

Молекулярная биология

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ПРОГРАММА ВСТУПИТЕЛЬНОГО ЭКЗАМЕНА В АСПИРАНТУРУ
ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ 03.01.03 – молекулярная биология.
Направление подготовки: 06.06.01 – биологические науки.

1. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. Первичная структура нуклеиновых кислот

Нуклеотиды – мономеры нуклеиновых кислот. Пуриновые и пиримидиновые основания; кето-енольная таутомерия. Нуклеозид; N-гликозидная связь; фосфатный остаток, его положение. Различные типы нуклеотидов.

Химическая деградация нуклеиновых кислот. Щелочной и кислотный гидролиз. Использование щелочного гидролиза для разделения ДНК и РНК (метод Шмидта-Таннхаузера).

Ферментативная деградация нуклеиновых кислот. Экзонуклеазы и эндонуклеазы. ДНКазы и РНКазы.

Количественное определение нуклеиновых кислот, включая УФ-спектрофотометрию. Методы выделения нуклеиновых кислот.

Специфичность количественных соотношений азотистых оснований в нуклеиновых кислотах. Правила Чаргаффа. Основные принципы определения первичной структуры ДНК; химический метод Гилберта и метод дидезокситерминаторов Сэнгера; модификации этих методов.

2. Макромолекулярная структура ДНК

Двойная спираль Уотсона-Крика. Принцип комплементарности и его биологическое назначение. Водородные связи и гидрофобные взаимодействия между азотистыми основаниями. Параметры спирали. В- и А-формы ДНК.

Гипохромизм ДНК. Его связь с упорядоченностью расположения азотистых оснований в молекуле.

Денатурация двуцепочечной ДНК. Влияние ионной силы, гидрофобных растворителей, мочевины, pH. Температура плавления спирали ДНК, ее связь с нуклеотидным составом. Гиперхромный эффект. Денатурация ДНК как переход спираль-клубок. Природа кооперативности. Ренатурация ДНК. Условия ренатурации.

Молекулярная гибридизация ДНК.

3. Макромолекулярная структура РНК

Типы РНК и функциональная роль и распространенность. Сходство и отличие конформационных свойств РНК и ДНК: гипохромизм; рентгеноструктурные данные; характеристическая вязкость; температурная зависимость гипохромизма и вязкости; обратимость тепловой денатурации.

Вторичная структура РНК. Неканонические типы спаривания оснований. Гибридные спирали ДНК-РНК. Структура тРНК и функциональная роль ее элементов. Структурные домены в РНК. Антисмысловые РНК. Каталитическая активность РНК (рибозимы).

Одноцепочечная ДНК и двуцепочечная РНК вирусного происхождения.

3. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА БЕЛКОВ

1. Первичная структура белков.

Аминокислотные остатки – мономеры белковых цепей. Типы аминокислот. Пептидная связь. Полипептидная цепь.

Проверка гомогенности препаратов белков. Аналитическое ультрацентрифугирование. Электрофорез в полиакриламидном геле. Изоэлектрофокусирование. Определение N- и C-концевых аминокислотных остатков.

Определение последовательности аминокислотных остатков в белке. Гидролитическое расщепление белка с помощью протеолитических ферментов. Расщепление белковой цепи по метиониновому остатку бромистым цианом. Разделение пептидов. Идентификация пептидов. ДНФ-метод Сэнгера. Метод Эдмана. Секвенатор. Стыковка пептидов.

2. Пространственная структура белков.

Вторичная структура белков.

α -спирали и β -складки участки в глобулярных белках. Отклонение от геометрических параметров β -складки в спиральных участках белков. Изогнутость β -структурных слоев в глобулярных белках (правопропеллерность). Связь вторичной структуры белков с их аминокислотной последовательностью.

Третичная структура белков. Природа сил, стабилизирующих трехмерную структуру белка. Гидрофобные взаимодействия. Ионные и водородные связи. Ван-дер-ваальсовы взаимодействия.

Четвертичная структура белков. Типы взаимодействия между субъединицами в олигомерных белках на примере молекулы гемоглобина. Симметричные олигомерные структуры из тождественных субъединиц. Структуры инсулина, лактатдегидрогеназы. Биологические преимущества крупного белка, составленного из субъединиц, перед крупным мономерным белком.

3. Денатурация белков.

Разрушение нативной конформации белков при изменении температуры, pH, при обработке мочевиной, гуанидинхлоридом. Действие детергентов, спиртов, электролитов.

