знаходитись і селективний еукаріотичний ген.

### **Регуляція активності гена після трансфекції**

Розробки методів введення ДНК в клітини ссавців дозволила ідентифікувати ділянки, що відповідальні за регуляцію експресії деяких еукаріотичних генів. Як правило, при введенні клонованого гена в еукаріотичну клітину він продовжує реагувати на сигнали, які контролюють його нормальну експресію *in vivo*. Як і у прокаріот, у регуляції експресії індивідуальних еукаріотичних генів беруть участь цис-діючі елементи (типу промоторів), що розташовані, звичайно, безпосередньо поруч біля відповідних генів. Зміна активності

генів часто здійснюється і молекулами з трансдією, які зв'язуючись з регуляторними послідовностями, вмикають або вимикають гени. Багато еукаріотичних генів вмикаються або вимикаються різними стероїдними гормонами. Наприклад, транскрипція геному вірусу раку молочних залоз мишей (MMTV) знаходиться під позитивним контролем глюкокортикоїдних гормонів. Клонований провірус MMTV при введенні у клітини мишей, що мають рецептори для тих гормонів, продовжують реагувати на додавання гормона: в його присутності швидкість транскрипції провіруса зростає в 5-10 разів. Клонований ген  $\alpha 2u$ -глобуліна щура в нормі регулюється кількома гормонами, продовжує реагувати на інсулін і глюкокортикоїди при введенні у мишачі клітини. В обох випадках для нормальної регуляції активних генів потрібні лише дуже короткі ділянки фланкуючої ДНК. Коли невеликі фрагменти (300 б.р.) ДНК, яка фланкує MMTV або ген  $\alpha 2u$  з 5'-кінця, пришивають до гена тимідинкінази вірусу простого герпесу, експресія tk-гену теж може ставати гормон-індуцібельною. Серед інших генів, для яких демонструвалася нормальна регуляція в гетерологічному оточенні, варто зауважити ген  $\alpha$ -інтерферону людини (його експресія індукується вірусною інфекцією), ген металотіоніну мишей (що після трансфекції реагує на йони  $Cd^{2+}$ ), ген протеїну теплового шоку дрозофіли (p70) – після введення у клітини мишей він індукується у відповідь на підвищення температури. У всіх цих випадках регуляторні елементи знаходяться безпосередньо поблизу від гену (а іноді, можливо, і в середині нього).

### **Докази існування специфічних ракових генів людини у дослідях по трансфекції**

Методи трансфекції були використані для ідентифікації і клонування генів, що беруть участь в утворенні ракових пухлин у людини. Початково було встановлено, що високомолекулярна ДНК, виділена з трансформованих хімічними канцерогенами клітин мишей або з первісної культури клітин солідної пухлини людини (наприклад, карціоми сечового міхура), може викликати



злякiсну трансформацiю нормальних мишачих фiбробластiв (клiтин лiнii НIН). Дослiд полягав у слiдуючому: ДНК з ракових клiтин у виглядi кальцiєвого преципiтату додавали до моношару клiтин НIН. Обробленi таким чином клiтини помiщали в середовище з низьким вiстом сироватки. Через кiлька тижнiв iнкубацiї з'явилися невеликi фокуси (колонii трансформованих клiтин). В контрольних культурах, не оброблених ДНК таких фокусiв не було. Коли трансформованi клiтини вводили мишам, у них розвивалися солiднi пухлини. Цi результати свiдчать про те, що:

- 1) як мiнiмум для певних пухлин трансформований фенотип є домiнантим, тобто вiн обумовлений присутнiстю, а не вiдсутнiстю продукту якогось гену;
- 2) трансформацiя клiтин НIН може iндукуватися в результатi експресiї одного гена. Про це свiдчить факт – ефективнiсть введення генiв в клiтини ссавцiв з використанням тотальної геномної ДНК в якостi донора вкрай низька, i якщо б для трансформацiї потрібно було б одночасне потрапляння в клiтину навiть всього двох генiв, її нiколи б не вдалось спостерiгати.

Розрiзання ДНК пухлинних клiтин рiзними рестриктазами подавлює її трансформуючу активнiсть. Нахили кривих iнактивацiї варiюють вiд лiнii до лiнii пухлинних клiтин, що вказує на можливiсть виникнення ракових клiтин в результатi багатьох рiзних генетичних змiн.

Виявлення рiзних картин розподiлу Alu-повторiв людини в ДНК вторинних трансформантiв (iндукованих ДНК мишачих клiтин трансформованих ДНК ракових клiтин) пiдтверджує цей висновок. ДНК таких вторинних трансформантiв повинна мiстити тiльки тi Alu-послiдовностi, якi знаходяться поруч з людськими раковими генами або всерединi їх iнтронiв. Встановлено, що Alu-послiдовностi, якi переносяться разом з генами карциноми сечового мiшура, карциноми кишкiвника, нейробластоми рiзнi, i цi пухлини викликаються трьома рiзними онкогенами. Але онкогени, присутнi в ДНК ракових клiтин легень, не вдається вiдрiзнити вiд онкогенiв ракових клiтин

товстого кишківника. Можливо, ці дві пухлини можуть мати одну і ту ж генетичну основу.

### **Клонування онкогенів людини**

Використання скрінінгу шляхом гібридизації з Alu-повторами дозволило клонувати людські онкогени. Першими були клоновані ген карциноми сечового міхура (розміром 5,4 kb), онкоген нейробластоми (13,5 kb). Ген раку товстого кишківника виявився значно більшим у розмірах (45 kb). Для його дослідження було використано методи “прогулянка по хромосомі”. Не дивлячись на варіації в розмірах, відмінності, ці гени мають в принципі одну і ту ж екзон-інтронну організацію з чотирма екзонами, що кодують схожі, але не ідентичні білки з молекулярною масою біля 21 000 D. Цьому протеїну дали умовну назву p21. Показано, що невеликі кількості білків p21 зв’язані з зовнішньою плазматичною мембраною ракових клітин. Для них характерний високий рівень гомології з ідентифікованими раніше онкогенами ретровірусів. Ген раку сечового міхура людини дуже схожий на онкоген *gas* вірусу саркоми Харві, а ген раку легень схожий на онкоген *gas* вірусу саркоми Кістена. Як і у онкогенів ретровірусів, у цих людських онкогенів є еквівалентні гени нормальних клітин, онкогени виникають з них в результаті мутацій, які приводять до того, що відповідні білки отримують онкогенні потенції. Секвінування онкогенів показало, що онкоген раку сечового міхура людини відрізняється від свого гомолога з нормальних клітин єдиною точковою мутацією: гліцин в положенні 12 нормального протеїну p21 у протеїні ракових клітин замінюється на валін. Але досі не встановлено функції ні нормального ні мутантного білків p21.

Очевидно, до остаточного розв’язання проблеми канцерогенезу ще далеко, але попереду будуть нові відкриття, завдяки яким стануть зрозумілі молекулярні механізми індукції трансформації клітин білковими продуктами онкогенів.

## ПОГРАМНІ ВИМОГИ ДО КУРСУ ГЕНЕТИКИ

1. Предмет генетики.
2. Розділи генетики.
3. Історія генетики.
4. Досліди Менделя. Закони Менделя.
5. Моногібридне схрещування.
6. Повне і неповне домінування.
7. Проміжне успадкування.
8. Кодомінування.
9. Генотип і фенотип.
10. Гомозигота, гетерозигота, гемізигота.
11. Множинний алелізм.
12. Дигібридне і полігібридне схрещування.
13. Статистичні причини відхилення від законів Менделя.
14. Летальні і напівлетальні гени.
15. Неповний прояв генів.
16. Вплив зовнішніх умов на прояв домінування.
17. Гени-модифікатори.
18. Взаємодія генів.
19. Гени-супресори.
20. Епістаз.
21. Криптомерія.
22. Комплементарні і полімерні гени.
23. Андрогенез.
24. Число і будова хромосом.
25. Каріотип.
26. Хроматин.
27. Визначення статі.
28. Статеві хромосоми.
29. Успадкування зчеплене зі статтю.
30. Нерозходження статевих хромосом.
31. Статевий хроматин.
32. Кросинговер.
33. Мітотичний кросинговер.
34. Генетика бактерій.

35. Транспозони.
36. Плазміди.
37. Картування генів бактерій.
38. Цитоплазматична спадковість.
39. Гени пластид.
40. Гени мітохондрій.
41. Мутації.
42. Поліплоїдія.
43. Хромосомні мутації.
44. Генні мутації.
45. Причини мутацій. Мутагени.
46. Фізичні мутагени. Теорія мішені. Кисневий ефект.
47. Хімічні мутагени. Супермутагени. Антимутагени.
48. Модифікації. Морфози. Фенокопії.
49. Оперон.
50. Організація генома.
51. Гістони і нуклеосоми.
52. Тонка будова гена.
53. Повтори ДНК.
54. Молекулярні механізми мутацій і рекомбінацій.
55. Імуногенетика.
56. Пенетрантність і експресивність.
57. Взаємодія генів.
58. Механізми онкогенезу.
59. Онкогени.
60. Генетика популяцій.
61. Закон Харді-Вайнберга.
62. Потік генів і дрейф генів.
63. Мутаційний тиск.
64. Інбридинг.
65. Гетерозис.
66. Тиск добору.
67. Поліморфізм популяцій.
68. Генетика кількісних ознак.
69. Основи генної інженерії. Методи генної інженерії.
70. Рестриктази.

71. Секвінування ДНК.
72. Вектори.
73. Генна інженерія еукаріот: дріжджів і вищих рослин.
74. Використання протопластів і сферопластів.
75. Ті-плазмиди.

## ЗАДАЧІ З ГЕНЕТИКИ

**Задача № 1.** Схрестили кролицю дикого типу з кроликом забарвлення світло-сіре. В першому поколінні одержали: 21 кроленя дикого типу, 9 кроленят забарвлення гімалайське і 10 кроленят забарвлення світло-сіре. Поясніть отримані результати. Які генотипи кроликів всіх поколінь? Доведіть правильність вашої гіпотези методом “хі-квадрат”.

**Задача № 2.** Кроликів чистої лінії “мардер” схрестили з чистою лінією “гімалайських” (Р). Отримали в першому поколінні (F1) всіх кроликів забарвлення “мардер”. Одночасно схрестили чисту лінію кроликів “шиншила” з чистою лінією “альбінос”. Всі кролики в першому поколінні (F1) мали забарвлення “світло-сіре”. Яке буде розщеплення по фенотипу від схрещування кроликів перших поколінь цих двох аналізуючих зхрещувань (“мардер” Х “світло-сіре”)? Які генотипи всіх поколінь кроликів?

**Задача № 3.** У матері четверта група крові, в батька – третя. Які групи крові можливі у дітей?

**Задача № 4.** Двох чорних самок щура схрещували з коричневим самцем. Було отримано кілька разів нащадків. Нащадки 1-ї самки склали 36 чорних шурят. Нащадки 2-ї самки – 14 чорних і 10 коричневих шурят. Який імовірний механізм успадкування чорного і коричневого забарвлення у шурів? Які генотипи батьків? Для перевірки вашої гіпотези використайте метод “хі – квадрат”.

**Задача № 5.** У батька четверта група крові, у матері перша. Які групи крові можливі у їхніх дітей? В якому співвідношенні?

**Задача № 6.** Зелених хвилястих папужок схрестили з білими. В першому поколінні одержали 9 зелених папужок, 8 жовтих, 10 блакитних, 9 білих. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом “хі – квадрат”.

**Задача № 7.** У курей розовидний гребінь – ознака, що домінує по відношенню до простого гребеня. Фермер думає, що деякі з його курей-віандотів з розовидним гребенем є носіями аеля простого гребеня. Як він може встановити, які з курей є гетерозиготами?

**Задача № 8.** Генетик провів самозапилення у шести зелених рослин однієї лінії кукурудзи і отримані зерна кожної рослини проростив. У потомстві кожної рослини виявились зелені і альбіноси (позбавлені хлорофілу) рослини в наступуючій пропорції:

№ батьківських рослин	Зелені	Білі
1	38	11
2	26	11
3	42	12
4	30	9
5	36	14
6	48	12

Який імовірний механізм успадкування альбінізму у кукурудзи? Які генотипи батьківських рослин? Для перевірки вашої гіпотези використайте метод “хі” - квадрат.

**Задача № 9.** Рослини кукурудзи тої ж лінії, що і в умовах попередньої задачі, запилювали пилком рослин іншої лінії. З отриманих рослин виростили 25 зелених і 10 білих рослин. Якому розподілу відповідає цей результат (3:1 чи 2:1)? Який імовірний генотип батьківських рослин?

**Задача № 10.** Чоловік з групою крові А одружився з жінкою з групою крові В. В них народилась дитина з групою

крові 0. Які генотипи всіх трьох? Які ще генотипи і з якими частотами можна очікувати серед нащадків від таких шлюбів.

**Задача № 11.** Схрестили кролика забарвлення мардер з кролицею забарвлення світло-сіре. Отримали кілька приплодів загальною чисельністю 41 кроленятко. З них 21 було забарвлення світло-сіре, 9 забарвлення мардер і 11 забарвлення гімалайські. Поясніть отримані результати. Які генотипи батьківського покоління і нащадків? Доведіть правильність вашої гіпотези методом “хі-квадрат”.

**Задача № 12.** Схрестили кролика забарвлення дикого типу з кролицею забарвлення світло-сіре. Отримали кілька приплодів загальною чисельністю 43 кроленятка. З них 21 було забарвлення дикого типу, 12 забарвлення світло-сіре і 10 забарвлення мардер. Поясніть отримані результати. Які генотипи батьківського покоління і нащадків? Доведіть правильність вашої гіпотези методом “хі-квадрат”.

**Задача № 13.** Схрестили кролика забарвлення світло-сіре з кролицею забарвлення гімалайське. Отримали кілька приплодів загальною чисельністю 45 кроленят. З них 22 було забарвлення світло-сіре, 23 забарвлення мардер. Поясніть отримані результати. Які генотипи батьківського покоління і нащадків? Доведіть правильність вашої гіпотези методом “хі-квадрат”.

**Задача № 14.** Зелених хвилястих папужок схрестили з білими яке можливе розщеплення в першому поколінні?

**Задача № 15.** Гарбуз, що має дисковидні білі плоди схрестили з гарбузом, що має видовжені зелені плоди. Який можливий генотип і фенотип рослин в першому і другому поколіннях в якому схрестили дисковидні білі з дисковидними білими гарбузами?

**Задача № 16.** Схрестили дві чисті лінії андалузських курей – схрестили чорного рівномірно забарвленого півня з білою куркою. Всі курчата в першому поколінні виявились сірими. Причому всі курочки були рівномірно забарвлені, а всі півники сірі рябі. У другому поколінні отримали 10 чорних рівномірно забарвлених півників, 9 чорних рябих півників, 20 сірих рябих півників, 21 сірого рівномірно забарвленого півника, 19 білих

півників, 8 чорних рівномірно забарвлених курочок, 11 чорних рябих курочок, 18 сірих рябих курочок, 20 сірих рівномірно забарвлених курочок, 21 білу курочку. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом “хі-квадрат”.

**Задача № 17.** На одній фермі було кілька чистих ліній білих курей. Схрестили білу курку з лінії I з білим півнем з лінії II. У першому поколінні всі курчата були білими. У другому поколінні 27 курчат були білими і 6 чорними. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом “хі-квадрат”.

**Задача № 18.** Схрестили пшеницю з темно-червоним насінням з пшеницею з білим насінням. У першому поколінні одержали всі рослини з червоним насінням. У другому поколінні отримали рослини:

- З темно-червоним насінням – 11,
- З яскраво-червоним насінням – 52,
- З червоним насінням – 51,
- З блідо-червоним – 40,
- З білим – 10.

Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом “хі-квадрат”.

**Задача № 19.** Схрестили самку дрозофіли сіру, з червоними очима і дельтоподібними крилами з самцем сірим, з червоними очима і нормальними крилами. У першому поколінні одержали:

Самок:

Сірих, з червоними очима, дельтоподібними крилами – 21,

Сірих, з червоними очима, нормальними крилами – 22,

Самців:

Жовтих, з червоними очима, дельтоподібними крилами – 11,

Жовтих, з червоними очима, нормальними крилами – 10,

Сірих, з білими очима, дельтоподібними крилами – 12,

Сірих, з білими очима, нормальними крилами – 9.



Окремо провели схрещування самця з дельтовидними крилами з самкою з нормальними крилами – всі мухи в першому поколінні були з дельтовидними крилами. Поясніть отримані результати. Які генотипи всіх мух? Доведіть правильність вашої гіпотези методом “хі-квадрат”.

**Задача № 20.** Білу, майже глуху від народження кішку схрестили з смугастим котом з нормальним слухом. Отримали кілька виводків загальною кількістю 30 кошенят. З них - 4 було чорних, 7 – смугастих, 14 – білих глухих і 5 – попелястих. Які генотипи батьків і дітей? Гіпотезу доведіть методом ”хі-квадрат”.

**Задача № 21.** У морських свинок алель чорного забарвлення В домінує над алелем альбінізму b. Алель грубої шерсті R домінує над алелем тонкої шерсті r. Гени R та B незалежні. Які будуть результати зхрещувань між гомозиготою по генам B та R з тонкошерстими альбіносами? У F1? У F2? А який результат схрещування між F1 і тонкошерстим батьком-альбіносом?

**Задача № 22.** Чорну грубошерсту морську свинку схрещували з грубошерстим альбіносом. Серед нащадків виявилось 13 чорних грубошерстих, 16 альбіносів грубошерстих, 6 чорних тонкошерстих і 5 альбіносів тонкошерстих. Визначте генотипи батьків і перевірте вашу гіпотезу, використовуючи метод “хі-квадрат”.

**Задача № 23.** У *Drosophila melanogaster* існує рецесивний алель, що приводить до розвитку коротких рудементарних крил vg. Відповідний домінантний алель vg+ обумовлює розвиток нормальних крил. В іншому генному локусі існує рецесивний алель st, що викликає яскраво-червоний колір очей; відповідний йому домінантний алель st+ відповідає нормальному червоному кольору очей. Провели 3 досліди по вивченню цих генів:

№ досліду	Фенотип батьків	Фенотип нащадків			
		Довгі крила, червоні очі	Довгі крила, яскраві очі	Короткі крила, червоні	Короткі крила, яскраві

				очі	очі
1.	Довгі крила, червоні очі X короткі крила, яскраві очі	178	164	142	140
2.	Довгі крила, червоні очі X довгі крила, червоні очі	364	0	107	0
3.	Довгі крила, червоні очі X довгі крила. Червоні очі	309	107	95	29

Визначте генотипи батьків. Для перевірки вашої гіпотези використайте метод “хі” - квадрат.

**Задача № 24.** Яке число різних типів гамет, генотипів і фенотипів у нащадків самозапилюючої рослини, що гетерозиготна по трьом, п’яти, семи різним домінантним генам?

