**Глава 1.**

**Обзор методов определения последовательности нуклеиновых кислот**

К настоящему моменту можно выделить три поколения технологий секвенирования. К первому поколению относятся изобретенные в середине 70-х годов ХХ века метод химической деградации, или метод Максама-Гилберта и метод «обрыва цепи», или метод Сенгера. Вторым поколением принято считать коммерческие технологии высокопроизводительного секвенирования, которые разработали в середине 1990-х. Они основаны на разных принципах, но все требуют получения сигнала от множества одинаковых молекул ДНК. В настоящее время на рынке появляются технологии секвенирования, позволяющие регистрировать сигнал от единственной исследуемой молекулы нуклеиновой кислоты. Такие подходы начали называть секвенированием третьего поколения. Однако, второе и третье поколения секвенирования чаще объединяют под терминами «NGS» и «высокопроизводительное секвенирование» как равнозначными.

Методы определения нуклеотидной последовательности в РНК пока недостаточно эффективны – технологии секвенирования одиночных молекул, позволяющие работать непосредственно с РНК, только начали появляться.  
Несмотря на это, секвенирование РНК тоже проводится. Розер Венто-Тормо из Института Сенгера с коллегами, интересуясь иммунологическим парадоксом беременности провели секвенирование РНК одиночных клеток, выделенных из плаценты и децидуальной ткани, сопоставив данные с клетками крови матери. На основе полученных данных был составлен молекулярный атлас, являющийся впечатляющим ресурсом для будущих исследований беременности и её осложнений.  
В тоже время сейчас для определения последовательности РНК исследователи чаще используют секвенирование комплементарной ДНК, потому что процесс обратной транскрипции достаточно стандартен и консервативен.

**1.1 Методы, основанные на детекции сигнала от множества одинаковых молекул ДНК (методы с предварительной амплификацией1 фрагментов ДНК)**

Большая часть современных методов молекулярной биологии использует множество идентичных макромолекул для получения детектируемого сигнала – это и различные виды хроматографии2, рентгеноструктурный анализ4, масс-спектрометрия5 и, в том числе, секвенирование ДНК. Оно также требует усиления сигнала за счет использования множества одинаковых молекул ДНК в анализе.

**1.1.1 Метод Максама-Гилберта, или метод химической деградации**

В 1977 году исследователи Гарвардского университета Аллан Максам и Уолтер Гилберт разработали метод определения нуклеотидной последовательности ДНК, основанный на специфичности химической деградации нуклеотидов при обработке молекулы различными химическими агентами3. Сначала, образец ДНК, обычно сравнительно короткий (100-1000 пар нуклеотидов) гомогенный фрагмент с одного из концов помечают радиоактивной меткой. На втором этапе образец разделяют на четыре части, каждую из которых обрабатывают своим реагентом, приводящим к гидролизу ДНК по конкретным основаниям или их сочетаниям. Параметры каждой реакции подбирают так, что гидролиз проходит не полностью, а лишь по некоторым позициям в каждой молекуле ДНК, желательно получить одну модификацию на отдельную молекулу. Получается набор «расщепленных» фрагментов ДНК, соответствующих по длине местам нахождения нуклеотидов данного типа.  
Например, чтобы определить положение гуанина при помощи диметилсульфата проводят метилирование6 ДНК, в результате гуанин метилируется по положению 3, а аденин – положению 7. В дальнейшем полученную смесь обрабатывают соляной кислотой при 0 °C приводит к выпадению из цепи метиладенина. ДНК с «пустыми» остатками дезоксирибозы в позициях, где был аденин, можно гидролизовать при нагревании щелочи. Гидролиз в этом случае с метилгуанином осуществляют при помощи пиперидина.  
Модификации по пиримидиновым основаниям проводят с гидразином. В этом случае, если реакцию проводить в присутствии хлорида натрия, модификация только цитозина. Гидролиз обработанной гидразином ДНК проводят пиперидином.