4. Самоорганизация пространственной структуры белковых молекул.

Формирование пространственной структуры белковой молекулы – процесс, определяемый только ее первичной структурой. Опыты Анфинсена по ренатурации молекулы рибонуклеазы. Влияние солей, субстратов на скорость ренатурации белка.

5. Некоторые функции белков.

Классификация белков, основанная на их биологической функции. Ферменты, транспортные белки, запасные белки, сократительные белки, защитные белки крови, токсины, гормоны, структурные белки.

Транспортные белки. Гемоглобин. Механизм его взаимодействия с молекулами кислорода.

Защитные белки крови.

Гуморальный иммунитет. Общие понятия о В-лимфоцитах. Структура молекул иммуноглобулинов. Молекулярные механизмы многообразия антител. Взаимодействия антиген-антитело.

Т-клеточный иммунитет. Общие понятия о Т-лимфоцитах. Главный комплекс гистосовместимости, МНС (молекулы главного комплекса гистосовместимости). Цитокины, общая характеристика, роль в иммунном ответе.

Ферменты. Классификация ферментов. Кофакторы ферментов. Кинетика ферментативных реакций. Уравнения Михаэлиса-Ментен и Бриггса-Холдейна.

Функционирование ферментов. Активные центры ферментов.

Представление о строении активного центра и механизме действия ферментов (лизоцим, карбоксипептидаза, химотрипсин и др.

Регуляция ферментативной активности. Ингибирование. Превращение проэнзима (зимогена) в фермент, фосфорилирование, аденилирование.

Аллостерическая регуляция активности ферментов. Аллостерические белки и их биологическая роль. Значение четвертичной структуры белков. Регуляция по принципу обратной связи.

Изоферменты. Четвертичная структура изоферментов (лактатдегидрогеназа). Изоферментная регуляция метаболизма на примере изоферментов лактатдегидрогеназы.

Полиферментные комплексы. Пируватдегидрогеназный комплекс.

4. СТРУКТУРА РИБОСОМ

1. Локализация рибосом в клетке.
2. Седиментационная характеристика рибосом прокариот и эукариот.
3. Состав рибосом.

Различия 70S и 80S рибосом. Связанные катионы: Mg^{++} , Ca^{++} , ди- и полиамины.

4. Составные части рибосомы: две неравные субъединицы.

Диссоциация рибосом. Обратимость диссоциации. Специфичность реассоциации: контактирующие поверхности субчастиц. Димеризация рибосом и их частиц при высоких концентрациях.

5. Три типа молекул рибосомальной РНК их коэффициенты седиментации и молекулярный вес; распределение по субчастицам. Вторичная структура РНК в составе рибосом.

6. Количество белковых молекул на рибосому и их молекулярно-весовые характеристики; гетерогенность по молекулярным весам, аминокислотному составу и последовательности; разделение путем электрофореза в геле.

7. Самосборка рибосом. Влияние высокой концентрации одновалентных катионов на удержание рибосомального белка. Кооперативность разборки. Стадии разборки. Реконструкция рибосомы. Функции рибосомальных РНК.

5. СТРУКТУРА ВИРУСОВ

1. Состав вирусов и вирусных нуклеопротеидов. ДНК-содержащие и РНК-содержащие вирусы. Типы вирусных нуклеиновых кислот (одноцепочечные и двуцепочечные ДНК и РНК, линейные и кольцевые молекулы, фрагментированные геномы). Аномальные основания в ДНК бактериофагов. Количественные соотношения нуклеиновой кислоты и белка.

2. Инфекционность чистой вирусной нуклеиновой кислоты.

3. Функции вирусного белка. Защитная функция. Инвазивная функция. Т-четные бактериофаги, способность проникновения в клетку (механизм). Ферментативная функция: полимеразы нуклеиновых кислот, входящие в состав вирусных частиц; протеазы; нейраминидазы; гиразы и другие ферменты.

4. Принципы сборки вирусов. Самосборка и другие механизмы.

6. СТРУКТУРА ГЕНОМОВ

1. Два уровня организации упаковки ДНК в живой природе: свободная (вирусы, бактерии) и нуклеопротеидная (высшие организмы) форма. Проблема компактной упаковки на обоих уровнях.

2. Фаговый/вирусный геном. Размеры, молекулярный вес, непрерывность цепей ДНК, цикличность ДНК.

3. Бактериальная хромосома.