**Задача № 25.** Рослина, гетерозиготна по чотирьом незалежно успадкованим парам генів (Aa Bb Cc Dd), самозапилюється. Вирахуйте очікувані частоти слідуючих генотипів серед нащадків цієї рослини:

- 1) aa bb cc dd
- 2) aa bb cc Dd
- 3) Aa Bb Cc Dd

**Задача № 26.** У кунжута одинарний плід – ознака домінантна по відношенню до потрійного плоду, а нормальний

листок – ознака доміантна по відношенню до зморшкуватого.  
Провели 5 дослідів:

№ п/п	Фенотип батьків	Фенотип нащадків			
		Одинарний, нормальний	Одинарний, зморшкуватий	Потрійний, нормальний	Потрійний, зморшкуватий
1.	Одинарний, нормальний X потрійний зморшкуватий	362	118	0	0
2.	Одинарний, нормальний X потрійний зморшкуватий	211	0	205	0
3.	Одинарний, зморшкуватий X потрійний нормальний	78	90	84	88
4.	Одинарний нормальний X потрійний зморшкуватий	318	98	323	104
5.	Одинарний нормальний X одинарний зморшкуватий	110	113	33	38

Які генотипи батьків у кожному з 5-ти дослідів ? Для перевірки вашої гіпотези використайте метод “хі” - квадрат.

**Задача № 27.** Яку долю всіх можливих генотипів складають гомозиготи, коли число різних алелей даного гену рівне трьом? П’яти? Семи?

**Задача № 28.** Схрещували щурів дикого типу (агуті, рівномірно забарвлені, темноокі, неослаблене забарвлення) з чорними, плямистими, червоноокими, ослабленого забарвлення. В першому поколінні – всі щурі дикого типу. Їх схрестили з чорними плямистими, рубіновоокими, ослабленого забарвлення. Отримали потомство:

Дикий тип – 41

Чорні – 40

Агуті, плямисті – 29

Агуті, рубіновоокі - 33

Агуті, рубіновоокі, плямисті - 34

Рубіновоокі, чорні – 38

Агуті, ослаблене забарвлення – 36

Чорні, ослаблене забарвлення – 29

Плямисті, агуті, ослаблене забарвлення – 33

Плямисті, чорні, ослаблене забарвлення – 34

Рубіновоокі, агуті, ослаблене забарвлення - 39

Рубіновоокі, чорні, ослаблене забарвлення – 34

Плямисті, рубіновоокі, чорні – 32

Плямисті, рубіновоокі, агуті, ослаблене забарвлення – 25

Плямисті, червоноокі, чорні, ослаблене забарвлення – 30

Пояснить отримані результати. Для перевірки вашої гіпотези використайте метод “хі” - квадрат. В яких пропорціях будуть представлені ці фенотипи в потомстві від зхрещувань F1 X F1?

**Задача № 29.** Схрестили двох жовтих мишей. Отримали від них 9 приплодів загальною кількістю 96 мишенят. З них 65 було жовтих, 9 білих, 5 чорних і 17 агуті. Який генотип всіх мишей? Для перевірки вашої гіпотези використайте метод “хі” - квадрат.

**Задача № 30.** Схрестили самку дрозофіли з червоними очима з самцем дрозофіли з пурпурними очима. Отримали в першому поколінні 51 муху з червоними очима і 32 мухи з пурпурними очима. Пояснить отримані результати. Для перевірки вашої гіпотези використайте метод “хі” - квадрат.

**Задача № 31.** Схрестили двох дрозофіл з червоними очима. У першому поколінні виявили 131 дрозофілу з червоними очима і 29 дрозофіл пурпурними очима. Потім схрестили іншу дрозофілу з червоними очима з дрозофілою з пурпурними очима. Отримали в першому поколінні 121 дрозофілу з червоними очима і 39 дрозофіл з пурпурними

очима. Поясніть отримані результати. Для перевірки вашої гіпотези використайте метод “хі” - квадрат.

**Задача № 32.** Схрестили самку дрозофіли жовту з червоними очима з самцем сірим з червоними очима. Отримали в першому поколінні:

Самок:

Сірих з яскравими очима – 10,

Сірих з червоними очима – 31,

Самців:

Жовтих з яскравими очима – 11,

Жовтих з червоними очима – 32.

Потім провели інше схрещування. Взяли самку сіру з яскравими очима і схрестили з самцем з жовтим з червоними очима. У першому поколінні одержали:

Самок:

20 жовтих з яскравими очима,

21 сіру з яскравими очима,

19 жовтих з червоними очима,

18 сірих з червоними очима.

Самців:

22 жовтих з яскравими очима,

21 сірого з яскравими очима,

20 жовтих з червоними очима,

23 сірих з червоними очима.

Поясніть отримані результати. Для перевірки вашої гіпотези використайте метод “хі” - квадрат.

**Задача № 33.** Схрестили кішку черепахового забарвлення з короткою шерстю з котом чорним з довгою шерстю. Отримали кілька приплодів. Загалом у першому поколінні було:

Кішок:

- чорних з короткою шерстю – 9,
- чорних з довгою шерстю – 11,
- черепахових з короткою шерстю – 10,
- черепахових з довгою шерстю – 12;

Котів:

- чорних з короткою шерстю – 11,

- чорних з довгою шерстю – 13,
- рудих з короткою шерстю – 10,
- рудих з довгою шерстю – 11;

Потім взяли з першого покоління черепахову кішку з короткою шерстю і схрестили з рудим котом з довгою шерстю. Отримали в другому поколінні:

Кішок:

- черепахових з короткою шерстю – 5,
- черепахових з довгою шерстю – 6,
- рудих з короткою шерстю – 7,
- рудих з довгою шерстю – 6,

Котів:

- чорних з короткою шерстю – 5
- чорних з довгою шерстю – 7
- рудих з короткою шерстю – 7,
- рудих з довгою шерстю – 6.

Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 34.** Схрестили дрозоділ з коричневими очима з дрозоділами з яскравими очима. У першому поколінні отримали всіх дрозоділ з червоними очима. У другому поколінні одержали 90 мух з червоними очима, 31 муху з яскравими очима, 29 мух з коричневими очима, 11 мух з білими очима. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 35.** Схрестили самця коричневої і самку сапфірової норки. У першому поколінні одержали всіх цуценят коричневих. У другому поколінні отримали цуценят: 46 – коричневих, 5 – сапфірових, 12 – алеутських, 11 – платинових. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 36.** Схрестили кроликів з нормальною шерстю з ангорськими (довгошерстими) кроликами. У першому поколінні всі кролики мали нормальну шерсть. У другому поколінні 57 мали нормальну шерсть, 27 – довгу шерсть, 21 – коротку шерсть.

Коли схрестили гібридів з першого покоління з довгошерстими кроликами отримали: 39 – з довгою шерстю, 15 – з короткою шерстю, 18 – з нормальною шерстю.

Коли схрестили гібридів з першого покоління з короткошерстими, то отримали в результаті одного схрещування 30 – з нормальною шерстю, 31 – з короткою шерстю. 19 – з довгою шерстю. В результаті другого такого схрещування з іншими кроликами таких же фенотипів одержали 10 – з нормальною шерстю, 11 – з короткою шерстю. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 37.** Схрестили дві чисті лінії кукурудзи. Одна чиста лінія мала забарвлений щиток (скутеллюм), інша – не забарвлений. У першому поколінні всі мали забарвлений щиток. У другому поколінні отримали рослини: 163 – із забарвленим щитком, 30 – з незабарвленим щитком. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 38.** В одній лабораторії мали чотири різновидності мишей: 1) дикого типу, 2) з вкороченим хвостом, 3) з дуже коротким хвостом, 4) безхвості. Для дослідження цього феномену провели 4 схрещування:

I. Схрестили безхвостих мишей з мишами з вкороченим хвостом. Отримали у першому поколінні мишей: 30 – з дуже вкороченим хвостом, 31 – безхвоті, 29 – з вкороченим хвостом.

II. Схрестили мишей з вкороченим хвостом з мишами з вкороченим хвостом. Отримали у першому поколінні мишей: 41 – дикого типу, 83 – з вкороченим хвостом.

III. Схрестили безхвостих мишей з безхвостими мишами. Отримали у першому поколінні виключно безхвостих мишей.

IV. Схрестили мишей з дуже короткими хвостами з мишами з дуже короткими хвостами. Одержали у першому поколінні: 32 миші дикого типу, 65 – з дуже короткими хвостами. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 39.** Схрестили рослини грициків з трикутними плодами. У першому схрещуванні одержали у першому

поколінні 91 рослину з трикутними плодами і 29 з овальними плодами. У другому схрещуванні двох інших рослин з трикутними плодами одержали: 150 рослин з трикутними плодами і 10 рослин з овальними плодами. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 40.** Схрестили жовтий гарбуз з білим гарбузом. Отримали у першому поколінні: 121 рослину з білими плодами, 92 рослини з жовтими плодами і 29 рослин з зеленими плодами. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 41.** Схрестили баклажани з синіми плодами з баклажанами з білими плодами. У першому поколінні одержали 100 рослин з білими плодами і 61 рослину з синіми плодами.

Потім схрестили два баклажани з білими плодами. У першому поколінні отримали всі рослини з синіми плодами.

Потім схрестили дві рослини з білими плодами. У першому поколінні отримали 300 рослин з білими плодами і 101 рослину з синіми плодами. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 42.** Шляхом злиття двох і більше восьмиклітинних морул ембріонів різних генотипів можна отримати мишей-химер. Клітини перебудовуються і формують аномальну крупну морулу, яка при розвитку дає зародок нормальних розмірів, а потім новонароджене мишенятко нормального розміру, що складається з клітин різних генотипів. Були проведені досліді по злиттю чотирьох генетично маркованих зародків. Маркерами служили гени, що визначають біле, чорне, жовте і коричневе забарвлення шерсті мишей. Отримували мишей, що мали шерсть з плямами трьох кольорів у різних комбінаціях, але химер, які б мали плями всіх чотирьох кольорів отримувати не вдавалось. Поясніть отримані результати.

**Задача № 43.** Схрестили чорну мишу рівномірно забарвлену з мишею альбіносом. У першому поколінні всі мишенята були забарвлення агуті. У другому поколінні одержали мишенят: 28 – агуті, 10 – чорних рівномірно



забарвлених, 12 – білих. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 44.** Проводили схрещування чистих ліній шурів-альбіносів з чистими лініями сірих шурів. Під час кожного схрещування брали ту саму лінію сірих шурів і різні лінії шурів альбіносів. Отримали результати:

Перше схрещування. У першому поколінні всі шурі були сірі. У другому поколінні одержали: 292 – сірих, 87 – жовтих, 88 чорних, 32 – кремових, 171 – альбіноси.

Друге схрещування. У першому поколінні всі шурі сірі. У другому поколінні: 174 – сірих, 65 – чорних, 80 – альбіносів.

Третє схрещування. У першому поколінні всі шурі сірі. У другому поколінні: 104 – сірі, 33 – жовті, 44 – альбіноси.

Четверте схрещування. У першому поколінні всі шурі сірі. У другому поколінні: 48 – сірих, 16 – альбіноси. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 45.** У північній Ірландії (Ольстер чи то Улад, графство Фермана) було вивчено кілька сімей, в яких спостерігалися випадки глухоти. В одній з таких сімей у здорових батьків народилося 8 дітей (нічого тут дивуватись – це була католицька ірландська сім'я – такі сім'ї традиційно багатодітні), 4 з яких (два хлопчики і дві дівчинки) були глухонімі. У іншій сім'ї у глухонімих батьків було 3 дочки і один син – всі глухонімі. Глухонімий син з 1-ї сім'ї одружився на глухонімій дочці з 2-ї сім'ї. Всі їх діти (дочка і три сини) теж були глухонімі. Але коли один із цих глухонімих синів одружився на глухонімій дівчині, що не була родичкою з цією сім'єю (вона була родом з Коннахта чи то з Муму, графство Лімерік), то їх шестеро дітей (всі сини) були здорові. Складіть родовід. Який можливий спосіб успадкування глухоти? Поясніть, чому в останньому шлюбі всі діти були здорові?

**Задача № 46.** Японська рослина *Pharabitis nil* може мати сині або пурпурні квіти. Схрестили дві чисті лінії рослин з пурпурними квітами. У першому поколінні всі рослини були з синіми квітами. Коли схрещували рослини в рамках однієї

чистої лінії, то завжди одержували рослини тільки з пурпурними квітами. Поясніть отримані результати.

**Задача № 47.** Схрестили самку морської свинки чорну з грубою шерстю з самцем – альбіносом з тонкою шерстю. У першому поколінні всі морські свинки були чорними з грубою шерстю. У другому поколінні одержали 20 – чорних грубошерстих, 6 чорних тонкошерстих, 7 – альбіносів грубошерстих, 2 – альбіноси тонкошерсті. Потім взяли самку з першого покоління і схрестили з батьком альбіносом тонкошерстим. Отримали: 5 – чорних грубошерстих, 6 – чорних тонкошерстих, 4 – альбіноси грубошерсті, 7 – альбіноси тонкошерсті. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 48.** Схрестили самку дрозофіли жовту з редукованими крилами і самця сірого з нормальними крилами. Отримали у першому поколінні всіх мух крилатих, але самці були жовті, а самки сірі. У другому поколінні одержали мух:

- Крилатих сірих – 61,
- Крилатих жовтих – 63,
- Безкрилих сірих – 22,
- Безкрилих жовтих – 21.

Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 49.** Схрестили самку дрозофіли дикого типу з самцем з чорним тілом, загнутими догори крилами, пурпурними очима. Отримали у першому поколінні мух:

- Чорних, очі пурпурні – 1801
- Загнуті догори крила – 1795
- Чорні, загнуті догори крила – 22
- Пурпурні очі – 23
- Чорні – 50
- Загнуті догори крила, пурпурні очі – 54
- Дикий тип – 1
- Чорні, загнуті догори крила, пурпурні очі – 0

Поясніть отримані результати. Складіть карту 2-ї хромосоми. Розрахуйте коефіцієнт коінциденції і значення інтерференції.

**Задача № 50.** Самку медоносної бджоли (*Apis mellifera*) запліднили трутнем, що розвивається з гаплоїдного яйця. У потомстві у першому поколінні рівно половина яєць виявились не здатними до розвитку. Інші розвивались нормально. Поясніть отримані результати.

**Задача № 51.** У дрозофіли ген редукованих крил (*vg*) розташований в аутосомі. Ген жовтого забарвлення тіла (*y*) також рецесивний, але зчеплений зі статтю. Якщо гомозиготну по цим генам самку схрестити з нормальним самцем, то яке буде розщеплення в першому і другому поколіннях ?

**Задача № 52.** Дрозофіла, жовта самка з редукованими крилами, дві X-хромосоми зв'язані одною центромерою. Яких нащадків слід очікувати від схрещування з нормальним самцем?

**Задача № 53.** Півень гетерозиготний по зчепленій зі статтю рецесивній леталі. Яке співвідношення статей серед нащадків такого півня з нормальними курками?

**Задача № 54.** Іноді у курей яйники не розвиваються або не функціонують, а замість них розвиваються сім'яники. У деяких з таких "псевдопівнів" з перевизначеною статтю можуть бути курчата. Якого типу нащадків можна чекати від схрещування таких півнів з нормальними курками? Яке буде співвідношення статей серед нащадків з врахуванням того, що яйця з генотипом WW не здатні до розвитку?

**Задача № 55.** У деяких тропічних риб, таких як меченосці і гуппі, в деяких лініях гетерогаметними бувають самці, а в інших – самки. В диких лініях самки часто бувають типу XX, а самці – XY. В деяких акваріумних лініях самки мають генотип ZW, а самці ZZ. При перехресних схрещуваннях можна отримати самців з комбінаціями статевих хромосом типу ZZ, XZ, XY, YY, а самок з комбінаціями XX, XW, ZW, YW. Яке буде співвідношення статей в наступуючих типах схрещування:

- А) самки XX х самці ZZ;
- Б) самки ZW х самці XZ;

В) самки XW x XZсамці?

**Задача № 56.** Існують чотири фенотипічних класи жуків-листоїдів *Phylodecta variabilis*, що відрізняються забарвленням надкриль – смугастий, жовтий, червоний і чорний. Всі чотири фенотипи визначаються алелями одного гена:  $e^l$  – смугастий фенотип,  $e^y$  – жовтий фенотип,  $e^r$  – червоний фенотип,  $e^b$  – чорний фенотип. Характер домінування серед цих алелей можна описати так:  $e^b > e^r > e^y > e^l$ . Гени розташовані в статевих хромосомах, причому всі чотири алеля можуть бути локалізовані як в X так і в Y хромосомі. Смугастий фенотип дуже рідко зустрічається у самців (0,5% всіх самців) і широко поширений у самок (59 % всіх самок). Як ви можете пояснити цей факт?

**Задача № 57.** При схрещуванні смугастої самки *Phylodecta variabilis* з жовтим самцем в F1 виявлено 13 смугастих самок і 11 жовтих самців. У F2 всі самки (31) були смугасті, а всі самці (29) – жовті. Які генотипи батьків і нащадків в F1 і F2? Використайте метод “хі-квадрат” для перевірки вашої гіпотези.

**Задача № 58.** Припустимо, що вам невідома стать особин в поколіннях F1 і F2 з минулої задачі. Чи могли б такі результати вийти, якби ген забарвлення надкриль не був зчеплений зі статтю? Використайте метод “хі-квадрат” для перевірки гіпотези про незчеплення зі статтю даного гену вже з врахуванням статевої належності особин.

**Задача № 59.** При схрещуванні червоної самки *Phylodecta variabilis* з червоним самцем серед нащадків виявилось 15 жовтих самок, 15 червоних самок і 34 червоних самця. При зхрещуванні окремих жовтих самок з покоління F1 з окремими червоними самцями з того ж покоління співвідношення фенотипів серед нащадків виявилось серед різних зхрещувань різним: в половині зхрещувань всі самці і самки серед нащадків були червоними, а в іншій половині самці мали червоне забарвлення, а самки приблизно в рівному числі були жовтими і смугастими. Які імовірні генотипи батьків?

**Задача № 60.** У рослини *Ecballium elaterium* однодомні (гермафродитні) рослини класифікують як варіант *elaterium*, а

дводомні (чоловічі і жіночі) – як варіант dioicum. Гермафродитизм визначається геном  $a^+$ , чоловічі рослини – геном  $a^D$ , жіночі – геном  $a^d$ , причому домінування відбувається по схемі:  $a^D > a^+ > a^d$ . Які будуть результати схрещувань:

- dioicum (ж) X dioicum (ч)
- elaterium X elaterium
- elaterium X dioicum (ч)
- dioicum (ж) X elaterium?

**Задача № 61.** Миші, гомозиготні по мутантному алелю альбінізма  $c^e$  – білі, але з нормальними темними очима. В особин, гомозиготних по алелю  $p$  іншого гена, очі рожеві. Проводилось аналізуюче схрещування між мишами з генотипом  $c^e + / + p$  та мишами, гомозиготними по обох мутаціях, результати :

Білі, очі темні	240
Білі, очі рожеві	31
Темні, очі темні	31
Темні, очі рожеві	264

Яка частота рекомбінації ? Яка відстань між цими генами на хромосомі ?

**Задача № 62.** Схрестили двох чебурашок. Обидва були з великими вухами, забарвлення коричневого, агуті. В першому поколінні одержали :

п/п	Фенотипи	Кількість нащадків
1	З великими вухами, агуті, коричневі	6
2	З великими вухами, альбіноси	6
3	З великими вухами, рівномірно забарвлені, коричневі	3
4	З малими вухами, агуті, коричневі	2
5	З малими вухами, альбіноси	1
6	З малими вухами, рівномірно забарвлені, коричневі	1
7	Без вух, зелені, з великими зубами, довгим хвостом, стерильні	1

Поясніть отримані результати. Які генотипи в батьків і в першому поколінні у всіх особин? Перевірте правильність вашої гіпотези методом “хі-квадрат”.