**Рис.1.1.** Принцип метода Максама-Гилберта. Расщепление одинаковых, помеченных с одного из концов, фрагментов ДНК по разным позициям дает фрагменты разной длины, затем фрагменты могут быть разделены при помощи гель-электрофореза

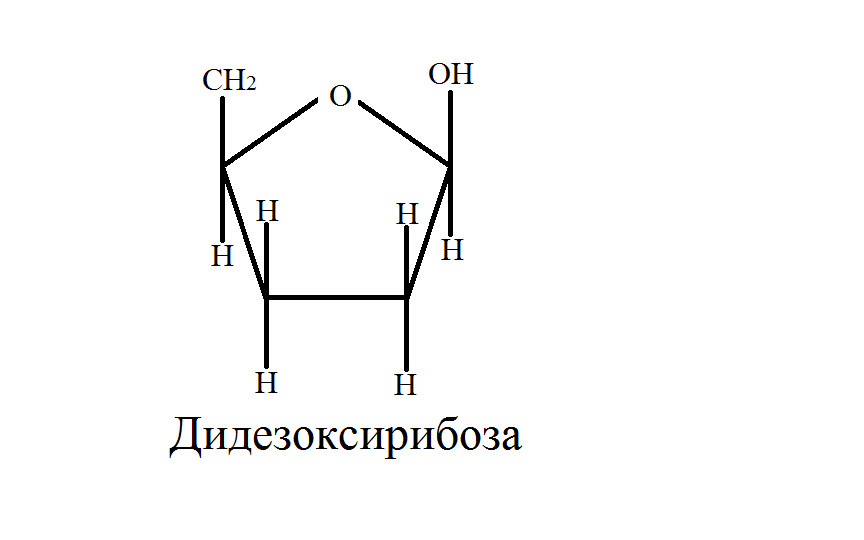
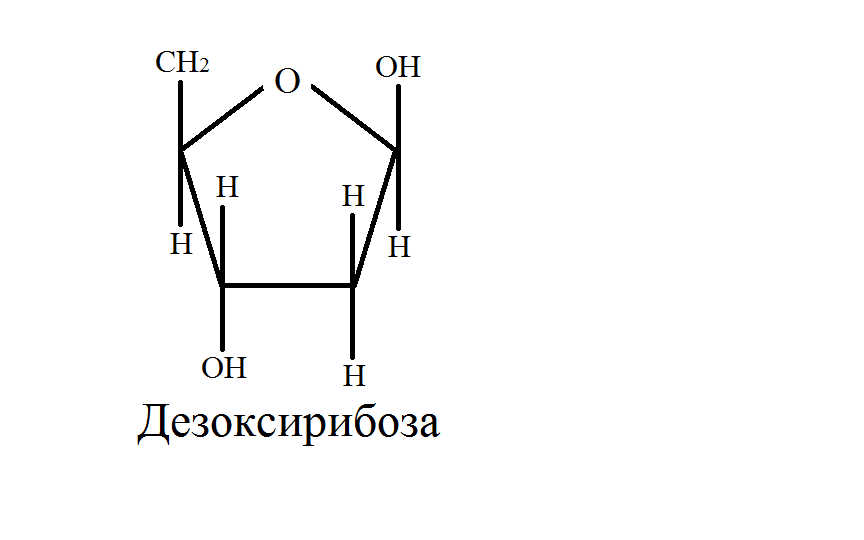
После обработки все четыре образца параллельно наносятся в денатурирующий полиакриламидный гель и проводят электрофорез так, чтобы получить разделение фрагментов, отличающихся на один нуклеотид. Далее с помощью рентгеновской пленки получают изображение – электрофореграмму. По ней можно восстановить последовательность нуклеотидов исследуемого фрагмента ДНК, отсчитывая, в какой из четырех дорожек оказался фрагмент, следующий за самым легким продуктом (наиболее удаленным от лунок в геле). С помощью этого метода можно определить до 200 нуклеотидов за одно прочтение.