4. Хромосома как клеточный дезоксирибонуклеопротеид (ДНП). Типы гистонов. Структура хроматина. Нуклеосома.
5. Локализация генов в хромосомах. Принцип линейного расположения генов в хромосоме.
6. Понятие о мутации как точечном изменении в определенном участке ДНК. Виды мутаций: транзиция, трансверсия, делеция, инсерция. Фенотипическое выражение мутации: изменение, ослабление или выпадение функции. Мутации разных генов. Мутация внутри одного гена.
7. Определение границ гена. Цис-транс-тест и понятие цистрона; эквивалентность цистрона и гена. Явление межгенной комплементарности как основа теста. Трудности, связанные с возможностью межаллельной комплементации; понятие межаллельной (внутригенной) комплементации.
8. Строение генов высших эукариот: интроны и экзоны.

7. РЕДУПЛИКАЦИЯ, РЕКОМБИНАЦИЯ И МОДИФИКАЦИЯ ДНК

1. Редупликация ДНК.

Полуконсервативный механизм редупликации (опыт Меселсона-Сталя).

Механизм биосинтеза ДНК. Роль матрицы, ДНТФ, образование комплементарного продукта. Точность редупликации ДНК. Направление редупликации хромосомы и парных нитей ДНК-матрицы. Расплетающие белки. Инициация с РНК-затравкой. Фрагменты Оказаки.

ДНК-полимераза I (Корнберга). Ее ферментативные активности (полимеризующая, 3'-5' и 5'-3'-экзонуклеотические), их роль в синтезе ДНК. ДНК-лигазы, их роль в синтезе ДНК.

Свойства и роль ДНК-полимераз I, II, III. Инициация синтеза комплементарной ДНК на однонитевых ДНК бактериофагов M13 и fX174. РНК-полимеразы, образующие РНК-затравки для инициации синтеза ДНК. Инициационный комплекс: ДНК-полимеразы III, белковый кофактор, кополимераза, ДНК-зависимая АТФаза, расплетающий белок, АТФ. Элонгация ДНК. Белок, катализирующий *разрыв-воссоединение* одной из нитей ДНК. Регуляция редупликации хромосомы бактерий. Понятие о репликоне. Плазмиды и эписомы.

Схема репликона. Т-антиген вируса SV40 как инициатор репликации ДНК. Редупликация хромосом высших организмов. Множественность репликонов в хромосомах, амплификация генов рРНК. Хромосомы митохондрий и пластид.

2. Синтез ДНК на матрице РНК (обратная транскрипция). Примеры.

3. Молекулярный механизм мутаций.

Мутации, возникающие в процессе редупликации ДНК и при физикохимических воздействиях. Типы мутаций.

4. Экспериментальная расшифровка генетического кода. Понятие о кодовом отношении, о кодонах, о неперекрываемости кодонов, о запятых, вырожденности.

5. Модификация и рестрикция ДНК.

Понятие о модификациях, индуцируемых хозяином, и о рестрикции ДНК.

Метилирование ДНК. Энзимология метилирования ДНК. Метилирование ДНК фагов и бактерий.

Механизмы эпигенетической регуляции экспрессии генов.

Ферменты рестрикции и модификации.

6. Репарация повреждений ДНК.

Система световой репарации ДНК. Темновая репарация ДНК. Вырезание тиминовых димеров и застройка бреши. Этапы процесса. Роль ферментов: эндонуклеазы, ДНКазы, ДНК-полимеразы I, лигазы. Наследственные заболевания человека, основанные на нарушении системы репарации ДНК.

7. Генетическая рекомбинация.

Типы генетической рекомбинации у бактерий и фагов.

Пол и конъюгация у бактерий. Половой фактор – эписома.

Передача ДНК от донорных клеток к реципиентным. Механизм встраивания эписомы, умеренного фага и участка хромосомы в геном реципиентных бактерий.

Молекулярные механизмы трансдукции, трансформации, рекомбинации фагов и эписом.

8. Генная инженерия.

Плазмидные векторы для клонирования фрагментов ДНК. Векторы на основе фага I. Космиды и фазмиды. УАС - сверхемкий вектор для клонирования ДНК. Челночные векторы. Конструирование экспрессирующих векторов и их функционирование. Факторы, влияющие на эффективность экспрессии рекомбинантных генов. Векторы, используемые в клетках животных и растений. Получение генов для клонирования, включая химический синтез генов, ПЦР и др. Трансформация (трансфекция) бактерий гибридными плазмидами и фаговыми ДНК. Селекция трансформантов. Введения генов в клетки растений и животных. Методы конструирования и селекции гибридных молекул ДНК. Оптимизация экспрессии клонированных генов.