**Задача № 63.** Схрестили двох чебурашок: самця альбіноса з чорною самкою. В першому поколінні одержали: 6 сірих самців і 5 сірих в білу крапочку самок.. У другому поколінні отримали чебурашок:

- 3 – чорних,
- 3 – чорних в білу крапочку,
- 6 – сірих,
- 7 – сірих в білу крапочку,
- 5 – білих.

Стать не визначали. Поясніть отримані результати. Перевірте правильність вашої гіпотези методом “хі-квадрат”.

**Задача № 64.** Проводили схрещування рослин томату, гетерозиготних по рецесивних мутаціях, що викликають карликовість (dwarf) та опушеність плодів (pubescent). Нормальні алелі цих генів викликають високий ріст рослин і гладкість плодів. Результати першого схрещування:

Високі, гладкі	325
Високі, опушені	8
Карликові, гладкі	9
Карликові, опушені	118

Аналогічне схрещування інших рослин томату, гетерозиготних по тим же алелям, дало слідуючі результати:

Високі, гладкі	207
Високі, опушені	102
Карликові, гладкі	105
Карликові, опушені	14

Чому два схрещування дали різні результати? Визначте частоту рекомбінації і генетичну відстань між цими двома генами.

**Задача № 65.** Самки дрозофіли, що належать до лінії з вкороченими крилами (dumpy), схрещувались з самцями, в яких відсутні щетинки (spineless) Покоління F1 всі мухи мали нормальний фенотип. В поколінні F2 з 1000 мух 49 мали короткі

крила і були позбавлені щетинок. В другому експерименті короткокрилих самок схрещували з самцями лінії brown (коричневі очі). В поколінні F1 всі мухи володіли нормальним фенотипом, а в поколінні F2 з 3000 мух не було ні одої з короткими крилами і коричневими очима. Поясніть характер зчепленості цих трьох генів.

**Задача № 66.** Ген echinus (ec) зумовлює у дрозофіл збільшення очних фасеток, а ген cut (ct) - аномалію в морфології крила (обрізаний край). Самки гомозиготні по ec, схрещувались з самцями, гомозиготними по ct. В поколінні F1 всі самки були дикого типу, а самці - типу echinus. Розподіл фенотипів в поколінні F2 представлений в таблиці.

Фенотип	Число мух
Самки з аномалією очей	490
Самки дикого типу	510
Самці з аномалією очей	420
Самці з аномалією крил	434
Самці з аномалією очей і крил	70
Самці дикого типу	76

а) Чи зчеплені гени echinus і cut?

б) Чи локалізовані ці гени в аутосомі?

в) Яка частота рекомбінації між ними?

г) Напишіть формулу генотипу для кожного класу особин, що спостерігається в потомстві.

**Задача № 67.** Коричневий колір очей у дрозофіл викликають багато мутацій. До цих мутацій належать мутації clot (cl) і safranin (sf). Провели схрещування самок дикого типу гетерозиготних по цих двох мутаціях з самцями з коричневими очима гомозиготними по цих мутаціях:

Отримали результати:

Фенотип нащадків	Число мух
Коричневі очі	73
Очі дикого типу	27

Чи зчеплені ці дві мутації?

**Задача № 68.** Проводили визначення зчепленості мутацій clot і safranin з мутацією crinkled (ck), що обумовлює розвиток

гофрованих крил. Провели два схрещування і отримали результати:

1) Схрестили самку дикого типу з самцем гомозиготним по мутаціях *clot* і *crinkled*. Отримали:

F1 : Коричневі очі	300
Гофровані крила	340
Коричневі очі і гофровані крила	182
Дикий тип	183

2) Схрестили самку дикого типу з самцем гомозиготним по мутаціях *safranin* і *crinkled*. Отримали:

F1: Коричневі очі	400
Гофровані крила	430
Коричневі очі і гофровані крила	93
Дикий тип	92

Визначить, чи зчеплені якийсь із цих генів. При позитивній відповіді запропонуйте взаємне розташування генів і відстань на генетичній карті.

**Задача № 69.** У кроликів домінуючий ген *B* відповідальний за чорний пігмент хутра, а рецесивний ген *b* – за коричневий пігмент. Два алеля локуса альбінізму *chinchilla* ( $c^{ch}$ ) і *himalayan* ( $c^h$ ) впливають на розподіл пігменту в хутрі. Кроликів чистої лінії чорних шиншил схрестили з чистою лінією коричневих гімалайських. Отримали результати: в F1 всі кролики були чорними шиншилами. Потім кроликів з F1 схрестили з коричневими гімалайськими. Отримали результати:

Чорні шиншили	244
Коричневі шиншили	134
Чорні гімалайські	109
Коричневі гімалайські	233

Яке зчеплення між генами? Яка відстань між локусом пігменту і локусом альбінізму якщо ці гени зчеплені?

**Задача № 70.** Домінуюча мутація *Antennapedia* (*Antp*) в третій хромосомі дрозофіли перетворює вусики в кінцівки, домінуюча мутація *Stubble* (*Sb*) викликає вкорочення щетинок,



рецесивна мутація *gony* (*gy*) обумовлює червоно-коричневий колір очей. Проводили схрещування самки з додатковими кінцівками, короткими щетинками з самцем з червоно-коричневими очима.

Отримали результати:

№ п/п	Фенотип нащадків	Кількість нащадків
1	Додаткові кінцівки	1140
2	Короткі щетинки, Червоно-коричневі очі	1078
3	Дикий тип	58
4	Додаткові кінцівки, Короткі щетинки	70
5	Червоно-коричневі очі	110
6	Короткі щетинки	2
7	Додаткові кінцівки, Короткі щетинки, Червоно-коричневі очі	43

Визначте послідовність розташування мутантних генів, частоту рекомбінації і відстань між цими генами на генетичній карті. Розрахуйте коефіцієнт коінцидентії і інтерференцію.

**Задача № 71.** Домінантна мутація *Lyra* (*Ly*) в третій хромосомі дрозофіли приводить до виникнення вузьких, ліроподібних крил (ця мутація знаходиться по іншу сторону від центромери відносно мутації *Antp*). Проводили схрещування самок з додатковими кінцівками, ліроподібними крилами і короткими щетинками з самцями дикого типу. Отримали результати:

№ п/п	Фенотип нащадків	Число мух
1	Додаткові кінцівки	851
2	Ліроподібні крила, короткі щетинки	823
3	Додаткові кінцівки, короткі щетинки	73
4	короткі щетинки	42

5	Ліроподібні крила	77
6	Ліроподібні крила, додаткові кінцівки	18
7	Додаткові кінцівки, ліроподібні крила, короткі щетинки	6
8	Дикий тип	6

Визначіть послідовність цих генів на хромосомній карті, частоти рекомбінацій і відстань між генами на хромосомній карті. Розрахуйте коефіцієнт коіциденції і значення інтерференції. Порівняйте значення інтерференції, що спостерігалось в минулій задачі при цьому зхрещуванні. Як ви поясните ці спостереження?

**Задача № 72.** Один розсіяний студент визначав положення на карті третьої хромосоми трьох мутацій, а саме *gouy* (червоно-коричневі очі), *groucho* (щетинки над очима зібрані в пучки) та *ebony* (чорне тіло). Нажаль. Він забув записати генотипи батьківських мух. Тому він взяв самок з F1, які всі були дикого типу і поставив аналізуюче схрещування з самцями, гомозиготними по всім трьом мутаціям. Отримав результати:

№ п/п	Фенотип нащадків	Число мух
1	Дикий тип	51
2	Пучки щетинок	144
3	Чорні	54
4	Червоно-коричневі очі	10
5	Червоно-коричневі очі, чорні	130
6	Пучки щетинок, червоно-коричневі очі	43
7	Пучки щетинок, чорні	7
8	Чорні, пучки щетинок, червоно-коричневі очі	61

Який генотип самок дикого типу з покоління F1? Визначте послідовність генів на хромосомній карті і відстань між генами, коефіцієнт коіциденції і значення інтерференції.

**Задача № 73.** Послідовність передачі генів у різних Hfr штамів *E. coli* різна. Дослідили кілька штамів, у яких наявні гени A, B, C, D, E. Послідовність передачі генів при кон'югації виявилась слідуєчою:

1 штам	A C E
2 штам	D B E
3 штам	E B D
4 штам	C A D

Побудуйте фізичну карту бактеріального генома.

**Задача № 74.** Для визначення взаємного розташування декількох ауксотрофних мутацій *E. coli* проводили дослід по перерваній кон'югації між прототрофним штамом **Hfr Str<sup>S</sup>** та штамом **F<sup>-</sup>, A<sup>-</sup>, B<sup>-</sup>, D<sup>-</sup>, Str<sup>R</sup>**. В якості селективного маркеру використовували стійкість до стрептоміцину та прототрофність по D. Отримали результати:

Генотип колоній	Доля колоній
<b>D<sup>+</sup> Str<sup>R</sup></b>	<b>D<sup>+</sup> Str<sup>R</sup> (%)</b>
A <sup>+</sup> B <sup>+</sup>	22
A <sup>-</sup> B <sup>+</sup>	10
A <sup>-</sup> B <sup>-</sup>	68
A <sup>+</sup> B <sup>-</sup>	0

Визначте розташування генів A та B відносно D, вважаючи, що **D<sup>+</sup>** передається при зхрещуванні останнім.

**Задача № 75.** Зхрещували F<sup>-</sup> штам з Hfr штамми. Отримали для різних штамів порядок переносу генів:

H	O – thr – leu – ari – ton – pro – lac – ade
4	O – thi – met – ile – mtl – xyl – mal – str
5	O – ile – met – thi – thr – leu – azi – ton
AB311	O – his – trp – gal – ade – lac – pro – ton
AB313	O – mtl – xyl – mal – str – his

На основі цих даних складіть фізичну карту бактеріальної хромосоми.

**Задача № 76.** Запропонуйте два способи визначення того, чи належить відібрана після схрещування Hfr та F<sup>-</sup> штамів рекомбінантна колонія типу F<sup>+</sup> чи F<sup>-</sup> типу.

**Задача № 77.** Бактеріальні клітини одночасно заражували різними мутантними фагами. В одних випадках виникали нащадки фагів у вигляді негативних колоній (+) при непермісивних умовах, в інших випадках не виникали. Результати тесту слідуючі:

	Ts1	Ts2	Ts3	Ts4	Ts5	Ts6
Ts1	-	-	+	+	+	+
Ts2	-	-	+	+	+	+
Ts3	+	+	-	+	-	+
Ts4	+	+	+	-	+	+
Ts5	+	+	-	+	-	+
Ts6	+	+	+	+	+	-

Розподіліть мутації по групах комплементатії.

**Задача № 78.** У подружжя, зір кожного з яких нормальний, четверо дітей – 2 дочки і 2 сини. Перша дочка має нормальний зір. Вона має 3 сини, два з них дальтоніки. Друга дочка має нормальний зір, має 5 синів – зір у всіх нормальний. Перший син – дальтонік. Має 2 дочки і 2 синів (у всіх нормальний зір). Другий син має нормальний зір, має 4 сини – всі з нормальним зором. Які генотипи дідуся, бабусі, всіх дітей, їх подружніх пар і онуків? Складіть родовід.

**Задача № 79.** Якщо жінка, батько якої страждав на гемофілію, вийшла заміж за здорового чоловіка, то яка імовірність того, що у її дитини буде гемофілія? Припустимо тепер, що батько чоловіка також був хворий на гемофілію; яка імовірність в цьому випадку? Складіть родовід.

**Задача № 80.** В одній сім'ї зафіксоване спадкове захворювання, при якому у віці між 10-а та 20-а роками починається атрофія дистальних відділів м'язів ніг. Вивчення родоводу показало: Мати хворої дитини (хлопчика) страждала на це ж захворювання. Батько хворої дитини був здоровий, любив носити жовту краватку, курити гаванські сигари. Він мав позашлюбний зв'язок від якого мав двох дітей – хлопчика і дівчинку які були здорові. Бабуся хворої дитини (мати матері)

була здорова, але була у молодості феміністкою і мала від першого шлюбу ще двох дітей – хлопчика і дівчинку, які були здоровими. Дідусь (батько матері) був джентельменом і був хворим на це ж захворювання. Від першого шлюбу він мав одного хворого сина, що помер у дитинстві у віці 12 років. Крім того від цього шлюбу була була 1 мертвонароджена дитина і один медичний аборт. Прадідусь (батько дідуся) був дрібним комерсантом (торгував гудзиками, потім мав невелику тютюнову крамницю) був хворим і був одружений на двоюрідній сестрі. Його батько служив у армії Наполеона Бонапарта, був нагороджений орденом Почесного Легіона, з боями дійшов до Варшави, відзначився в битві під Лейпцігом. Його батько був піратом у карибському морі на шхуні “Веселий Роджер”, за жорстокість був висаджений на безлюдний острів. Де прожив 10 років і навчив папугу розмовляти французькою мовою. Скласти родовід папуги. Скласти родовід сім’ї. Які генотипи всіх родичів? Який механізм успадкування цього захворювання?

**Задача № 81.** В одній сім’ї зафіксована важка форма міодистрофії. У хворій дитини – хлопчика – обидва батьки здорові. Здорові були і брат і сестра хворій дитини. Здорові були і двоюрідні брат і сестра хворій дитини (діти сестри батька). Бабусі хворій дитини були рідними сестрами і були здоровими. Прадід (дід матері) крім 2-ох здорових дочок мав ще одного хворого сина і одну хвору дочку від цього ж шлюбу. Прабабуся (бабуся матері) мала ще одну дитину (♂) від позашлюбного зв’язку, яка була здоровою. Прадід від першого шлюбу мав ще 2-ох дітей (сина і дочку, які були здорові). Двоє його онуків від першого шлюбу, що були двоюрідними братом і сестрою одружилися і мали двох здорових дітей – сина і дочку. Який механізм успадкування цієї хвороби? Складіть родовід. Які генотипи всіх родичів?

**Задача № 82.** Двох мух *Drosophila melanogaster* – самця і самку з формою крила *Dichaete* схрестили. Отримали у першому поколінні – 59 мух з формою крила *Dichaete* і 31 муху з нормальними крилами. При схрещуванні мухи *Dichaete* з

нормальним мухом отримали 43 мухи з формою крила *Dichaete* і 47 мух з нормальними крилами. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом “хі-квадрат”.

**Задача № 83.** Самку дрозофіли з білими очима схрестили з самцем дрозофіли з білими очима. З 100 000 самців серед нащадків таких схрещувань лише 2 були з очима дикого типу. Яка відстань між локусами  $w^a$  і  $w^{bf}$  гена *white* на генетичній карті?

**Задача № 84.** Альбінізм у людини обумовлений гомозиготністю по аутосомному рецесивному гену. В Англії описаний випадок, коли у подружжя-альбіносів народилось троє дітей з нормальною пігментацією. Як це можна пояснити?

**Задача № 85.** У людей відомо три генотипи по локусу *PGM1* і два алелі цього локусу – *A* і *a*. Обстежили 1110 чоловік і виявили, що число особин з різними генотипами становить:

$AA - 634, Aa - 391, aa - 85$

Визначте частоти генотипів і частоти алелей.

**Задача № 86.** Схрестили безрогого козла з рогатою козою. У першому поколінні отримали всіх козликів рогатих, а всіх кізочок безрогих. У другому поколінні отримали самців – 7 рогатих і 2 безрогих, самок – 3 – рогатих і 8 безрогих. Взяли безрогу козу з другого покоління і схрестили з рогатим козлом з другого покоління. Отримали в третьому поколінні самців - 4 рогатих і 3 безрогих, самок – 6 – безрогих. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 87.** Схрестили самку дрозофіли з кривавими очима з самцем з абрикосовими очима. Отримали у першому поколінні 35 самок з кривавими очима, 33 самки з вишневими очима, 30 самців з кривавими очима і 35 самців з вишневими очима. Взяли з першого покоління самку з кривавими очима і схрестили з самцем з першого покоління з вишневими очима. Отримали у другому поколінні 52 самки з кривавими очима, 50 – самок з вишневими очима, 54 самці з кривавими очима, 56 самців з абрикосовими очима. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 88.** Схрестили рудого півня з білою куркою. У першому поколінні одержали: півників – 25 рудих і 24 білих, курочок – 12 – рудих і 11 білих. Взяли білого півня з першого покоління і схрестили з рудою куркою з першого покоління. Одержали у другому поколінні : півників – 20 рудих і 21 білого, курочок – 10 рудих і 9 білих. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 89.** Пробанда цікавить, чи він не полісіє. Пробанд має трьох сибсів: двох лисих братів і патлату сестру. Мама пробанда була лиса, тато патлатий. Тато мав двох братів – лисого і патлатого і патлату сестру. Дід (тато батька) був лисий, бабуся (мама батька) – патлата. Всі прадідусі і прабабусі – патлаті. Мама пробанда мала патлату сестру, одного лисого брата, одного патлатого брата. Дід (батько матері) був лисий, мама – патлата. По материнській лінії теж всі прадідусі і прабабусі були патлаті. Складіть родовід. Які генотипи всіх родичів? Складіть прогноз для пробанда.

**Задача № 90.** У Нігерії у племені догон одружився чоловік з брахідактилією (з вкороченими фалангами окремих пальців) на жінці, що теж мала брахідактилію. У них народилося 3 здорових дітей, 4 дітей з брахідактилією і ще 2 дітей померли у віці 1 місяць (будова фаланг пальців у них не дослідили). Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 91.** Схрестили самку дрозофіли з медовими очима з самцем дрозофіли з очима кольору слонової кістки. Отримали в першому поколінні 41 самця з медовими очима, 45 самців з пурпурними очима, 44 самки з медовими очима, 40 самок з пурпурними очима. Взяли з першого покоління самку з пурпурними очима і самця з медовими очима і схрестили. Отримали в другому поколінні 102 самці з пурпурними очима, 105 самців з очима кольору слоннової кістки, 220 самок з медовими очима. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 92.** Серед 1100 жителів Токію, досліджених на групи крові M, MN, N мали ці групи крові відповідно: 356, 519,

225 чоловік. Розрахуйте частоти алелей і теоритично очікувані у відповідності з законом Харді-Вайнберга частоти генотипів. Використовуючи критерій  $\chi^2$ , визначте чи достовірно відрізняються теоритично очікувані і спостережені частоти?

**Задача № 93.** Гаптоглобіни двох типів, присутні у сироватці крові людини, визначаються алелями одного локусу. Серед обстежених 219 жителів Єгипту число людей з різними генотипами було слідуючим:  $h_1/h_1 - 9$ ,  $h_1/h_3 - 135$ ,  $h_3/h_3 - 75$ . Які частоти зустрічі цих двох алелей?

**Задача № 94.** Рослини, гомозиготні по домінантному алелю (AA) опромінили рентгенівськими променями дозою 5 Гр, а потім схрестили з рослинами гомозиготними по рецесивному алелю (aa). Три з 400 рослин у першому поколінні мали рецесивний фенотип. Поясніть отримані результати.

**Задача № 95.** Муковісцидоз – аутосомно-рецесивне захворювання. Частота появи новонароджених з муковісцидозом – 4 на 10 000. Виходячи із закону Харді-Вайнберга, розрахуйте частоти всіх трьох генотипів у новонароджених.