До последнего времени этот метод использовали, когда фермент ДНК-полимераза, который используется в методе Сенгера, не мог пройти через вторичную структуру. Однако, в настоящее время метод практически не используется ввиду сложности подготовки образцов ДНК и работы с вредными химическими реагентами. Преимуществами метода Максама-Гилберта, по сравнению с методом Сенгера, являются полная его независимость от вторичных структур и отсутствия необходимости знания участка последовательности, интересующей ДНК, что позволяет пропустить стадию клонирования.

**1.1.2 Метод Сенгера (остановка синтеза ДНК ферментом на дидезоксинуклеотидах)**

В 1975 году Фредерик Сенгер и Алан Кулзон из лаборатории молекулярной биологии в Кембридже предложили метод определения последовательности нуклеотидов в ДНК, основанный на использовании радиоактивно меченных нуклеотидов и ДНК-полимеразы, который был назван авторами «плюс-минус секвенирование». Через два года Сенгер усовершенствовал этот метод и создал новый – метод дидезокситерминаторов, который впоследствии получил название «метод Сенгера». Через три года, в 1980 году Фредерик Сенгер за эту работу был удостоен Нобелевской премии по химии, которую разделил с Уолтером Гилбертом.

Основа метода – использование модифицированных «нуклеотидов» - дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ддНТФ). Отличие ддНТФ от обычных дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ) в том, что они не несут OH-группу в 3’-положении дезоксирибозы.

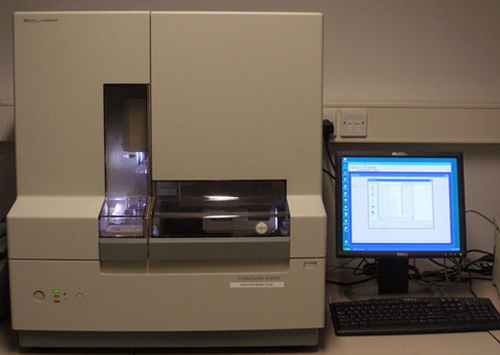


**Рис.1.2.** Структурные формулы дезоксирибозы и дидезоксирибозы

Вследствие этих особенностей в строении ддНТФ, они не способны к присоединению полимеразой следующего нуклеотида. Исследуемый участок ДНК добавляют в реакцию, добавляется в реакцию, по условиям схожую с обычной полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в пробирке находятся: термостабильная ДНК-полимераза, дНТФ всех четырех типов, и олигонуклеотид, выступающий в качестве затравки для синтеза новой цепи ДНК. Помимо этих компонентов, в концентрации примерно в двадцать раз меньшей чем концентрация дНТФ, присутствуют четыре соответствующих ддНТФ, меченых каждый своим флуоресцентным красителем (до применения флуорофоров в качестве меток использовали изотопы, обычно P32).

В ходе реакции мечения - ферментативного синтеза ДНК в каком-то положении случайным образом происходит включение в строящуюся цепь вместо дНТФ меченого ддНТФ, что приводит к остановке синтеза. Реакцию проводят циклически многократно повторяя синтез ферментом новых одноцепочечных фрагментов. Поскольку ддНТФ составляет 1/20, или 5% от дНТФ, а мечение включает 40-50 циклов реакции, то в конце такой линейной амплификации получается набор одиночных цепей ДНК, отличающихся по длине и заканчивающихся меченым нуклеотидом. После проведения реакции мечения проводят разделение полученных одноцепочечных фрагментов методом электрофореза в геле.

Чтобы сделать процесс проведения электрофореза удобнее, были созданы автоматические секвенаторы. Они проводят разделение флуоресцентно-меченых фрагментов ДНК в тонком капилляре, заполненном гелем.