Трансгенные растения и животные.

Технология фагового дисплея.

Понятие о правилах генно-инженерной деятельности и биобезопасности. Законы Российской Федерации по этим вопросам.

8. ТРАНСКРИПЦИЯ И БИОСИНТЕЗ РНК

1. Транскрипция.

Информационные РНК.

Понятие об оперонах и полицистронных мРНК. Разрезание (процессинг) предшественников тРНК и мРНК бактериофагов.

2. Матричный синтез РНК.

Этапы синтеза РНК. Присоединение РНК-полимеразы к ДНК. Промоторы про- и эукариот, энхансеры. Последовательность нуклеотидов в промоторах. Инициация, элонгация и терминация синтеза РНК.

Структура РНК-полимеразы. Роль ее субъединиц в транскрипции. Модификация РНК-полимеразы при размножении бактериофагов. Новые полипептиды в РНК-полимеразе при фаговой инфекции и специфичность синтеза РНК. РНК-полимеразы бактериофагов.

3. Регуляция транскрипции у бактерий.

Классическая схема оперона по Жакобу и Моно. Альфа-комплементация бета-галактозидазы. Позитивная регуляция арабинозного оперона. Катаболитная репрессия. Циклическая АМФ и белок-рецептор цАМФ. Белки-активаторы и их акцепторные зоны в опероне, нуклеотидная последовательность акцепторных зон и их структурные взаимоотношения с промотором и оператором. Фактор терминации транскрипции (γ -фактор).

4. Регуляция транскрипции у эукариот.

Общая структура генома; уникальные и повторяющиеся последовательности в ДНК. Кинетика ренатурации ДНК. Сателлитные ДНК. Мобильные генетические элементы. Уникальные и повторяющиеся структурные гены белков. Три типа РНК-полимераз животных.

Гигантские предшественники мРНК, их структура и созревание. Образование 3'-концевой полиА-последовательности и кэпа. Гипотезы о структуре единиц транскрипции у эукариот.

5. Ферментативный синтез РНК на матрице РНК при вирусной инфекции РНК-содержащими вирусами.

Проблема редупликации вирусной РНК. РНК-зависимая РНК-полимераза. Вирусная природа фермента. Бактериальные РНК-содержащие вирусы.

Этапы вирусной инфекции при заражении РНК-содержащими бактериофагами, у которых геном представляет собой «+» РНК: депротеинизация вирусной РНК в клетке, соединение вирусной РНК с рибосомами клетки хозяина, синтез РНК-синтетазы, репликация «+» и «-» цепей вирусной РНК и дальнейший синтез белков, (самосборка вирусных частиц).

Особенности репликации РНК у вирусов, у которых геном представляет собой «-» РНК или двуспиральную РНК.

10. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

1. Активация аминокислот. Реакция первичной активации аминокислот. Химия процесса. Тип образующейся химической связи. Участвующие в этом ферменты. Специфичность ферментов по отношению к различным аминокислотам.

2. Акцептирование аминокислотной группы на тРНК.

Открытие тРНК и процесса акцептирования аминокислот (Хогланд и Замечник, 1959).

Характеристика тРНК: длина цепи, концевые группы, универсальная 3'-концевая последовательность.

Реакция акцептирования аминокислотной группы. Химия процесса. Значение ССА-конца тРНК. Связь аминокислоты с тРНК. Ферменты, участвующие в акцептировании.

Аминокислот-тРНК как форма поступления аминокислоты в рибосому.

3. Индивидуальные тРНК. Специфичность тРНК по отношению к различным аминокислотам. Узнавание ферментами индивидуальных тРНК. О гетерогенности тРНК с одинаковой специфичностью к аминокислоте (множественность изоакцепторных тРНК).

4. Адапторная теория.

Адапторная гипотеза Крика (1956-57). Принцип комплементарности оснований как основа гипотезы. Понятие об антикодоне. Понятие об аминокислот-специфичном участке. Понятие об универсальных участках и их роль в связывании с рибосомой.

Механизм трансляции в свете адапторной теории.

5. Расшифровка генетического кода на уровне трансляции. Открытие Ниренберга и Ледера (1964): связывание аминокислот-тРНК с тринуклеотидами. Составление кодовой таблицы.