**Задача № 96.** У *Escherichia coli* частота мутацій, що обумовлюють перетворення штаму з непотребуючого гістидин у ростучий тільки в присутності гістидину і частота зворотніх мутацій оцінюється величинами:

$$his^+ \rightarrow his^- \quad (2 \times 10^{-6})$$

$$his^- \rightarrow his^+ \quad (4 \times 10^{-8})$$

Припустимо, що ніяких інших процесів в популяції не відбувається. Розрахуйте рівноважні частоти обох алелей.

**Задача № 97.** У одній лінії дрозофіл виявлена домінантна летальна у гомозиготі мутація M, що викликає розвиток тонких щетинок, приповільнення розвитку. Коли мух – носіїв цієї мутації – схрещували з мухами, що гомозиготні по мутації rose, що обумовлює рожевий колір очей, то рожеві очі успадковувались половиною нащадків. Аналогічно, коли мух – носіїв мутації – схрещували з мухами, гомозиготними по рецесивній мутації tilt, то характерний для цієї мутації фенотип теж проявлявся у половини нащадків. Відстань між генами rose і



tilt складає 5,2 см. Яка найбільш вірогідна природа нової мутації?

**Задача № 98.** У третій хромосомі дрозофіли локалізовані рецесивні мутації *bithoraxoid* (*bxd*), що викликає подвоєння грудей, і *ebony* (*e*), що обумовлює чорний колір тіла. Домінантна мутація *Contrabithorax* (*Cbx*) дуже тісно зчеплена з *bxd*, так, що в мейозі вони розходяться майже завжди разом. Лінію дрозофіл *bxd e / bxd e* опромінили проміннями Рентгена. У цій лінії виник зчеплений домінантний супресор *Su (bxd)*, що подавлює прояв гену *bxd* і не має ніяких інших фенотипічних проявів. Самців *ebony*, що були гомозиготні також по *bxd* і *Su (bxd)*, схрещували з самками, що гомозиготні по *Cbx*. Самок з першого покоління від цього схрещування включили в аналізуюче схрещування з самцями типу *bxd e / bxd e*. Нашадки  $Cbx^{+}$ , які також повинні бути гомозиготними по гену *bxd* були слідуючі:

Бігораксоїдні, чорні - 156

Бігораксоїдні - 72

Чорні - 256

Дикий тип - 9

Визначте послідовність розташування генів, частоти рекомбінацій і генетичні відстані. Чому враховувались тільки чотири фенотипічних класи, а не всі вісім?

**Задача № 99.** *Drosophila melanogaster* і *Drosophila simulans* – близькі види, що здатні схрещуватись і давати нащадків, хоча стерильних. У обох видів відомі мутації, що мають однаковий фенотипічний прояв. Той же фенотип проявляється серед гібридних нащадків при схрещуванні ідентичних мутантів різних видів. З чотирьох мутантних генів, що відомі для обох видів, два рецесивні – *scarlet* (*st*) і *peach* (*p*) і два домінантні – *Hairless* (*H*) і *Delta* (*Dl*). Останні два гени являють собою рецесивні леталі для обох видів. Провели схрещування і отримали результати:

P: ♀ + H Dl + / st + + p X ♂ st + + p / st + + p

F<sub>1</sub>

N	Фенотип нащадків	Число мух melanogaster	Число мух simulans
1	H Dl	400	320
2	st p	432	330
3	p	18	69
4	st H Dl	17	75
5	st	0	181
6	H Dl p	1	181
7	H p	2	7
8	st Dl	2	11
9	Dl	10	3
10	st H p	14	0
11	Dl p	0	0
12	st H	0	1
13	Дикий тип	85	41
14	st H Dl p	91	29
15	H	0	3
16	st Dl p	1	1
Всього		1070	1252

Побудуйте карти гомологічних хромосом обох видів. Що означають отримані результати?

**Задача № 100.** У гаплоїдній плісняви *Neurospora crassa* відомі два типи схрещуваності – А і а. Утворення аску відбувається тільки при злитті ядер різних типів. У мейозі типи схрещуваності ведуть себе подібно до алелів одного гену і розходяться у різні аскоспори. Провели схрещування і отримали результати:

Положення спори у аску								Число асків
1	2	3	4	5	6	7	8	
A	A	A	A	a	a	a	a	105
a	a	a	a	A	A	A	A	129
A	A	a	a	A	A	a	a	9
a	a	A	A	a	a	A	A	5

A	A	a	a	a	a	A	A	11
a	a	A	A	A	A	a	a	14

Визначте відстань на генетичній карті від центромери до локуса, що визначає тип схрещуваності.

**Задача № 101.** Схрестили сіру самку дрозофіли з жовтим самцем. Отримали в першому поколінні: самок – 204 жовтих і 210 сірих, самців: 194 жовтих і 1 сірого. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 102.** Проводили схрещування акваріумних риб лебістусів. Схрестили самку темнозбарвлену з прозорим спинним плавцем з самцем світлозбарвленим з плямою на спинному плавці. Отримали в першому поколінні:

Самок

Темних з прозорим спинним плавцем – 34

Світлих з прозорим спинним плавцем – 36

Самців

Темних з плямою на спинному плавці – 35

Світлих з плямою на спинному плавці – 37

Взяли з першого покоління самця темного з плямою на спинному плавці і схрестили з самкою світлою з прозорим спинним плавцем. Отримали в другому поколінні:

Самок

Темних з прозорим спинним плавцем – 42

Світлих з прозорим спинним плавцем – 45

Самців

Темних з плямою на спинному плавці – 48

Світлих з плямою на спинному плавці – 44

Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 103.** Схрестили двох жовтих мишей з темними очима. Отримали в першому поколінні 30 мишенят жовтих з темними очима, 11 жовтих з червоними очима, 16 чорних з темними очима, 5 чорних з червоними очима. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 104.** Схрестили півника з довгими ногами і простим гребенем з куркою з короткими ногами і гороховидним

гребенем. Отримали в першому поколінні: курочок – 11 короткими ногами і гороховидним гребенем, 12 з довгими ногами і гороховидним гребенем, півників - 10 короткими ногами і гороховидним гребенем, 13 з довгими ногами і гороховидним гребенем. Взяли з першого покоління курочку з короткими ногами і гороховидним гребенем і схрестили з півником з короткими ногами і гороховидним гребенем. Отримали в другому поколінні: курочок – 31 з короткими ногами і гороховидним гребенем, 9 - з короткими ногами і простим гребенем, 16 з довгими ногами і гороховидним гребенем, 5 з довгими ногами і простим гребенем; півників - 32 з короткими ногами і гороховидним гребенем, 10 - з короткими ногами і простим гребенем, 17 з довгими ногами і гороховидним гребенем, 6 з довгими ногами і простим гребенем. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом  $\chi^2$ .

**Задача № 105.** Схрестили самку дрозофіли з довгими крилами, з білими очима, жовту з самцем з зачатковими крилами, з червоними очима, сірим. Отримали в першому поколінні всіх самок: з довгими крилами, з червоними очима, сірих, всіх самців: з довгими крилами, з білими очима, жовтих. У другому поколінні обержали:

Самок:

З довгими крилами, червоними очима, сірих – 302

З довгими крилами, білими очима, жовтих – 304

З короткими крилами, червоними очима, сірих – 105

З короткими крилами, білими очима, жовтих – 110

З короткими крилами, білими очима, сірих – 1

Самців:

З довгими крилами, червоними очима, сірих – 306

З довгими крилами, білими очима, жовтих – 308

З короткими крилами, червоними очима, сірих – 100

З короткими крилами, білими очима, жовтих – 104

З короткими крилами, білими очима, сірих – 2

Поясніть отримані результати.

**Задача № 106.** Відомо, що пептид складається з 6 амінокислот: Gly, His, Ala, Lys, Met, Trp. Але порядок їх розташування у пептидному ланцюгу невідомий. При хімічному розщепленні пептиду експериментатору вдалось ідентифікувати три слідуючих триплетних продукти деградації:

- 1) Met- His- Trp
- 2) Lys- Ala- Gly
- 3) Gly- Met- His

1. Яка амінокислотна послідовність цього пептиду?

**Задача № 107.** Розрахуйте число різних білків (різних по амінокислотній послідовності), яке може бути закодоване трьома генами, що містять 30, 300, 3000 пар нуклеотидів.

**Задача № 108.** Відомо, що кров хворих, що страждають на гемофілію зчеплену з X хромосою в пробірці згортається значно повільніше, ніж кров здорових людей. При обстеженні одного хворого N. Виявилось, що його кров погано згортається в пробірці. Це навело на думку, що він хворий на гемофілію. Але при змішуванні крові цього хворого з кров'ю іншого гемофіліка спостерігалось швидке утворення згустку так само як у здорової людини. Запропонуйте інтерпретацію цього феномену.

**Задача № 109.** Проводили вивчення трьох незалежно отриманих ауксотрофних мутантів Neurospora з тим, щоб визначити які проміжні метаболіти можуть поповнити потреби кожного з цих штамів у метіоніні. У наведеній нижче таблиці знаком “+” відмічена здатність кожного штаму рости на мінімальному середовищі з додаванням даної речовини, а знаком “-“ відсутність росту в цих умовах.

Мутант	Метіонін	Гомосерин	Гомоцистеїн	Цистатіонін
1	+	-	+	-
2	+	-	-	-
2	+	-	+	+

Розставте ці речовини в тому порядку, в якому вони повинні розташовуватись на шляху біосинтезу метіоніну.

**Задача № 110.** Зустрічаються соматичні клітини, число хромосом в яких відрізняється від числа хромосом у більшості

інших соматичних клітин. У людини, наприклад, деякі клітини мають 92 хромосоми. Як виникають такі клітини?

**Задача № 111.** У дрозофіли існує багато рецесивних мутацій, що обумовлюють стерильність самок, зокрема це мутації *dunce* і *diminutive*. Вони зчеплені зі статтю і на карті розташовані дуже близько одна від одної. Продумайте постановку досліда, що дозволив би визначити, чи алельні ці мутації.

**Задача № 112.** На одній фермі було 100 биків і 400 корів, яких використовували для отримання потомства. На сусідній фермі було 500 корів, і всі вони штучно запліднюються спермою одного бика. Яка ефективна чисельність популяцій?

**Задача № 113.** В одній популяції частота дальтонізму складає серед чоловіків 0,08. Цей дефект обумовлений зчепленим зі статтю рецесивним алелем. Які очікувані частоти трьох генотипів серед жінок?

**Задача № 114.** Найбільш поширену форму гемофілії викликає зчеплений зі статтю алель, частота якого в популяції складає 0,0001. Які теоритично очікувані частоти двох можливих генотипів у чоловіків і трьох у жінок?

**Задача № 115.** Хвороба Тея-Сакса обумовлена аутосомним рецесивним алелем. Характерні симптоми цієї хвороби – розумова відсталість і сліпота; смерть настає у віці чотирьох років. Частота захворювання серед новонароджених складає 10 на 1 млн. Виходячи з закону Харді-Вайнберга, розрахуйте частоти алеля і гетерозигот.

**Задача № 116.** Акаталазія – захворювання, що викликається рецесивним геном; вперше виявлено в Японії. У гетерозигот по цьому гену спостерігається знижений вміст каталази у крові. Частота гетерозигот складає 0,009% серед населення Хіросіми і 1,4% серед іншого населення Японії. Виходячи з рівноваги Харді-Вайберга, розрахуйте частоту алеля в Хіросімі і в іншій частині Японії.

**Задача № 117.** У кукурудзи 10 пар хромосом, і можна отримати всі 10 можливих типів трисоміків. Нехай всі 10 типів трисоміків гомозиготні по певному домінантному алелю А, а

нормальна диплоїдна лінія гомозиготна по рецесивному алелю а. Яким чином довідатись, в якій хромосомі локалізований ген А?

**Задача № 118.** Одна тетраплоїдна рослина утворює в мейозі виключно виключно біваленти, причому всі чотири гомологічні хромосоми беруть участь у кон'югації з однаковою імовірністю. Яке буде розщеплення в поколінні  $F_2$  від схрещувань АААА X аааа?

**Задача № 119.** Схрестили мишу альбіноса з самцем миші забарвлення коричневе агуті. В першому поколінні всі мишенята були чорні агуті. В другому поколінні отримали 271 мишенятко чорних агуті, 92 коричневих агуті, 90 чорних рівномірно забарвлених, 30 кричневих рівномірно забірвлених, 164 білих. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом Пірсона.

**Задача № 120.** Схрестили мишу забарвлення альбінос з самцем миші забарвлення агуті. Отримали кілька приплодів загальною чисельністю 39 мишенят. З них 19 було забарвлення альбінос, 10 забарвлення агуті і 11 забарвлення чорне. Поясніть отримані результати. Які генотипи батьківського покоління і нащадків? Доведіть правильність вашої гіпотези методом “хі-квадрат”.

**Задача № 121.** Схрестили двох чорних дрозофіл. В першому поколінні всі дрозофіли були сірі. В другому поколінні отримали: 911 сірих дрозофіл і 705 чорних. Поясніть отримані результати. Які генотипи батьківського покоління і нащадків? Доведіть правильність вашої гіпотези методом “хі-квадрат”.

**Задача № 122.** Яке буде розщеплення від схрещування двох дрозофіл – з чистих ліній, одна з яких гомозиготна по мутації black (b), інша – гомозиготна по мутації ebony (e) в першому і другому поколіннях? Гени black та ebony розташовані в різних аутосомах і обумовлюють чорне забарвлення тіла дрозофіли. Схрещування і розведення дрозофіл проводили при температурі 28<sup>0</sup>С. А яке буде розщеплення якщо проводити схрещування і розведення дрозофіл при 18<sup>0</sup>С?

**Задача № 123.** Припустимо, що клітини якогось організму містять по три пари хромосом і кожна хромосома відрізняється від гомологічної однією морфологічною ознакою (наприклад, наявністю чи відсутністю перетяжки біля одного з кінців хромосоми). Скільки різних типів гамет по цій ознаці може бути в такого організму?

**Задача № 124.** Нормальне число хромосом в клітинах людини 46. Скільки хромосом містять: а) сперматозоїди; б) яйцеклітини; в) полярні тільця ?

**Задача № 125.** Нерідко зустрічаються соматичні кліти, число хромосом в яких відрізняється від числа хромосом в більшості інших соматичних клітин. У людини, наприклад, деякі клітини печінки містять по 92 хромосоми. Як виникають такі клітини?

**Задача № 126.** Суспензію бактерій послідовно розводять 1/100, 1/100, 1/50, по 2 мл суспензії з останнього розведення висівають на поверхню трьох чашок Петрі з агаризованим середовищем. Після інкубації на цих чашках Петрі з'явилося 105, 84, 98 бактеріальних колоній. Яка була концентрація бактерій у вихідній культурі?

Ту ж вихідну культуру розведена послідовно 1/100, 1/100, 1/10, наносять по 0,2 мл на поверхню трьох чашок Петрі, що засіяні фагом T2. На чашках виросло 40, 25 і 30 колоній. Яка частота виникнення стійкості до фага T2 бактерій у вихідній культурі?

**Задача № 127.** Деякі ДНК-фаги, наприклад фХ174, містять одну кільцеву молекулу ДНК. Який механізм реплікації їх геному? Виділена з фагу ДНК здатна інфікувати сферопласти E. coli; але розрив навіть однієї фосфодієфірного зв'язку в ДНК дезоксирибонуклеазою позбавляє молекулу ДНК інфекційності. Молекули ДНК того ж фагу, виділені з інфікованих клітин, набагато стійкіші до дезоксирибонуклеази. Чому?

**Задача № 128.** В районі дослідної станції південного полюсу впав метеорит типу вуглецевих хондритів. З його поверхні вдалось виділити вірус Z1 та його господаря.



Продумайте схему дослідю, який дозволить визначити, що є спадковою речовиною вірусу Z1, білок чи ДНК.

**Задача № 129.** Проводили аналізуюче схрещування рослин томату, що гетерозиготні по рецесивним мутаціям, які викликають карликовість (dwarf) і опушеність плодів (pubescens). Нормальні алелі цих генів обумовлюють високий ріст рослин і гладкі плоди. Результаті першого схрещування:

№ п/п	Фенотип	Число рослин
1	Високі, гладкі	161
2	Високі, опушені	5
3	Карликові, гладкі	5
4	Карликові, опушені	118

Аналогічне аналізуючи схрещування іншої рослини томату, що гетерозиготна по тим же алелям, дало наступні результати:

№ п/п	Фенотип	Число рослин
1	Високі, гладкі	7
2	Високі, опушені	138
3	Карликові, гладкі	165
4	Карликові, опушені	4

Чому ці два схрещування дали різні результати? Визначте частоту рекомбінації і генетичну відстань між генами.

**Задача № 130.** У дрозофіли існують багато рецесивних мутацій, що обумовлюють стерильність самок, зокрема це мутації dunce і diminutive. Вони зчеплені зі статтю і на карті розташовані дуже близько одна від одної. Продумайте схему дослідю, що дозволить визначити, чи алельні ці мутації.

**Задача № 131.** Збалансовані летальні лінії зіграли велику роль в розвитку генетики дрозофіли. Вони зробили

можливим конструювання сбалансованих хромосом, що містять множинні інверсії, що блокують кросинговер, рецесивні леталі і гени стерильності самок, а також домінантні мутації, що свідчать про присутність хромосоми в гетерозиготному стані. Так, наприклад, X-хромосома, що позначається як FM7, - це збалансована хромосома, що містить інверсії, мутацію стерильності самок і домінантну мутацію Bar (B), що впливає на форму очей. Поясніть, чому використання збалансованої хромосоми дозволяє необмежено довго зберігати в X-хромосомі летальні та інші шкідливі мутації?

**Задача № 132.** Відомо, що пептид складається з 6 амінокислот: Gly, His, Ala, Lys, Met, Trp. Але порядок їх розташування в пептидному ланцюгу невідомий. При хімічному розщепленні пептиду експериментатору вдалось ідентифікувати три наступних триплетних продукти деградації:

Met-His-Trp

Lys-Ala-Gly

Gly-Met-His

Яка амінокислотна послідовність цього пептиду?

**Задача № 133.** Розрахуйте число різних білків (різних по амінокислотним послідовностям), яке може бути закодоване трьома генами, що містять 30, 300, 3000 пар нуклеотидів.

**Задача № 134.** Відомо, що кров хворих на гемофілію зчеплену з X-хромосомою в пробірці згортається значно повільніше, ніж у здорових людей. При обстеженні одного хворого N виявилось, що його кров погано згортається в пробірці. Це навело на думку, що він хворий на гемофілію. Але при змішуванні крові цього хворого з кров'ю іншого гемофіліка спостерігалось швидке утворення згустку так само як у здорової людини. Запропонуйте інтерпретацію цього феномену.

**Задача № 135.** Що було б, якби Ледеберги шукали доказів спонтанного виникнення стійкості бактеріальних клітин до фагів, досліджуючи стійкість не до фагу T1, а до фагу  $\lambda$ ? До яких висновків відносно мутацій фагостійкості вони б прийшли?

**Задача № 136.** Наступна послідовність основ є частиною структурного гена:

5' TACAAG

3' ATG TTC

Які мутації цього гена може індукувати гідроксиламін ?  
Випішіть послідовність основ двох мутантних генів.

Під дією яких мутагенів можуть ревертувати ці мутантні гени до дикого типу?

Якщо РНК-полімераза в якості матриці використає верхній ланцюг, то які будуть послідовності амінокислот, що кодуються геном дикого типу і мутантними генами?