**Рис.1.3.** Современный капиллярный автоматический секвенатор для определения последовательности нуклеиновых кислот методом Сенгера (ABI 3130xl, Applied Biosystems)

Детекция разделенных фрагментов происходит на дальнем конце капилляра за счет регистрации флуоресценции ддНТФ у проходящих через детектор молекул. В зависимости от типа дидезоксинуклеотидов прибор регистрирует свой спектр флуоресценции прибор регистрирует свой спектр флуоресценции. Анализ данных капиллярного секвенирования сводится к «прочтению» последовательных пиков флуоресценции. В настоящее время с использованием современных автоматических секвенаторов длина одного прочтения – рида - по методу Сенгера составляет 800-1000 нуклеотидов.

Изобретение автоматических секвенаторов упростило и удешевило секвенирование ДНК настолько, что к середине 1980-х годов стало возможно говорить о возможности определения полной последовательности генома человека. Это вылилось в крупное исследование – Human Genome Project (HGP), в которое были вовлечены США, Великобритания, Франция, Япония, Китай и Германия. Целью проекта, помимо определения последовательности нуклеотидов, была идентификация всех генов человека. Исследования начались в 1990 году и финишировали в 2001 году публикацией в журнале Nature. Однако более полный анализ полученных данных был закончен только в 2003 году.

Чтобы определить полную последовательность генома человека весь геном разделили на фрагменты по 150 000 пар нуклеотидов, которые вставили в искусственные бактериальные хромосомы (BAC), для каждой такой вставки7 было определено его расположение на хромосоме. Вставку каждой BAC секвенировали методом дробовика (shotgun sequencing), для чего фрагмент генома из BAC расщепляли на более короткие фрагменты – 2000-3000 пар нуклеотидов, каждый из которых субклонировали8, то есть переносили часть уже клонированной молекулы ДНК в другой клонирующий вектор9, а именно в бактериальный и определяли последовательность фрагмента методом Сенгера. Ввиду случайности фрагментации получаемые последовательности частично перекрывались, что позволяло при помощи специального программного обеспечения выбирать из отдельных прочтений BAC-вставки, а затем и целые хромосомы.

Параллельно с HGP в 1998 году секвенированием генома человека занялась компания Celera под управлением Крейга Вентера. Последовательность в 3 млрд пар нуклеотидов ее сотрудниками была получена в течение 9 месяцев в 20 раз быстрее, чем участниками HGP. Это связано с тем, что Celera стартовала на автоматических секвенаторах последнего поколения, выигрывающих по производительности. Кроме того, компания не применяла клонирование генома в BAC, а использовала метод дробовика для всего генома. Бюджет международного проекта составлял более 3 миллиардов долларов, а бюджет проекта от «Celera Genomics» всего 300 миллионов. Кроме того, в отличии от международного проекта, Крейг Вентер и «Celera Genomics» не собирались открывать доступ к полученным данным своего исследования.

**1.1.3 Гибридизация на твердой фазе (принцип комплементарности цепей ДНК)**

В конце 1980-х годов был предложен подход к определению последовательности ДНК, получивший название секвенирование путем гибридизации (sequencing by hybridization, SBH), или секвенирование на чипе. Основа метода – гибридизация меченой одноцепочечной ДНК, разрушенной до коротких фрагментов, с синтетическими олигонуклеотидами известной структуры и определенной длины, точечно расположенными на подложке. На подложке присутствуют все возможные варианты последовательности олигонуклеотида данной длины. Условия гибридизации подбирают так, чтобы только полностью комплементарные фрагменты ДНК взаимодействовали с олигонуклеотидом на подложке. Таким образом, после удаления не связавшихся молекул ДНК можно зарегистрировать сигнал в тех позициях чипа, где находится олигонуклеотид, последовательность которого есть в секвенируемом образце ДНК. Полученный гибридизацией паттерн можно использовать для восстановления исходной последовательности путем сборки перекрывающихся участков сработавших проб.