Окончательное подтверждение строения и функции кода путем использования синтетических матриц заданной регулярной нуклеотидной последовательности (Корана, 1966). Окончательная кодовая таблица.

Вырожденность кода и некоторые закономерности этой вырожденности.

6. Функциональные центры рибосомы.

мРНК-связывающий участок. Его локализация на 30S субчастице.

Аминокислот-тРНК-связывающий участок рибосомы и его локализация.

Пептидил-тРНК-связывающий участок рибосомы и его локализация.

ГТФазная активность комплексов рибосомы с белковыми факторами.

7. Общая характеристика трансляции.

Динамическая модель работы рибосомы. Полярность трансляции. Удержание растущего полипептида на рибосоме. Субстраты реакции и химия реакции образования пептидной связи. Цикличность работы рибосомы. Понятие об этапах трансляции: инициация, элонгация (полимеризация) и терминация.

8. Этапы трансляции.

Инициация трансляции. Инициаторная формилметионил-tРНК. Иницирующие кодоны. Белковые факторы и ГТФ. Образование начального комплекса. Образование первой пептидной связи. Инициация в системах с синтетическими матрицами без иницирующих кодонов.

Особенности инициации в эукариотических системах.

Полимеризация аминокислот, элонгация. Белковые факторы и ГТФ. Поступление в рибосомы аминокислот-tРНК. Образование пептидной связи. Транслокация. Общая схема рабочего цикла трансляции.

Механизм действия некоторых антибиотиков на рабочий цикл трансляции. Пуромицин. Хлорамфеникол. Эритромицин. Тетрациклины. Стрептомицин. Спектиномицин. Фулициновая кислота.

Понятие о ложном кодировании в процессе элонгации.

Терминация трансляции. Кодоны терминации. Белковые факторы терминации.

Межцистронная пунктуация в полицистронных мРНК.

10. Полирибосомы. Распространенность. Механизм функционирования. Биологическая роль.

11. Биоэнергетика трансляции. Вклад и механизм действия белковых факторов трансляции.

12. Регуляция синтеза белка на уровне трансляции. Понятие об информосоме. Данные о негативной регуляции мРНК в животных системах. Позитивная регуляция: мРНК-узнающая способность рибосом и белковых факторов инициации.

15. Посттрансляционные изменения белков; частичный протеолиз, гликозилирование, фосфорилирование и другие типы химической модификации белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Льюин Б. Гены. Издательство: Бином: Лаборатория знаний, 2012.
2. Албертс Б. Молекулярная биология клетки. Б.Албертс., Д.Брей, Дж.Льюис, М.Рэфф, К.Робертс, Дж.Уотсон. М.: Мир 2013. тт.1-3.
3. Спирин А.С. Молекулярная биология: рибосомы и биосинтез белка. М.: Академия. 2011.
4. Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера: В 3-х т. М.: Бином. 2011.
5. Ленинджер А. Основы биохимии. М., 1985.
6. Стент Г. Молекулярная генетика. М., 1974.

7. Корнберг А. Синтез ДНК. М., Мир, 1977.
8. Овчинников А.Ю. Биоорганическая химия. М., Просвещение, 1987.
9. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия, в 2-х томах. Новосибирск, Сиб. унив. изд-во, 2004.

Полезная информация на портале <http://molbiol.ru/>

СОСТАВИТЕЛИ:

- д.б.н., профессор С.Н.Щелкунов
- д.б.н., профессор А.А.Ильичев
- д.б.н., доцент Л.И.Карпенко
- д.б.н., И.П.Гилева
- д.б.н., Н.А.Нетесова

Программа обсуждена на заседании Ученого совета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» 30.05.2014 г., протокол № 4.

Дополнительные материалы:

ПАСПОРТ СПЕЦИАЛЬНОСТИ.

Шифр специальности:

- [03.01.03](#) Молекулярная биология

Формула специальности:

- Молекулярная биология – область науки, занимающаяся исследованием биополимеров, их компонентов и комплексов, структуры и функции генов и геномов.

Области исследований:

- Физико-химия биополимеров, их компонентов и комплексов.
- Геномы, их структура и функция.
- Биосинтез нуклеиновых кислот и белка.
- Молекулярная биология клетки.
- Молекулярная энзимология.
- Молекулярная вирусология и противовирусные вещества.
- Генная, белковая и клеточная инженерия.
- Биоинформатика.

Отрасль наук:

- биологические науки
- химические науки
- физико-математические науки