**Задача № 137.** Послідовність 20 останніх амінокислот в  $\alpha$ - і  $\beta$ -ланцюгах гемоглобіну людини наступна:

$\alpha$ : His-Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-Phe-Leu-Ala-Ser-Val-Ser-Thr-Val-Leu-Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg

$\beta$ : Gln-Ala-Ala-Tyr-Gln-Lys-Val-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Asn-Ala-Leu-Ala-His-Lys-Tyr-His

Використовуючи генетичний код, визначте мінімальне число нуклеотидних замін, що відбулись в ділянці ДНК, що кодує ці послідовності, з моменту дуплікації, яка привела до утворення  $\alpha$ - і  $\beta$ -ланцюгів.

**Задача № 138.** Схрестили сіру самку дрозофіли з жовтим самцем. В першому поколінні одержали 211 сірих самок, 206 жовтих самок, 212 сірих самців. Взяли жовту самку з першого покоління і схрестили з сірим самцем з першого покоління. Одержали в другому поколінні: 604 сірих самки і 298 жовтих самців. Поясніть отримані результати. Визначте генотип всіх дрозофіл. Доведіть правильність вашої гіпотези методом «хі-квадрат».

**Задача № 139.** Схрестили курку з короткими ногами і гороховидним гребенем з півнем з довгими ногами і простим гребенем. В першому поколінні одержали всіх курчат з гороховидним гребенем, але 10 з них були з довгими ногами, 12 з короткими ногами. Взяли з першого покоління курей з короткими ногами і гороховидним гребенем і схрестили з півнями з короткими ногами і гороховидним гребенем. Отримали в другому поколінні: 18 курчат з короткими ногами і гороховидним гребенем, 5 курчат з короткими ногами і простим

греберем, 10 курчат з довгими ногами і гороховидним гребенем, 3 курчат з довгими ногами і простим гребенем. Поясніть отримані результати. Визначте генотип всіх курей. Доведіть правильність вашої гіпотези методом «хі-квадрат».

**Задача № 140.** В чистій лінії дрозофіл DN 100 половина самок були жовтими, половина сірими. Всі самці були жовтими. Причому жовті самки були стерильними. Взяли сіру самку і схрестили з жовтим самцем. Одержали в першому поколінні 167 жовтих самок, 170 сірих самок, 161 жовтого самця. Поясніть отримані результати. Визначте генотип всіх дрозофіл. Доведіть правильність вашої гіпотези методом «хі-квадрат».

**Задача № 141.** Послідовність нуклеотидів ДНК в одній з ділянок гену становила:

TTTATACGGGCCTCGGTGGGTGAATAATACCCCTTCGGGT  
AGAAGCTTA

Відбулась мікрделеція – тимін з третьої позиції випав. Напишіть послідовність амінокислот поліпептидів вихідного і мутантного кінцевого продукту.

**Задача № 142.** Схрестили самку дрозофіли з червоними очима з самцем дрозофіли з білими очима. В першому поколінні одержали 256 самок з червоними очима, 262 самки з білими очима, 251 самця з білими очима. Потім цю ж самку схрестили з самцем з червоними очима. Одержали: 578 самок з червоними очима і 285 самців з білими очима. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність гіпотези методом «хі-квадрат».

**Задача № 143.** Схрестили самку дрозофіли сіру з самцем чорним. В першому поколінні одержали: самок – 304 сірих і 302 чорних. Самців: 152 сірих і 154 чорних. Потім цю ж самку схрестили з сірим самцем. Одержали: самок – 304 сірих, 102 чорних. Самців: 151 сірих, 49 чорних. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність гіпотези методом «хі-квадрат».

**Задача № 144.** Схрестили самку дрозофіли сіру з білими очима з самцем сірим з червоними очима. В першому поколінні одержали: самок – 206 сірих з червоними очима, 101 чорну з

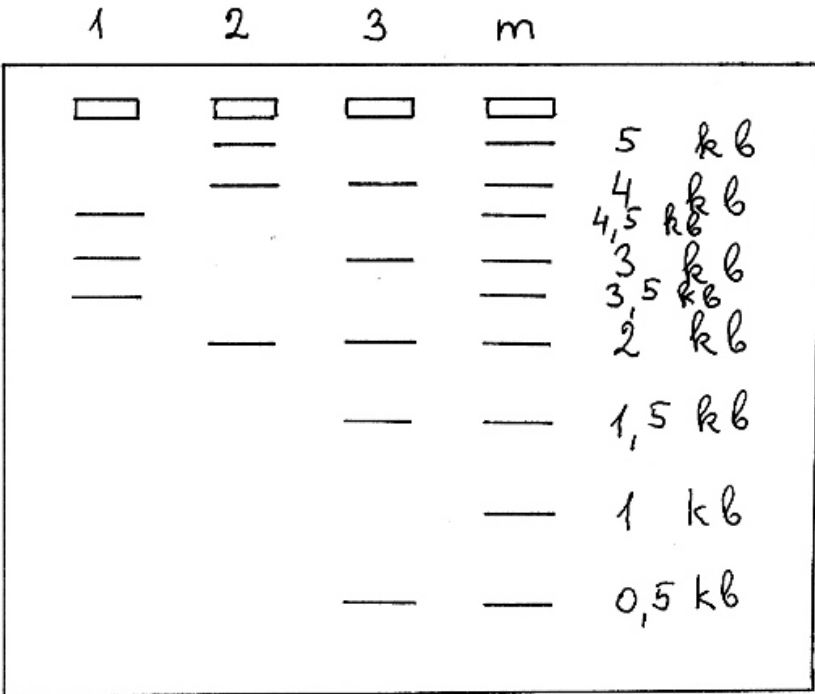
червоними очима; самців – 205 сірих з білими очима, 99 чорних з білими очима. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність гіпотези методом «хі-квадрат».

**Задача № 145.** Схрестили самку дрозофіли чорну з червоними очима з самцем сірим з червоними очима. Одержали в першому поколінні: самок – 210 сірих з червоними очима, 208 чорних з червоними очима; самців – 102 сірих з білими очима, 101 чорних з червоними очима, 105 чорних з білими очима. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність гіпотези методом «хі-квадрат».

**Задача № 146.** Схрестили курку з розовидним гребенем з півнем з бобовидним гребенем. В першому поколінні одержали всіх курей з горіховидним гребенем. В другому поколінні одержали: курчат з горіховидним гребенем – 19, курчат з розовидним гребенем – 6, курчат з бобовидним гребенем – 7, курчат з листовидним гребенем – 2. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність гіпотези методом «хі-квадрат».

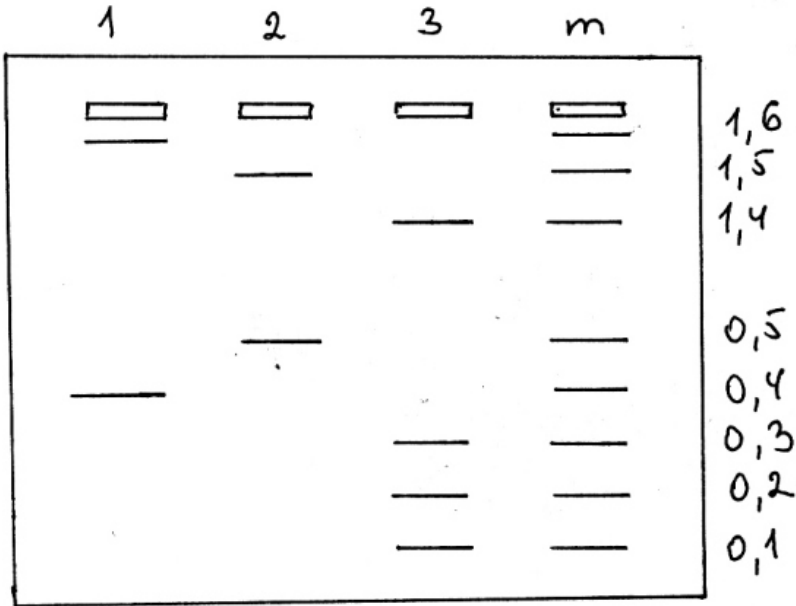
**Задача № 147.** Схрестили курку чорну з червоним гребенем з півнем білим з білим гребенем. В першому поколінні всі курчата були сірі з рожевим гребенем. В другому поколінні одержали: курчат чорних з червоним гребенем – 2, чорних з рожевим гребенем – 4, сірих з червоним гребенем – 5, сірих з рожевим гребенем – 9, чорних з білим гребенем – 2, сірих з білим гребенем – 4, білих з червоним гребенем – 2, білих з рожевим гребенем – 5, білих з білим гребенем – 2. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність гіпотези методом «хі-квадрат».

**Задача № 148.** Здійснили рестрикцію клонованого лінійного фрагмента ДНК рестриктазами Pst I та BamH I розміром 11 kb. Результати рестрикції представлені на електрофореграмі:



В першій лунці наносили зразки рестриковані Pst I. В другій лунці – зразки рестриковані BamH I. В третій лунці – двома ферментами одночасно. В четвертій лунці – маркер з набором фрагментів ДНК відомої довжини (довжини фрагментів вказані поруч). Користуючись результатами експерименту складіть карту сайтів рестрикції досліджуваного фрагменту ДНК.

**Задача № 149.** Здійснили рестрикцію кільцевого фрагмента ДНК (R-плазміни) рестриктазами Pst I та EcoR I розміром 2 kb. Результати рестрикції представлені на електрофореграмі:



В першій лунці наносили зразки рестриковані EcoR I. В другій лунці – зразки рестриковані Pst I. В третій лунці – двома ферментами одночасно. В четвертій лунці – маркер з набором фрагментів ДНК відомої довжини (довжини фрагментів вказані поруч). Користуючись результатами експерименту складіть карту сайтів рестрикції досліджуваної плазміди.

**Задача № 150.** Схрестили блакитних і світлих гуппі (лебістусів). В першому поколінні одержали всіх сірих гуппі. В другому поколінні одержали 49 сірих, 16 блакитних, 17 світлих, 5 білих гуппі. Взяли гібридів першого покоління і схрестили з білими особинами з другого покоління. Одержали 20 сірих, 23 блакитних, 21 світлого, 19 білих гуппі. Поясніть отримані результати. Доведіть правильність вашої гіпотези методом Пірсона.

## СЛОВНИК ОСНОВНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ТЕРМІНІВ

**Автополіплоїдія** – поліплоїдія, зумовлена присутністю більше ніж двох наборів хромосом одного виду.

**Адаптація** – структурні і функціональні особливості організму, які забезпечують йому оптимальне пристосування в оточуючому середовищі; еволюційний процес, при якому організм пристосовується до навколишнього середовища.

**Адаптивна (селективна) цінність** – степінь репродуктивної ефективності організму (чи генотипу) в порівнянні з іншими організмами (чи генотипами) тієї ж популяції.

**Адитивна варіанса** – генетична варіанса, зумовлена адитивністю генів.

**Адитивні гени** – взаємодіючі гени, які не виявляють домінантності (якщо вони алельні) або епістазу (якщо гени не алельні) і дія яких сумується.

**Акроцентрична хромосома** – хромосома, в якій центромера знаходиться біля одного з кінців, при цьому одне із плеч хромосоми довге, а друге – коротке.

**Акцепторна точка сплайсінгу** – ділянка між правим кінцем інтрону і лівим кінцем екзону.

**Алель** – одна з двох або більше альтернативних форм гена, кожна з яких має унікальну послідовність нуклеотидів; різні алелі даного гену звичайно розпізнаються фенотипічно, в загальному випадку – при порівнянні їх нуклеотидних послідовностей.

**Алельне виключення** – експресія у лімфоциті тільки одного алеля, що кодує імуноглобулін.

**Аллозими** – альтернативні форми фермента, що кодуються різними алелями одного гена.

**Аллопатичні популяції** – популяції одного виду, що населяють різні географічні області.

**Аллополіплоїдія** – поліплоїдія, зумовлена присутністю в одній клітині хромосомних наборів двох різних видів.



**Аллостеричний перехід** – зміна однієї конформації білка на іншу.

**Аллостеричний контроль** – здатність ефекторів при взаємодії з одною ділянкою фермента виявляти вплив на активність іншої.

**Амбер-кодон** – триплет UAG, один з трьох нонсенс-кодонів, що обумовлюють термінацію білкового синтезу.

**Амбер-мутація** – будь-яка зміна в ДНК, що приводить до появи амбер-кодонів замість триплету, що кодує амінокислоту.

**Амбер-супресори** – мутантні гени, що кодують тРНК зі зміненими антикодонами, що здатні впізнавати кодон UAG. В деяких випадках зберігається здатність впізнавати вихідний кодон.

**Аміноацил т-РНК** – молекула т-РНК, ковалентно зв'язана з амінокислотою через ацильний зв'язок між карбоксильною групою амінокислоти і 3'-ОН групою т-РНК.

**Аміноацил т-РНК-синтетаза** – фермент, каталізуючий утворення молекул специфічних аміноацил т-РНК. Наприклад, при використанні аланіну, відповідні йому т-РНК (т-РНК<sup>Ala</sup>) і АТР утворюється аланін-т-РНК.

**Амніоцентез** – метод пренатальної діагностики генетичних аномалій.

**Ампліфікація** – утворення додаткових копій хромосомних послідовностей, що виявляються в хромосомі або у позахромосомній ДНК.

**Анаболізм** – комплекс ферментативних реакцій, що призводять до синтезу складних біологічних молекул з менш складних.

**Анагенез** – еволюційна зміна окремої лінії з часом.

**Аналізуючі схрещування** – схрещування гетерозиготи (по одному або більше локусах) і відпоідною рецесивною гомозиготою.

**Анафаза** – третя стадія мітозу, або мейозу, під час якої хромосоми розходяться до протилежних полюсів клітини.

**Анеуплоїдія** – стан клітини, тканини або організму, при якому одна або кілька цілих хромосом із звичайного набору або відсутні, або представлені додатковими копіями.

**Антиген** – чужорідна молекула, проникнення якої в організм викликає синтез антитіла.

**Антикодон** – три суміжні нуклеотиди в молекулі т-РНК, які комплементарно спаровуються з трьома нуклеотидами кодона в молекулі м-РНК в процесі синтезу білка.

**Антитермінальні білки** – білки, що дозволяють РНК-полімеразі продовжувати транскрипцію, проходячи певні сайти термінації транскрипції.

**Антитіло** – білок, який синтезує імунна система вищого організму, що специфічно зв'язується з чужерідною молекулою (антиген), яка індукує його синтез.

**Апоіндуктор** – білок, що взаємодіє з ДНК для включення траскрипції РНК-полімеразою.

**Асиміляція ланцюга** – здатність Rec-A-протеїна обмінювати одноланцюгову ДНК на гомологічний ланцюг з дуплекса, за рахунок цього одноланцюгова нитка входить у склад дуплекса.

**Аск** – сумка з 8 аскоспорами в плодовому тілі грибів-аскоміцетів.

**Асортативне схрещування** – схрещування, при якому вибір шлюбного партнера відносно однієї чи кількох ознак не випадковий. Таке схрещування позитивне (негативне), якщо частота схрещувань між подібними (різними) особинами більша, ніж можна було б очікувати при випадковому виборі.

**Аттенуатор** – послідовність нуклеотидів, локалізована в лідерній області між промотором і структурними генами оперона, викликаючи закінчення транскрипції в лідерній області.

**Аттенуація** – регуляція транскрипції на рівні термінації, що здійснюється при експресії деяких бактеріальних оперонів.

**Аттенуатор** – термінаторна послідовність, на якій відбувається аттенуація.

**Ауксотрофи** – мікроорганізми не здатні синтезувати певну органічну молекулу і внаслідок цього не ростуть в мінімальному середовищі.

**Аутбридинг** – схрещування між генетичними відмінностями, а не близькоспорідними особами.

**Аутогенний контроль** – дія генного продукту, який або подавляє (від'ємний аутогенний контроль, або активує (позитивний аутогенний контроль) експресію свого власного гена.

**Аутосома** – будь-яка нестатева хромосома.

**Ацентричний фрагмент** – фрагмент хромосоми, що позбавлений центомери, і тому губиться в процесі клітинного поділу.

**ALU-родина** – гомологічна родина послідовностей в геномі ссавців, що споріднена ALU-повторам людини.

**АР-едонуклеази** – ферменти, що розрізають ДНК у апуринових або апіримідинових ділянках з утворенням 5'-кінців.

**Att-сайти** – ділянки фагової і бактеріальної хромосоми, рекомбінація між якими приводить до інтеграції або виключення фагу.

**$\alpha$ -аманітін** – біциклічний октапептид, що отриманий з гриба *Amantia phalloides*, інгібує транскрипцію певних еукариотичних РНК-полімераз, зокрема РНК-полімерази II.

**Бактеріофаги (фаги)** – віруси, що інфікують бактерії.

**Бібліотека геному** – набір клонованих фрагментів ДНК, що містять весь геном.

**Білок-репресор** – білок, що здатний зв'язуватися з оператором на ДНК або з РНК, блокуючи відповідно траскрипцію або трансляцію.

**Бівалент** – дві кон'юговані гомологічні хромосоми, що спостерігаються під час першого мейотичного поділу.

**Блок Прібнова** – те саме, що Прібнов-бокс.

**Блотінг по Саузерну** – процедура переносу денатурованої ДНК з агарозного геля на нітроцелюлозний фільтр для гібридизації з комплементарним нуклеотидом.

**Блотінг північний (блотінг РНК)** – перенесення РНК з агарозного геля на нітроцелюлозний фільтр для гібридизації з комплементарним нуклеотидом ДНК.

**Варіанса** (дисперсія) – міра мінливості ознаки, розрахована як сума квадратів відхилень між значеннями ознаки у кожної особини і середнім значенням цієї ознаки в популяції, поділеної на число проаналізованих особин без одиниці.

**Введення кінцевої мітки** – методика введення радіоактивно міченої групи в один з кінців (5' або 3') ДНК.

**Ведучий ланцюг** – ланцюг ДНК, що синтезується безперестанно у 5'-3'-напрямку.

**Вектор** – фактор, що здатний переносити ДНК з однієї клітини чи організму до іншого і включати її в геном.

**Вектор для клонування** – будь-яка плазміда або фаг, в які може бути вбудована чужорідна ДНК з метою клонування.

**Веретено** – структура, що утворюється в процесі ділення еукаріотичної клітини до якої прикріплюються за допомогою мікротрубочок хромосоми.

**Віджиг** – процес, що також називається гібридизацією нуклеїнових кислот, при якому два одноланцюгових полінуклеотиди формують дволанцюгову молекулу в результаті утворення водневих зв'язків між комплементарними нуклеотидами двох ланцюгів. Віджиг може відбуватися або між комплементарними ланцюгами ДНК (або РНК) з утворенням дволанцюгової молекули, або між ланцюгом ДНК і ланцюгом РНК з утворенням гібридної молекули РНК – ДНК.

**Вірулентний фаг** – бактеріофаг, здатний тільки до літичного розвитку, що завершується загибеллю клітини, і не здатний до лізогенії.

**Вірус-помічник** – вірус, що має функції, що відсутні у дефектного вірусу, компенсує їх при змішеній інфекції.

**Вибіркова реплікація** – saltatory replication - побічна ампліфікація, що приводить до появи великої кількості копій певної послідовності.

**Виродженість генетичного коду** – відповідність кількох кодонів одній амінокислоті.

**Вироджений код** – код, в якому одиничний елемент однієї мови визначається більш ніж одним елементом іншої мови.

**Високоповторювальна ДНК** – компонент тотальної ДНК, який реасоціюється першим. Ідентична сателітній ДНК.

**Витіснення мітки – pulse-chase** – метод, що полягає у короткочасній інкубації клітин з радіоактивно міченим попередником (що бере участь у певних реакціях або ж є попередником ряду макромолекул) з подальшим вивченням долі мітки під час продовження інкубації з неміченим попередником.

**Внутрішній супресор** – певна мутація, що подавляє фенотипічний прояв іншої мутації в тому ж самому гені.

**Гамета** – зріла репродуктивна клітина, що містить гаплоїдний набір хромосом, здатна при злитті з аналогічною клітиною протилежної статі утворювати зиготу.

**Гаплоїдний набір хромосом** – набір хромосом, що містить по одній копії кожної аутосоми і одну статеву хромосому.

**Гаплотип** – комбінація алелей тісно зчеплених локусів.

**Гаптен** – невелика молекула, що приєднується до інертного білкового носія і виконує функцію антигена.

**Гемізіготний ген** – ген, що представлений в генотипі в єдиному екземплярі.

**Ген** – послідовність нуклеотидів, яка може нести певну функцію в організмі.

**Ген-модифікатор** – ген, який при взаємодії з іншими генами змінює їх фенотипічний прояв.

**Ген-мутатор** – ген, що підвищує швидкість мутування іншого гена.

**Геном** – генетичний склад клітини або віруса, повний набір хромосом даного організму.

**Генотип** – вся генетична інформація організму, генетична структура організму по одному або декільком генам, що досліджуються.

**Генетична варіанса (дисперсія)** – частина фенотипічної варіанси, обумовлена відмінностями генетичної структури особин у популяції.

**Гетероалель** – алель, що відрізняється від інших алелей того ж гена по нуклеотидній послідовності в різних ділянках гена.

**Гетерогаметна стать** – стать, що утворює гамети різні по складу статевих хромосом.

**Гетерогамне схрещування** – схрещування між особами з різних популяцій або видів.

**Гетеродуплексна ДНК** – дволанцюгова ДНК, ланцюги якої мають різне походження.

**Гетерозигота** – клітина або організм, що містять два різних алеля в даному локусі гомологічних хромосом.

**Гетерозиготність** – доля особин в популяції, гетерозиготних по даному локусу, доля гетерозиготних локусів в геномі особини.

**Гетерозис** – перевага гетерозиготи над гомозиготою по степені експресії одної або кількох ознак.

**Гетерохроматин** – область в хромосомі або ціла хромосома, що має щільність, компактну структуру в телофазі, інтерфазі і ранній профазі.

**Гібрид** – нащадок схрещування між двома генетично не ідентичними організмами.

**Гінандроморф** – особина, у якої одна частина тіла має чоловічий фенотип, а інша жіночий.

**Гістон** – основний білок, що утворює комплекс з ДНК в хромосомі.

**Гомеотичні мутації** – мутації, що викликають заміну одної з структур тіла на іншу в процесі індивідуального розвитку.

**Гомогаметна стать** – стать, що утворює гамети, однакові по складу статевих хромосом.

**Гомогамне схрещування** – схрещування між особами одної популяції або виду.

**Гомозигота** – клітина або організм, що містять два однакових алеля в даному локусі гомологічних хромосом.

**Гомологічні хромосоми** – хромосоми (або їх сегменти), ідентичні по структурі складаючих їх локусів.

**Гаряча точка** – область ДНК, що значно більше мугує ніж інші області такого ж розміру.

**Група зчеплення** – група генних локусів однієї хромосоми, яка могла б бути розташована в лінійному порядку по степені зчеплення між ними.

**Делеція** – хромосомна мутація, при якій втрачається ділянка хромосоми.

**Денатурована ДНК** – ДНК, перетворена з двохланцюгової в одноланцюгову форму внаслідок розриву водневих зв'язків.

**Дефішенси** – делеції кінцевої ділянки хромосоми.

**Дигібридне схрещування** – схрещування між організмами, що несуть різні алелі в двох різних локусах.

**Дизиготні близнюки** – близнюки, що розвиваються з двох незалежнозапліднених яйцеклітин.

**Дикаріон** – клітина, що має два ядра від організмів різних видів.

**Диплоїд** – клітина або організм, що має два набори хромосом.

**ДНК-лігаза** – фермент, що “зшиває” полінуклеотиди, шляхом утворення фосфодієфірного зв'язку між кінцевим залишком 5'-РО<sub>4</sub> одного полінуклеотиду і кінцевим залишком 3'-ОН іншого полінуклеотиду.

**Домінантний алель** – алель алель або ознака, що проявляється в гетерозиготі.

**Дуплікація** – хромосомна мутація, при якій відбувається подвоєння якої-небудь ділянки хромосоми в гаплоїдному наборі.

**Екзон** – послідовність ДНК, що відповідає частині транскрипта, яка зберігається в зрілій мРНК, тобто після видалення інтронів з гетерогенної ядерної РНК.

**Екзонуклеаза** – фермент, який гідролізує кінцеві фосфодієфірні зв'язки (на 3'- чи 5'- кінці) полінуклеотидів.

**Експресивність** – ступінь фенотипічного прояву ознаки.

**Електроморфи** – алоферменти, які виявляються при електрофорезі.

**Електрофорез** – техніка розділення молекул, що базується на їх різній рухливості в електричному полі.

**Ендонуклеаза** – фермент, що гідролізує внутрішні фосфодієфірні зв'язки в полінуклеотиді.

**Ендосперм** – спеціалізована тканина квіткових рослин, яка живить зародок, що розвивається.

**Епісома** – генетичний елемент (молекула ДНК), яка існує як інтегрована частина молекули ДНК господаря, або як незалежна молекула ДНК, що реплікується (плазмід), не зв'язана з хромосоною клітини, плазмід що здатна входити до складу хромосоми.

**Епістаз** – взаємодія двох неалельних генів, при якій один з них (епістатичний ген) впливає на (або навіть пригнічує) фенотипічне проявлення іншого гену (гіпостатичний ген).

**Еуплоїдія** – стан клітини, тканини чи організму, що характеризується наявністю одного чи більше повних наборів хромосом.

**Еухроматин** – ділянка хромосоми чи ціла хромосома, що має нормальну спорідненість до барвників і проходить нормальний цикл спіралізації.

**Ефект засновника** – генетичний дрейф, що зумовлений тим, що у вихідному положенні популяція складається з дуже невеликої кількості особин.

**Ефект розташування** – зміна фенотипічного прояву гену, що зумовлений зміною розташування цього гену в геномі.

**Ефективна чисельність популяцій** – кількість особин популяції, що приймають участь у відтворенні потомства.

**Ефекторна молекула** – **ефектор** – невелика молекула, концентрація якої регулює активність молекули певного білка шляхом взаємодії із специфічною ділянкою зв'язування на молекулі білку і зміни його структури (алостеричний перехід).

**Закон Харді-Вайнберга** – закон, згідно якого частоти генотипів в популяції можуть бути передбачені за частотами генів при умові випадкового схрещування.



**Затравка** – субстрат, необхідний для ініціації реакції полімеризації (наприклад, синтезу ДНК); структурно подібний до продуктів цієї реакції.

**Зигота** – диплоїдна клітина, що формується в результаті злиття яйцеклітини і сперматозоїда.

**Ідентичні гени за походженням** – два гени, що мають однакові нуклеотидні послідовності по причині походження їх від спільного предка.

**Ідентичні гени за структурою** – два гени, що мають однакові нуклеотидні послідовності, незалежно від того, походять вони від спільного предка чи ні.

**Інбердна депресія** – зниження пристосованості, що викликана інбридінгом.

**Інбридінг** – схрещування між особами-родичами.

**Інверсія** – хромосомна мутація, при якій послідовність генів в якомусь локусі хромосоми змінюється на протилежну.

**Індуктор** – ефекторна молекула, відповідальна за індукцію синтезу фермента.

**Індукція** – синтез нових молекул фермента у відповідь на вплив середовища.

**Інсерційні послідовності** – різні послідовності нуклеотидів, знайдені у бактерій і здатні до переміщення з одного хромосомного локуса в інший. Спонтанне переміщення таких послідовностей може викликати мутації у вихідній чи новій ділянці вторгнення. Ці послідовності можуть нести активні промотори чи термінатори синтезу мРНК і служать ділянками-мішенями для інтеграції епісом.

**Інтерсекс** – особина в нормі двудомного виду, в якого репродуктивні органи або вторинні статеві ознаки частково відповідають одній статі, частково – протилежній.

**Інтерфаза** – стадія клітинного циклу, при якій метаболізм здійснюється без якихось помітних ознак поділу клітин.

**Інтерференція** – вплив одного кросинговера на хроматиді на ймовірність іншого кросинговера на тій же хроматиді.

**Каріотип** – хромосомний набір клітини або організму, що характеризується числом, розміром та конфігурацією хромосом.

**Карта зчеплення** – хромосомна карта, що показує порядок лінійного розміщення генів на хромосомі.

**Катаболічний** – відноситься до ферментативних реакцій, що приводять до розпаду складних біологічних молекул на менш складні компоненти; енергія, що виділяється при цьому може запасатися у формі АТФ, а продукти розпаду використовуються в наступних анаболічних реакціях.

**Квадріваленти** – чотири повністю або частково гомологічні хромосоми, зв'язані одна з одною в результаті кон'югації в період від профазі до метафазі першого мейотичного поділу.

**Квантове видоутворення** – швидке виникнення нових видів, звичайно, в малих ізолятах.

**Кеп** – структура на 5'-кінці еукаріотичної мРНК; утворюється після транскрипції за рахунок приєднання гуанінового нуклеотиду до кінцевої основи мРНК; метильований гуанозин на 5'-кінці транскрипту РНК еукаріотичних клітин.

**Кількісна ознака** – ознака, що варіює безперестанно від одної особини до іншої, що дозволяє розподілити особин в класи у відповідності зі ступінню вираженості ознаки.

**Кільце Бальбіані** – гігантський пух на політенній хромосомі.

**Кладогенез** – розгалуження одної еволюційної гілки на дві або декілька.

**Клітинний цикл** – цикл розвитку індивідуальної клітини.

**Кліна** – поступова зміна (градієнт) частоти генотипів чи фенотипів у ряді суміжних популяцій.

**Коадаптація** – узгоджена взаємодія генів.

**Код** – набір правил передачі інформації.

**Кодомінантні алелі** – пара алелей, кожний з яких проявляється фенотипічно в гетерозиготі.

**Кодон** – група з трьох суміжних нуклеотидів в молекулі мРНК, що кодує одну з амінокислот або позначають кінець синтезу білка.

**Колінеарність** – лінійна відповідність між послідовностями амінокислотних залишків в поліпептидному ланцюгу і послідовністю нуклеотидів в ДНК.

**Комплементарна група** – група мутантних алелей, що проявляють мутантний фенотип при об'єднанні одне з одним в гетерозиготі.

**Комплементарний тест** – генетичний тест для встановлення належності двох мутацій до одного гену; цис-транс-тест.

**Конверсія** - процес, в результаті якого алель в цілій хромосомі втрачається і замінюється іншим алелем з гомологічної хромосоми.

**Конидії** – вегетативні спори сумчастих та базидіальних грибів. Якщо конидії гаплоїдні, то їх злиття призводить до появи диплоїдних клітин, які, проходячи мейоз, дають початок аскам.

**Контролюючий елемент** – еукаріотичний елемент, що транспозується, присутність якого виявляється за зміною звичайної активності гену.

**Коньюгація** – процес переносу ДНК від бактерій одного статевого типу до іншого при контакті клітин.

**Коефіцієнт інбридінгу** – вірогідність того, що два гени в даному локусі ідентичні за походженням.

**Коефіцієнт добору** – міра ефективності добору, що вимірюється за зменшенням частоти зустрічі гамет даного типу у наступному поколінні.

**Криптичний сателіт** – послідовність сателітної ДНК, яка не виявляється у вигляді відокремленого піку в градієнті щільності, тобто цей сателіт не відокремлюється від основної ДНК.

**Крок добору** – (при штучному доборі) – відмінності у степені вираженості селективної фенотипічної ознаки між нащадками і батьківським поколінням.

**Кросинговер** – обмін ділянками між гомологічними хроматидами в процесі мейозу. Якщо хроматиди мали різні набори алелів, то кросинговер може бути виявлений генетично за утворенням рекомбінантних хроматид.

**Леталь** – генна чи хромосомна мутація, що викликає загибель (всіх носіїв при домінантності або гомозиготних носіїв при рецесивності) до досягнення репродуктивного віку.

**Лідер** – ділянка молекули мРНК від 5`- кінця до початку кодуючої ділянки першого структурного гену, може містити ділянку зв'язування рибосоми, а також атенуатор.

**Лізоген** – штам бактерій, що містить профаг.

**Лізогенія** – один з двох можливих випадків інфекції бактерії-хазяїна помірним фагом. При цьому фаговий геном репресований і ДНК фага реплікується у складі бактеріальної хромосоми, формуючи лізогенну, стійку до повторної інфекції цим фагом клітину. Іноді лізогенна клітина може індукуватися і бактерія може лізуватися, вивільнюючи велику кількість фагових частинок; інший випадок інфекції – літичний цикл розвитку.

**Локус** – місцезонашування даної мутації або гену на генетичній карті, часто використовується замість терміну “мутація” чи “ген”.

**Макроеволюція** – еволюція на рівні вищих систематичних категорій, ніж вид, призводить до виникнення нових родів, родин та інших таксономічних одиниць.

**Маркер** – алель, успадкування якого простежується у схрещуванні.

**Масовий добір** – штучний добір шляхом схрещування в кожному поколінні особин з максимальним (мінімальним) ступенем вираженості даної ознаки.

**Матриця** – одноланцюгова ДНК, комплементарна ланцюгу РНК чи ДНК, що синтезується, визначає послідовність нуклеотидів в ланцюгу, що синтезується.

**Матрична РНК (мРНК)** – молекула РНК, нуклеотидна послідовність якої транскрибується в послідовність амінокислот на рибосомах в процесі синтезу поліпептида.

**Мегаспора** – більша з двох типових гаплоїдних спор, що утворені судинними рослинами. Дрібніша зі спор називається мікроспорою. В насінні рослини мегаспора розвивається у

ембріональну сумку (жіночий гаметоцит) , а мікроспора дає початок клітинам пилку (чоловічий гаметоцит).

**Міжгенний супресор** – мутація, яка супресує фенотипічне проявлення мутації в іншому гені.

**Мейоз** – два послідовних поділи ядра клітини, що супроводжуються лише одним циклом реплікації хромосом, в результаті чого утворюється чотири гаплоїдні клітини.

**Менделівська популяція** – група організмів, що схрещуються між собою, і має спільний пул генів.

**Мерозигота** – частково диплоїдна бактеріальна клітина, що виникає в результаті кон'югації, трансдукції або трансформації.

**Метафаза** – друга стадія мітозу чи мейозу, в якій конденсовані хромосоми розподіляються в площині між полюсами клітини.

**Метацентрична хромосома** – хромосома, в якій центромера розташована приблизно посередині.

**Метилування** – модифікація в результаті додавання метильної (-CH<sub>3</sub>) групи до якої-небудь основи в молекулі ДНК чи РНК. Метилування ДНК у клітинах еукаріот корелює з пригніченням транскрипції.

**Механізм репродуктивної ізоляції** – будь-яка біологічна властивість організму, яка впливає на його здатність до схрещування із особиною іншого виду.

**Мітоз** – поділ ядра, що йде за реплікацією хромосом, в результаті чого дочірні ядра містять таку саму кількість хромосом, що і батьківські.

**Множинні алелі** – наявність у особин даного виду більше ніж двох алелів для певного локуса.

**Мозаїк** – особина, що містить групи клітин, які мають різний генотип і фенотипічний прояв.

**Монозиготні (ідентичні) близнюки** – близнюки, що розвиваються з однієї і тієї ж заплідненої яйцеклітини, що дає початок двом ембріонам на ранній стадії розвитку.

**Моноплоїд** – клітина, тканина або організм, що мають тільки один хромосомний набір.

**Моносомік** – анеуплоїдна клітина, тканина або організм, в хромосомному наборі яких одна з хромосом представлена в одному екземплярі.

**Мутант** – організм, що є носієм мутантного (відмінного від дикого типу) алеля.

**Мутування** – процес, в результаті якого в гені з'являються зміни, які успадковуються.

**Мутації зсуву рамки зчитування** – мутації, викликані або інсерцією або делецією нуклеотидів ДНК, в результаті яких змінюється рамка трансляції кодонів в молекулі мРНК, приводять до появи ненормальної послідовності амінокислот в молекулі білка, починаючи з точки, що відповідає положенню мутації.

**Мутон** – найменша одиниця мутування в гені, пара основ.

**Нативна ДНК** – дволанцюгова ДНК, що виділена з живого організму і зберегла водневі зв'язки між ланцюгами.

**Нежиттєздатність гібридів** – знижена життєздатність гібридних організмів.

**Негомологічні хромосоми** – хромосоми, що мають несхожі гени і не кон'югують при мейозі.

**Неоплазма** – пухлинна тканина.

**Нерівноважність за зчепленням** – не випадковий розподіл частот алелів, що належать різним локусам.

**Нерозходження** – втрата здатності до розходження при діленні двох сестринських хроматид або гомологічних хромосом, в результаті якої обидві вони відходять до одного полюса, утворюючи анеуплоїдне ядро.

**Невипадкове схрещування** – система схрещувань, при якій частоти співвідношення особин, які володіють даною ознакою, відмінні від частот, що очікуються на основі випадкового підбору пар.

**Нік-трансляція (зміщення розриву)** – спосіб введення мічених трифосфатів в нативну ДНК *in vitro*, за допомогою ДНК-полімерази і *E. coli*. При цьому використовується 5'-PO<sub>4</sub>/3'-ОН-розрив тільки в одній з двох ланцюгів нативної молекули ДНК; ДНК-полімераза I каталізує видалення 5'-PO<sub>4</sub>

кінцевого нуклеотида і додавання екзогенного міченого нуклеотида до 3'-ОН групи, в результаті видалення і добудови нуклеотида відбувається зміщення розриву на один нуклеотид. Наступні цикли видалення і полімеризації зміщують розрив вздовж молекули ДНК, при цьому серед заміщених нуклеотидів з'являється все більше мічених.

**Нонсенс-мутація** – зміна в ДНК, в результаті якої відбувається заміна сенсового кодону, що відповідає певній амінокислоті, на безсенсовий (термінуючий) кодон.

**Нонсенс-кодон** – один з трьох троиплетів – UAG, UAA, UGA, що викликають термінацію синтезу протеїну.

**Норма реакції** – ряд всіх можливих фенотипів, які можуть сформуватися на основі даного генотипу в різних умовах середовищ.

**Нулісомік** – анеуплоїдна клітина, тканина чи організм з втраченою парою гомологічних хромосом.

**Однодомні організми (зазвичай рослинні)** – формують репродуктивні органи чоловічого і жіночого типу на одній і тій самій особині і утворюють чоловічі і жіночі гамети.

**Олігомер** – білок, що складається з двох чи декількох ідентичних субодиниць.

**Онкоген** – ген, що викликає рак.

**Оогенез** – процес диференціювання клітин зародкової лінії, що супроводжується мейозом і призводить до утворення зрілої яйцеклітини.

**Оогоній** – примордіальна зародкова клітина, яка дає при мітозі початок ооцитам, з яких шляхом мейозу розвиваються полярні тільця і яйцеклітина.

**Оператор** – ділянка ДНК в опероні, що зв'язується з білком репресором, в результаті чого транскрипція цього оперону пригнічується.

**Оперон** – ділянка регуляції транскрипції (промотор і оператор) і два чи більше структурних гени, що належать до нього, котрі транскрибуються з утворенням єдиної молекули мРНК. В результаті експресія структурних генів в опероні

координовано регулюється одиничним промотором і оператором.

**Органогенез** – стадія ембріогенезу, на якій формуються головні органи тіла.

**Ортологічні гени** – гомологічні гени, які неоднаково еволюціонували в різних видів, що мають спільного предка.

**Паліндром** – послідовність символів, ідентична при прочитанні протилежних напрямків.

**Панміктичне схрещування** – випадковий підбір пар за одною чи більше ознаками.

**Паралогічні гени** – гомологічні гени, що виникли в результаті дуплікації і які еволюціонували паралельно в одному і тому ж організмі.

**Пара основ** – дві азотисті основи, які з'єднані водневими зв'язками в складі молекули дволанцюгової ДНК чи РНК.

**Парацентрична інверсія** – хромосомна інверсія, що не захоплює центромеру.

**Партеногенез** – утворення ембріону з гаметі жіночого типу без участі чоловічої гаметі.

**Пенетрантність** – імовірність фенотипічного прояву у особин певної ознаки, що кодується домінантним геном чи рецесивним геном в гомозиготному стані.

**Пептидний зв'язок** – ковалентний зв'язок, що формується між  $\text{NH}_2$ -групою однієї амінокислоти і  $\text{COOH}$ -групою іншої з виділенням молекули  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Перитецій** – плодове тіло грибів-аскоміцетів, що містять аски з аскоспорами.

**Перицентрична інверсія** – інверсія ділянки хромосоми, що містить центромеру.

**Підвиди** – популяції, що відрізняються від інших популяцій того ж виду по частоті визначених алелей, хромосомним перебудовам, спадковим фенотипічним ознакам. Між підвидами часто спостерігається часткова репродуктивна ізоляція, недостатня для того, щоб вважати їх різними видами.

**Плейотропність** – вплив одного гена на дві або більше фенотипічних ознак особини.



**Позагенний супресор** – мутація в одному гені, що подавляє фенотипічний прояв мутації в іншому гені.

**Помірний фаг** – бактеріофаг, що здатний до лізогенізації клітини господаря.

**Потік генів** – повільний обмін генами (однобічний чи двобічний) між популяціями, що обумовлений поширенням гамет чи міграцією особин.

**Прібнов-бокс** – канонічна послідовність ТАТААТГ, що знаходиться на відстані біля 10 п.н. перед стартовою точкою бактеріальних генів, частина промотора, що відповідає за зв'язування з РНК-полімеразою.

**Пробіл у ДНК** – відсутність одного або кількох нуклеотидів.

**Промотор** – послідовність нуклеотидів в молекулі ДНК, що розташована на початку транскрипційної одиниці і розпізнається РНК-полімеразою як ділянка, з якої починається транскрипція.

**Прототрофи** – мікроорганізми, що здатні рости на певних мінімальних середовищах, з компонентів яких організм синтезує всі складні молекули. Що складають його організм.

**Профаг** – репресована форма генома фага, представлена в лізогенній бактерії.

**Прямі мутації** – мутації від дикого типу до мутантного.

**Псевдоалелі** – мутації, алельні одна до одної на основі комплементарного тесту, але відокремлені одна від одної при рекомбінації.

**Псевдодомінантність** – прояв рецесивного гена (алеля), що обумовлений втратою відповідного гена в гомологічній хромосомі.

**Пул генів** – сукупність генів у популяції особин, що схрещуються.

**Реверсія** – вторинна мутація, що відновлює генетичну інформацію, змінену первинною мутацією.

**Ревертанти** – клітини або організми, у яких відбулась реверсія мутації.

**Регуляторний ген** – 1) будь-який ген, який модифікує або регулює активність інших генів; 2) ген, що кодує аллостеричний білок, який регулює транскрипцію структурних генів в опероні шляхом зв'язування з оператором.

**Резолваза** – фермент, що забезпечує сайтспецифічну рекомбінацію між двома транспозонами, що знаходяться у вигляді прямих повторів у коінтегрованих молекулах.

**Реплікони** – самореплікуючий генетичний елемент, що містить ділянку ініціації реплікації ДНК і гени, що контролюють реплікацію.

**Репресор** – білок, що зв'язується з операторною ділянкою молекули ДНК і подавляє транскрипцію генів, що лежать поруч, перешкоджає взаємодії РНК-полімерази з промотором цих генів.

**Рецесивний** – алель або відповідна ознака, яка проявляється тільки в гомозиготному стані.

**Реципрокне схрещування** – схрещування, в яких кожна з двох ліній виступає як материнська в одному схрещуванні і батьківська – в іншому.

**Родовід** – схема, що показує спорідненість по вертикалі між членами однієї сім'ї у двох або більше поколіннях.

**Сателітна ДНК** – ДНК, що складається з великої кількості тандем них повторів (ідентичних або схожих) основної короткої послідовності.

**Селективний зсув** – різниця між середніми значеннями ознаки у нащадків відібраних батьків і в батьківському поколінні в цілому.

**Селекція** – створення умов, при яких виживає тільки певна різноманітність клітин або організмів.

**Симпатричні популяції** – популяції або види, що мешкають хоча б частково на одній території.

**Синапсис** – кон'югація хромосом в мейозі.

**Синтенія** – зв'язок генів з певними хромосомами, що встановлюється в культурі соматичних клітин.

**Синтенні локуси** – генетичні локуси, що відносяться до одної і тої ж хромосоми.

**Спонтанні мутації** – мутації, що виникають при відсутності якихось факторів, що збільшують частоту мутування.

**Структурний ген** – ген, що кодує поліпептид або РНК.

**Суперген** – сегмент ДНК, що містить велику кількість тіснозчеплених генів, що конторлюють одну і ту ж ознаку, або групу взаємопов'язаних ознак.

**Супресія** – зміна, яка усуває прояв мутації, не виправляючи при цьому початкового порушення в ДНК.

**Супресія нонсенс кодону** – супресія, при якій експресується ген, що кодує мутантну тРНК, що здатна впізнавати нонсенс кодон як змістовний.

**Сферопласт** – бактеріальна або дріжджова клітина, позбавлена клітинної стінки.

**Талассемія** – спадкове захворювання людини, що викликане відсутністю  $\alpha$ - або  $\beta$ - глобіну в її еритроцитах.

**Тандемні повтори** – множинні копії однакових послідовностей, що розташовані одна за одною, орієнтовані в одному напрямку.

**Теломера** – природний кінець хромосоми.

**Трансдукція** – перенесення ДНК від однієї клітини до іншої через посередника, яким є вірус.

**Транспозаза** – фермент, що бере участь в інтеграції транспозона в новий сайт.

**Транспозон** – послідовність ДНК, що здатна переміщуватись по геному. Містить один або кілька генів, що не пов'язані безпосередньо з процесом транспозиції і ідентичні інсерційні послідовності, які забезпечують переміщення з одного локусу у інший.

**Трансфекція** – у генетиці соматичних клітин синонім трансформації.

**Трансформація** – пряме поглинання екзогенної ДНК клітинами, що приводить до рекомбінації між цією ДНК і ДНК клітини.

**Триплоїд** – клітина, або тканина чи організм, що має три хромосомних набори.

**Трисомік** – клітина або організм, в яких одна з хромосом представлена тричі.

**Унівалент** – некон'югована хромосома на стадії першого мейотичного поділу.

**Умовно-летальні мутації** – мутації, що призводять до загибелі організму в одних умовах зовнішнього середовища (непермісивні або рестриктивні умови), але не летальні у інших умовах (пермісивні умови).

**Фенокопія** – неспадкова фенотипічна модифікація, що імітує схожий фенотип, обумовлений мутацією.

**Фенотип** – спостережені ознаки особини, що проявляються в результаті реалізації генотипу в певних умовах середовища.

**Фенотипічна варіанса (дисперсія)** – дисперсія частоти розподілу особин по якійсь ознаці або сукупності ознак.

**Хіазма** – ділянка контакту між гомологічними хроматидами, що спостерігається від пізньої профазі мейозу до початку першої анафази. На цій ділянці відбувається обмін гомологічними частинами між сестринськими хроматидами у процесі кросинговера.

**Хроматиди** – дві поздовжні субодиниці дуплікованої хромосоми, які стають видимі при мітозі або мейозі.

**Хроматин** – матеріал, який виявляється в ядрі клітин по здатності до специфічного забарвлення, складається з ДНК, гістонів та негістонових білків.

**Хромосомні мутації** – зміна у структурі або в числі хромосом.

**Хромосомний набір** – сукупність хромосом у ядрі нормальної гамети або зиготи.

**Хромосомний поліморфізм** – присутність в популяції більш ніж однієї послідовності для визначеного гена в даній хромосомі.

**Центричне злиття** – злиття двох акроцентричних або телоцентричних хромосом у одну метацентричну хромосому.

**Центромера** – область хромосоми, до якої прикріплюються нитки веретена при мітотичному поділі клітин.

**Цистрон** – послідовність нуклетидів в ДНК, що визначають одиничну генетичну функцію, що виявляється в цис-транс тесті, послідовність нуклеотидів, що кодують одиничний поліпептидний ланцюг.

**Частотно-залежний добір** – природний добір, напрям і інтенсивність якого залежать від частоти генотипів або фенотипів в популяції.

**Швидко лізуючі г-мутанти** – мутанти Т-парних фагів, що обумовлюють зміни зони лізису *E. coli* у кінці інфекції.

**Швидко реасоціюючий компонент** – послідовності ДНК, які ренатурують першими, високоповторюючи ДНК.

**Ядерний матрикс** – сплетіння фібрил, що пронизують ядро.

**Ядерце** – органелла ядра еукаріот, зв'язана з ділянкою хромосоми, що містить гени рРНК; відокремлена область ядра, що утворюється при транскрипції генів рРНК.

**Ядерцевий організатор** – область хромосоми, що містить гени, які кодують рРНК.

**Ядро** – органелла еукаріотичної клітини, що оточена мембраною і містить хромосоми.

**Яйцеклітина** – гамета жіночого типу.

## МЕТОД ПІРСОНА АБО "ХІ-КВАДРАТ"

Під час дослідження результатів моно- чи полігібридного схрещування завжди виявляються відхилення від законів Менделя. Відхилення бувають внаслідок причин, що не зачеплюють механізм успадкування (статистичні причини) і внаслідок причин, що зачеплюють механізм успадкування (внаслідок зчеплення генів, зчеплення ознаки зі статтю, летальності генів, існування генів-модифікаторів та інших причин).

Для перевірки висунутої гіпотези про механізм успадкування існують спеціальні методи. Один із цих методів – метод "хі-квадрат".

Критерій "хі квадрат" вираховується по формулі:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

Де :

O – фактично спостережене число особин в даному класі.

E – теоритично очікуване число особин в даному класі.

Для перевірки в якій мірі спостережене розщеплення відповідає теоритично очікуваному використовують спеціальну таблицю (наведена нижче). Як правило беруть значення ймовірності 0,05. Якщо значення "хі-квадрат" більше ніж у стовпчику, що відповідає ймовірності 0,05, то розщеплення невідповідає гіпотезі, відхилення не є випадковим. Якщо значення "хі-квадрат" менше ніж у стовпчику, що відповідає ймовірності 0,05, то розщеплення відповідає гіпотезі, відхилення є випадковим. Число степенів свободи рівне числу класів, зменшеному на один. Якщо у розпорядженні дослідника мала вибірка (менше 10 особин) необхідно при вирахуванні "хі-квадрат" вносити поправку Йейтса – зменшення на 0,5 кожної різниці (O – E). Розподіл "хі"-квадрат наведений в таблиці 3.

**Таблиця 1. Генетичний код.**

	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	Term	UGA	Term	A
	UUG		UCG		UAG		UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

Таблиця 2. Умовні позначення амінокислот і відповідні їм кодони.

Амінокислота	Старі умовні позначення	Нові умовні позначення	Відповідні кодони
Аланін	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Цистеїн	Cys	C	UGC UGU
Аспарагінова кислота	Asp	D	GAC GAU
Глютамінова кислота	Glu	E	GAA GAG
Фенілаланін	Phe	F	UUC UUU
Гліцин	Gly	G	GGA GGC

			GGG GGU
Гістидин	His	H	CAC CAU
Ізолейцин	Ile	I	AUA AUC AUU
Лізин	Lys	K	AAA AAG
Лейцин	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Метіонін	Met	M	AUG
Аспарагін	Asn	N	AAC AAU
Пролін	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Глутамін	Gln	Q	CAA CAG
Аргінін	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Серин	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Треонін	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Валін	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Триптофан	Trp	W	UGG
Тирозин	Tyr	Y	UAC UAU



Таблиця 3. Критерій Пірсона.

ЧСС	Ймовірності значень “хі” -квадрат, що перевищують табличне													
	0,99	0,98	0,95	0,90	0,80	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	
1	0,0002	0,0006	0,004	0,016	0,064	0,148	0,455	1,074	1,642	2,706	3,841	5,412	6,635	
2	0,020	0,040	0,103	0,211	0,446	0,713	1,386	2,408	3,219	4,605	5,991	7,824	9,210	
3	0,115	0,185	0,352	0,584	1,005	1,424	2,366	3,665	4,642	6,251	7,815	9,837	11,341	
4	0,297	0,429	0,711	1,064	1,649	2,195	3,357	4,878	5,989	7,779	9,488	11,668	13,277	
5	0,554	0,752	1,145	1,610	2,343	3,000	4,351	6,064	7,289	9,236	11,070	13,388	15,086	
6	0,872	1,134	1,635	2,204	3,070	3,828	5,348	7,231	8,558	10,645	12,592	15,033	16,812	
7	1,239	1,564	2,167	2,833	3,822	4,671	6,346	8,383	9,803	12,017	14,067	16,622	18,475	
8	1,646	2,032	2,733	3,490	4,594	5,527	7,344	9,524	11,03	13,362	15,507	18,168	20,090	
9	2,088	2,532	3,325	4,168	5,380	6,393	8,343	10,66	12,24	14,684	16,919	19,679	21,666	
10	2,558	3,059	3,940	4,865	6,179	7,267	9,342	11,78	13,44	15,987	18,307	21,161	23,209	

Примітка: ЧСС – число ступенів свободи.

## Семінарські заняття з генетики

### Заняття № 1.

Тема: Предмет генетики.

Питання для обговорення:

1. Спадковість і мінливість.
2. Розділи сучасної генетики.
3. Євгеніка.
4. Цитогенетика.
5. Генна інженерія.
6. Методи сучасної генетики.
7. Гібридологічний аналіз.
8. Теорія пангенезису.
9. Досліди Кельрейтера, Сожре, Нодена, Найта, Гертера.
10. Досліди Менделя.
11. Факторіальна теорія спадковості.
12. Перевідкриття законів Менделя.
13. Внесок в розвиток генетики Августа Вайсмана.
14. Внесок в розвиток генетики Томаса Мограна.
15. Внесок в розвиток генетики Темофеева-Ресовського.
16. Внесок в розвиток генетики Вавилова.
17. Відкриття мутагенезу.
18. Досліди Ф. Гріффіта.
19. Теорія Дж. Бідла.
20. Відкриття Уотсона і Кріка.
21. Розшифровка генетичного коду.
22. Відкриття рестриктаз та його наслідки.
23. Асиломарська конференція.
24. Програма «Геном людини».
25. Розвиток генетики в Україні.

### Заняття № 2.

Тема: Досліди Менделя.

Питання для обговорення:

1. Досліди Менделя.

2. Альтернативні ознаки.
3. Фенотип і генотип.
4. Ген. Поняття гена на різних етапах розвитку генетики.
5. Перший закон Менделя.
6. Другий закон Менделя.
7. Третій закон Менделя.
8. Розщеплення генів.
9. Домінантні ознаки.
10. Рецесивні ознаки.
11. Повне домінування.
12. Неповне домінування.
13. Проміжне успадкування.
14. Наддомінування.
15. Кодомінування.
16. Множинний алелізм.
17. Гомозигота, гетерозигота, гемізігота.
18. Міжкласова комплементація.
19. Комбінативна мінливість.
20. Реципрокне схрещування.
21. Зворотне схрещування (бекрос).
22. Аналізуюче схрещування.

### Заняття № 3.

Тема: Причини відхилення від законів Менделя.

Питання для обговорення:

1. Статистичні причини відхилення від законів Менделя.
2. Поправка Йейтса.
3. Критерій Пірсона.
4. Летальні гени.
5. Напівлегальні гени.
6. Неповне проявлення генів.
7. Вплив зовнішніх умов на характер домінування.
8. Гени-модифікатори.
9. Гени-інтенсифікатори.
10. Гени-супресори.
11. Епістаз.

12. Криптомерія.
13. Комплементарні кени.
14. Полімерія.
15. Плейотропія.
16. Полімерні гени.
17. Псевдогени.

#### Заняття № 4.

Тема: Цитологічні основи спадковості.

Питання для обговорення:

1. Цитогенетика.
2. Хромосоми.
3. Андрогенез.
4. Штами.
5. Число і будова хромосом.
6. Метацентричні хромосоми.
7. Субметацентричні хромосоми.
8. Акроцентричні хромосоми.
9. Телоцентричні хромосоми.
10. Сателіти хромосом.
11. Ядерцеві організатори.
12. Гомологічні хромосоми.
13. Каріотип.
14. Гетерохроматин.
15. Еухроматин.
16. Конститутивний гетерохроматин.
17. Факультативний гетерохроматин.
18. Реплікатори.
19. Теломери.
20. Політенні хромосоми.
21. Центромери.
22. Геном.

#### Заняття № 5.

Тема: Генетика статі і зчеплене зі статтю успадкування.

Питання для обговорення:

1. Визначення статі.
2. Епігамне визначення статі.
3. Прогамне визначення статі.
4. Сингамне визначення статі.
5. Стать як менделююча ознака.
6. Статеві хромосоми.
7. Гомогаметна статі.
8. Гетерогаметна статі.
9. Теорія Бріджеса.
10. Теорія Гольдшміда.
11. Особливості визначення статі у ссавців.
12. Успадкування зчеплене зі статтю.
13. Нерозходження статевих хромосом.
14. Фізичне зчеплення Х-хромосом.
15. Синдром Шерешевського-Тернера.
16. Синдром Кляйнфельтера.
17. Тільця Барра.
18. Гінандроморфи.
19. Чисельне співвідношення статей і їх регуляція.
20. Явище відносної сексуальності.

#### Заняття № 6.

Тема: Зчеплення генів і кросинговер.

Питання для обговорення:

1. Зчеплення генів.
2. Групи зчеплення.
3. Кросинговер.
4. Морганіда.
5. Коінциденція і генетична інтерференція.
6. Генетичні карти хромосом.
7. Нерівний кросинговер.
8. Цитологічний механізм кросинговера.
9. Мітотичний кросинговер.
10. Фактори, що впливають на кросинговер.
11. Стать і кросинговер.
12. Мутації і кросинговер.

13. Вік особин і кросинговер.
14. Опромінення і кросинговер.

#### Заняття № 7.

Тема: Генетика бактерій і вірусів.

Питання для обговорення:

1. Трансдукція.
2. Сексдукція.
3. Трансформація.
4. Бактеріальна хромосома.
5. Епісоми.
6. Екзогенота.
7. Гетерогенота.
8. Від'ємна інтерференція.
9. Фізичне картування бактеріальних генів методом перерваної кон'югації.
10. Транспозони.
11. IS-елементи.
12. Tn-елементи.
13. Ретрогени.
14. Гібридний дисгенез.
15. F-фактор.
16. Генетичне картування бактерій.
17. Картування генів вірусів.
18. Умовно летальні мутації.

#### Заняття № 8.

Тема: Цитоплазматична спадковість.

Питання для обговорення:

1. Дія генів матері через цитоплазму яйцеклітини.
2. Гени пластид.
3. Цитогета.
4. Мейоз цитогет.
5. Химерні організми.
6. Строкатолистість.
7. Секторіальні химери.

8. Перикленальні химери.
9. Комплексні гетерозиготи.
10. Плазмогени.
11. Пластом.
12. Гени мітохондрій.
13. Хондріом.
14. Мутації petites.
15. Плазмід.
16. Класифікація плазмід.
17. R-фактори.
18. Коліциногени.
19. Трансмисивні плазміни.
20. Вплив на спадковість паразитів і симбіонтів.
21. Цитоплазматичні фактори невідомої природи.

#### Заняття № 9.

#### Тема: Мутації.

#### Питання для обговорення:

1. Генеративні мутації.
2. Соматичні мутації.
3. Геномні мутації.
4. Поліплоїдія.
5. Аутополіплоїди.
6. Аллополіплоїди.
7. Ортоплоїди.
8. Амфідиплоїди.
9. Незбалансовані поліплоїди.
10. Механізми виникнення поліплоїдів.
11. Гаплоїдні мутації.
12. Шляхи отримання гаплоїдних мутацій.
13. Анеуплоїдія.
14. Трисомія.
15. Моносомія.
16. Нуллісомія.
17. Синдром Дауна.
18. Синдром Патау.

19. Синдром Едварда.
20. Перебудови хромосом.
21. Дефішенси.
22. Делеції.
23. Дуплікації.
24. Синдром Вольфа-Хіршхорна.
25. Інверсії.
26. Транслокації.
27. Транспозиції.
28. Ефект положення.
29. Генні мутації.
30. Реверсії.
31. Гіпоморфні мутації.
32. Аморфні мутації.
33. Антиморфні мутації.
34. Неоморфні мутації.
35. Гени-мутатори.
36. Мутабельні гени.

#### Заняття № 10.

Тема: Причини мутацій.

Питання для обговорення:

1. Мутагени.
2. Фізичні мутагени.
3. Теорія мішені.
4. Кисневий ефект.
5. Репарація.
6. Хімічні мутагени.
7. Алкілюючі сполуки і мутагенез.
8. Супермутагени.
9. Чужорідна ДНК як причина мутацій.
10. Віруси як причини мутацій.
11. Старіння клітин і мутації.
12. Пролонгована дія мутагенів.
13. Антимутагени.
14. Причини спонтанних мутацій.



## 15. Природний радіоактивний фон і мутації.

### Заняття № 11.

Тема: Модифікації.

Питання для обговорення:

1. Визначення модифікацій.
2. Неспадковий характер модифікацій.
3. Морфози.
4. Фенокопії.
5. Тривалі модифікації.
6. Причини модифікацій.
7. Адаптивні і неадаптивні модифікації.

### Заняття № 12.

Тема: Регуляція активності генів.

Питання для обговорення:

1. Оперон.
2. Сар-ділянка.
3. Промотор.
4. Оператор.
5. Спейсери.
6. Термінатори.
7. Атенуатори.
8. Ефектори.
9. Аlostеричний ефект.
10. Корепресор.
11. Негативна індукція.
12. Позитивна індукція.
13. Негативна репресія.
14. Позитивна репресія.
15. Фазові варіації.

### Заняття № 13.

Тема: Тонка будова хромосом і генів.

Питання для обговорення:

1. Гістони.

2. Нуклеосоми.
3. Лінкерні ділянки.
4. Гетерогенність гістонів.
5. Високорухомі протеїни ядра.
6. Різні форми спіралі ДНК.
7. Пуфи хромосом.
8. Мажорні і мінорні протеїни ядра.
9. Гіпотеза «егоїстичної» ДНК.
10. Соленоїд.
11. Ампліфікація.
12. Магніфікація.
13. Тонка будова гена.
14. Цис-транстести.
15. Гомоалелі.
16. Гетероалелі.
17. Сайти.
18. Цистрони, рекони, мутони.
19. Організація геному еукаріот.
20. Повтори низької чисельності в геномі.
21. Повтори середньої чисельності в геномі.
22. Повтори високої чисельності в геномі.
23. Процесінг.
24. Сплайсінг.
25. Аутосплайсінг.
26. Рибозими.
27. Трансплайсінг.
28. Альтернативний сплайсінг.
29. Сучасні уявлення про ген.

#### Заняття № 14.

Тема: Молекулярні механізми мутацій і рекомбінацій.

Питання для обговорення:

1. Нонсенс мутації.
2. Міссенс мутації.
3. Супресія нонсенс-кодонів.
4. Молекулярні механізми дії мутагенів.

5. Репарація.
6. Фотореактивація.
7. «Темнова» репарація.

#### Заняття № 15.

Тема: Генетика індивідуального розвитку.

Питання для обговорення:

1. Теорія омніпотентності.
2. Порушення правила омніпотентності.
3. Пенетрантність.
4. Експресивність.
5. Варіабельність.
6. Плейотропність.
7. Генний баланс.
8. Комплементация.
9. Міжклеточна комплементация і розвиток.
10. Генетичний фон.
11. Імуногенетика.
12. Перекомбінації ДНК під час формуванні генів імуноглобулінів.

#### Заняття № 16.

Тема: Популяційна генетика.

Питання для обговорення:

1. Закон Харді-Вайнберга.
2. Ідеальна популяція.
3. Причини відхилень від закону Харді-Вайнберга.
4. Чисті лінії.
5. Панміксія та її обмеження.
6. Асортативні схрещування.
7. Інбридинг.
8. Інбредна дисперсія.
9. Дрейф генів.
10. Потік генів.
11. Ефект засновника.
12. Кумулятивний ефект.

13. Мутаційний тиск.
14. Тиск добору на популяції.
15. Частотнозалежний добір.
16. Генетична гетерогенність природних популяцій.
17. Гетерозис.
18. Поліморфізм.
19. Генетичний вантаж.
20. Гений баланс.
21. Генетична коадаптація.
22. Супергени.

### Заняття № 17.

Тема: Основи генної інженерії.

Питання для обговорення:

1. Косміди.
2. Ендонуклеази.
3. Рестриктази.
4. Ті-плазмід.
5. Секвінування ДНК.
6. Зонди.
7. Плазмід дріжджів.
8. Вектори.
9. Створення бібліотек генів.
10. Скрінінг бібліотек генів.
11. Молекулярне клонування.
12. κДНК.
13. Клонування генів в бактеріофагах.
14. Метод «прогулянка по хромосомі».
15. Сферопласти.
16. Протопласти.
17. Введення чужорідної ДНК в клітини ссавців.

## Література

1. Айала Ф., Кайгер Д. Современная генетика. В 3 томах. – М.: Мир, 1987. – 1065 С.
2. Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. – М.: Высшая школа, 1985. – 300 с.
3. Альбертс Б. и др. Молекулярная биология клетки: в 5 т. / Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Робертс К., Уотсон Дж. – М.: Мир, 1986-1987. – 1560 с.
4. Бердышев Г. Д., Криворучко И. Ф. Медицинская генетика. - К.: Вища школа, 1990. – 326 с.
5. Бердышев Г. Д., Дуброва Ю. Е., Карпенчук К. Г. Строение, функции и эволюция генов. – К.: Наукова думка, 1980. – 256 с.
6. Бочков Н. П., Захаров А. Ф., Иванов В. И. Медицинская генетика. – М.: Медицина, 1984. – 460 с.
7. Ватти К. В., Тихомирова М. М. Руководство к практическим занятиям по генетике. – М.: Просвещение, 1979. – 320 с.
8. Гершензон С. М. Основы сучасної генетики. – К.: Наукова думка, 1983. – 458 С.
9. Гловер Н. Клонування ДНК. - М.: Мир, 1989. – 350 с.
10. Давыденко О. Г. Нехромосомная наследственность. Курс лекций. – Минск: Изд-тво БГУ, 2001. – 270 с.
11. Дейвіс Д. Аналіз геному. - М.: Мир, 1989. – 400 с.
12. Дубинин Н. П. Общая генетика. – М.: Наука, 1986. – 480 с.
13. Захаров В. Хромосомы человека. – М.: Атлас, 1982. – 101 С.
14. Инге-Вечтомов С. И. Генетика с основами селекции. – М.: Высшая школа, 1989. – 300 с.
15. Ли Ч. Введение в популяционную генетику. – М.: Мир, 1979. – 550 с.
16. Лобашов М. Е. Генетика. – Л.: Издательство Ленинградского университета, 1967. – 736 С.
17. Лобашов М. Е., Ватти К. В., Тихомирова М. М. Генетика с основами селекции. – М.: Просвещение, 1979. – 560 с.
18. Льюин Б. Гены. – М.: Мир. – 1987. – 550 С.
19. Міллер Д. Експерименти в молекулярній генетиці. - М.: Мир, 1979. – 321 С.

20. Орлова Л. Генетический анализ. – М.: Высшая школа, 1988. – 134 С.
21. Ривич-Щербо И. В., Марютина Т. М., Григоренко Е. Л. Психогенетика. – М.: Аспент Пресс, 2000. – 290 с.
22. Свиричев Ю., Пасеков В. Основы математической генетики. – М.: Высшая школа, 1989. – 207 С.
23. Смирнов В.Г. Цитогенетика. – М.: Высшая школа, 1989. – 123 С.
24. Стент Г., Келиндер Р. Молекулярная генетика. – М.: Мир, 1982. – 524 С.
25. Тоцький В. М. Генетика. – Одеса: Астропринт, 2002. – 710 с.
26. Уотсон Д., Туз Д., Куртц Д. Рекомбинантные ДНК. – М.: Мир, 1990. – 267 С.
27. Фогель Ф., Мотульські А. Генетика людини. В 3 томах. - М.: Мир, 1989. – 929 С.
28. Хеймс Т. Траскрипція і трансляція. Методи. – М.: Мир, 1989. – 300 с.
29. Хесин Р. Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1985. – 420 с.
30. Шей Д. Методы генетики соматических клеток В 2 т. – М.: Мир, 1985. – 320 с.
31. Яблоков А. В. Фенетика. – М.: Наука, 1980. – 400 с.
32. Weaver R. F. Genetics. – Wm. C. Brown Publishers, 1997. – 980 p.

## Зміст

Вступ	5
<b>Лекція I. Місце генетики серед біологічних наук</b>	7
Предмет генетики	7
Розділи сучасної генетики	7
Методи генетики	8
Історія генетики	9
Розвиток генетики в Україні	15
<b>Лекція II. Закони Менделя</b>	16
Досліди Менделя. Моногібридне схрещування	16
Основні генетичні позначення	22
Дигібридне і полігібридне схрещування	22
<b>Лекція III. Причини відхилення від законів Менделя</b>	25
Статистичні причини	25
Диференційована смертність	26
Неповне проявлення генів	28
Вплив зовнішніх умов на характер домінування	28
Гени-модифікатори	28
Гени-супресори	29
<b>Лекція IV. Цитологічні основи спадковості</b>	35
Цитогенетика	35
Число і будова хромосом	36
<b>Лекція V. Генетика статі і зчеплене зі статтю</b>	
<b>упадкування</b>	41
Визначення статі	41
Стать як менделююча ознака	45
Статеві хромосоми	46
Теорії визначення статі	48
Особливості визначення статі у ссавців	49
Успадкування зчеплене зі статтю	50
Нерозходження статевих хромосом	52
Фізичне зчеплення X хромосом	53
Нерозходження статевих хромосом у людини	53
Статевий хроматин	54
Гінандроморфи	56

Чисельні співвідношення статей і їх регуляція	56
Явище відносної сексуальності	57
<b>Лекція VI. Зчеплення і кросинговер</b>	57
Кросинговер	58
Карти хромосом	59
Подвійний і множинний кросинговер. Інтерференція	60
Нерівний кросинговер	61
Цитологічний механізм кросинговера	61
Фактори, що впливають на кросинговер	63
<b>Лекція VII. Генетика бактерій і вірусів</b>	64
Картування бактеріальної хромосоми	64
Фізичне картування бактеріальних генів методом перерваної кон'югації	65
Рухомі генетичні елементи – транспозони	66
Фізична карта F-фактора	70
Генетичне картування E. coli	71
Картівання генів вірусів	72
<b>Лекція VIII. Цитоплазматична спадковість</b>	74
Дія генів матері через цитоплазму яйцеклітини	74
Гени пластид	75
Гени мітохондрій	80
Плазміди	81
Паразити і симбіонти	83
Цитоплазматичні фактори невідомої природи	84
<b>Лекція IX. Мутації</b>	86
Геномні мутації. Поліплоїдія	87
Шляхи отримання гаплоїдних мутацій	89
Зміна числа окремих хромосом (анеуплоїдія)	90
Перебудови хромосом (сегментні мутації)	92
Генні мутації	96
<b>Лекція X. Причини мутацій</b>	99
Фізичні мутагени	99
Хімічні мутагени	102
Причини спонтанних мутацій	105
<b>Лекція XI. Модифікації та регуляція активності генів</b>	105
Модифікації	105



Регуляція активності генів. Оперон	108
<b>Лекція XII. Тонка будова хромосом і генів.</b>	
<b>Організація генома</b>	113
Молекулярна будова хромосом еукаріот	113
Тонка будова гена	117
Організація генома	118
Процесінг	120
Сучасні уявлення про ген	121
<b>Лекція XIII. Молекулярні механізми мутацій та рекомбінацій</b>	122
Молекулярні механізми дії мутагенів	123
<b>Лекція XIV. Генетика індивідуального розвитку</b>	125
Імуногенетика	127
Онкогеника	131
<b>Лекція XV. Популяційна генетика</b>	135
Закон Гарді-Вайнберга-Кастла	135
Генетична гетерогенність природних популяцій	141
Генетика кількісних ознак як основа селекції	145
<b>Лекція XVI. Основи генної інженерії</b>	148
Актуальність генної інженерії	148
Історія генної інженерії	149
Основна генетична речовина	151
Денатурація і ренатурація ДНК	154
Стабільність пар основ	154
Паліндроми і утворення внутрішньоланцюгових водневих зв'язків	155
Метилування основ ДНК	155
Плазміди	155
Спіралізація ДНК	157
Методи створення рекомбінантних молекул ДНК	157
Специфічні нуклеази	158
Методи секвінування ДНК	161
Хімічний синтез олігонуклеотидів	162
Липкі і тупі кінці ДНК, що утворилися внаслідок рестрикції	163
Приєднання липких кінців до тупих кінців ДНК	164

Використання маленьких плазмід для клонування чужорідних генів	164
<b>Лекція XVII. Клонування генів</b>	165
Отримання безпечних штамів бактерій і безпечних плазмідних векторів	165
Зонди для виявлення клонованих генів	165
Синтез і клонування кДНК	166
Ідентифікація клонів кДНК	167
Клонування фрагментів геному у бактеріофазі $\lambda$	168
Косміди	169
Метод «прогулянка по хромосомі»	170
Клонування ДНК у бактеріофазі M 13	172
Блотінг по Саузерну і «Північний блотінг»	172
Процедури клонування генів, що кодують мінорні білки	174
Скрінінг бібліотек генів за допомогою олігонуклеотидних зондів	175
Використання векторів, що експресуються	176
Імунологічний скрінінг продуктів векторів, що експресуються	178
<b>Лекція XVIII. Генна інженерія дріжджів</b>	179
Дріжджі <i>Saccharomyces cerevisiae</i> як об'єкт генної інженерії	179
Використання сферопластів дріжджів	179
Експресія генів дріжджів у <i>E. coli</i>	180
Човникові вектори	180
Плазмиди дріжджів	181
Підвищення ефективності трансформації за допомогою додаткових точок реплікації	182
Стабілізація дріждевих плазмід центромерною ДНК дріжджів	182
Теломери на кінцях дріждевих хромосом	184
Направлене вбудовування клонованої ДНК в хромосоми дріжджів	186
Вектори-“рятівники”	187
<b>Лекція XIX. Генна і генетична інженерія вищих рослин</b>	188
Клітини рослин в культурі	188

Регенерація цілих рослин з культивованих рослинних клітин	189
Протопласти	189
Створення гібридних рослин шляхом злиття протопластів	190
Генетична інженерія вищих рослин	191
Корончаті гали – пухлини рослин	191
Плазміді, що індукують пухлини (Ті-плазміді)	192
Мутанти Ті-плазмід	192
Інтеграція тДНК з хромосомою рослини	193
Т-ДНК і транспозони	194
Менделівське успадкування т-ДНК	195
Ті-плазміді в якості вектора	195
Трансформація рослинних клітин і протопластів	196
Мобілізація т-ДНК за допомогою vir-сегмента Ті-плазміді	197
Аттенувані вектори на основі т-ДНК і регенерація рослини з однієї клітини	197
Т-ДНК і виділення генів вищих рослин	198
Практичне застосування геної інженерії рослин з використанням Ті-плазмід	199
<b>Лекція XX. Введення чужорідних генів у клітини ссавців</b>	199
Йони кальцію і поглинання ДНК клітинами хребетних	199
Тимідінкіназа як прототип селективних маркерів у дослідках по трансфекції	200
Домінантні маркери для трансформації нормальних клітин	201
Котрансформація в результаті внутрішньоклітинного лігування	202
Мікроін'єкції ДНК у клітини ссавців	203
Часткове успадкування картини метилювання трансфікованої ДНК	203
Виділення генів, введених в клітини шляхом трансфекції	204
Регуляція активності гена після трансфекції	206
Докази існування специфічних ракових генів людини у дослідках по трансфекції	207

Клонування онкогенів людини	209
<b>Програмні вимоги до курсу генетики</b>	210
<b>Задачі з генетики</b>	212
<b>Словник основних генетичних термінів</b>	255
<b>Метод Пірсона (<math>\chi</math>-квадрат)</b>	276
<b>Генетичний код</b>	278
<b>Таблиця Пірсона</b>	280
<b>Семінарські заняття з генетики</b>	281
<b>Література</b>	292

Навчальне видання

**Сіренко Артур Геннадійович**

## **Лекції та задачі з генетики**

Художній редактор – *Калагурка В. С.*

Комп'ютерний макет – *Сіренко А. Г.*

Використані малюнки художника *Моріса Корнеліуса Есхера*

Підписано до друку 13.04.2018. Формат 60x84/16

Папір офсетний. Друк цифровий.

Гарнітура «Times New Roman». Ум. друк. арк. 17,44

Наклад 100. Зам. № 123 від 13.04.2018.

Друк: підприємець *Голіней О. М.*

76008, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 128

тел.: (0342) 58-04-32, +38 050 540 30 64