Из-за низкой дискриминирующей способности гибридизационного подхода – невозможно подобрать условия, при которых к олигонуклеотидам будут «прилипать» только полностью комплементарные фрагменты, всегда найдутся GC-богатые участки, которые будут гибридизоваться и при наличии одного или даже нескольких неспаренных оснований – метод SBH пока не нашел практического применения в секвенировании ДНК.  
Однако алгоритмы, разработанные авторами этого метода для сборки коротких прочтений в более длинные фрагменты, стали основой для последующих алгоритмов высокоскоростной сборки и выравнивания.

**1.1.4 Пиросеквенирование (регистрация акта присоединения нуклеотида по образующемуся пирофосфату)**

В 1996 году специалисты Королевского технологического института в Стокгольме Мустафа Рональди и Пол Нирен опубликовали подход к секвенированию ДНК, в основе которого лежит принцип регистрации пирофосфата, возникающего в результате присоединения очередного нуклеотида ДНК-полимеразой. Для детекции выделяющегося в процессе образования фосфодиэфирной связи пирофосфата авторы предложили использовать каскад последовательных химических реакций, заканчивающийся высвечиванием кванта света. Этот метод позволяет определять нуклеотидную последовательность фрагментов геномной ДНК размером 300–500 пар оснований.

Сначала любым методом создается иммобилизованная клональная библиотека10 одноцепочечных фрагментов ДНК на твердой фазе. Предварительно ко всем фрагментам нуклеиновой кислоты присоединяют адаптер11, на который будет гибридизоваться праймер12. Праймер будет служить затравкой для синтеза ДНК-полимеразой комплементарной цепи. Дальше реакция состоит из последовательных циклов, в процессе которых к исходной ДНК по очереди добавляют дНТФ всех четырех типов. В случае если на секвенируемой цепи ДНК имеется комплементарный данному нуклеотид, в процессе формирования ДНК-полимеразой фосфодиэфирной связи побочным продуктом реакции станет пирофосфат.

Он активирует каскад химических реакций, в результате которых возникает световой сигнал, интенсивность которого прямо пропорциональна числу включенных в цепь нуклеотидов. Если подряд идут несколько одинаковых нуклеотидов, сигнал будет ярче. В ячейке присутствуют АТФ-сульфурилаза, люцифераза и апираза, осуществляющие ферментативные реакции, а также вместе с ними присутствуют аденозинсульфофосфат (APS) и люциферин (стехиометрически выделившийся пирофосфат вместе с АСФ при помощи АТФ-сульфурилазы образует АТФ, являющийся источником энергии для проведения люциферазой реакции окисления люциферина в оксилюциферин, в процессе которой генерируется свет в видимом спектре в количестве, пропорциональном количеству включенных нуклеотидов. Световой сигнал обычно детектируется ПЗС-матрицей, аналогичной матрице, встроенной в фотоаппарат, и анализируется с помощью програмного обеспечения, преобразующего пирограмму в последовательность нуклеотидов. Нуклеотиды, которые не вовлечены в синтез новой цепи, и АТФ деградируются с помощью апиразы. После этого можно начинать следующий цикл – добавлять другой тип нуклеотида.

Позднее авторы этого метода усовершенствовали технологию, предложив сочетание пиросеквенирования с эмульсионной полимеразной цепной реакцией (эПЦР). эПЦР проводится в капельках масла, содержащих смесь для осуществления ПЦР, которая и проходит отдельно в каждой капельке эмульсии. Капелька эмульсии с ДНК называется микросфера. На принципе пиросеквенирования основана коммерческая технология 454 Life Sciences компании Roche.

**1.1.5 Полупроводниковое секвенирование**

Полупроводниковое секвенирование – это метод определения последовательности ДНК, основанный на регистрации ионов водорода, выделяющихся при синтезе ДНК ферментом.

Сначала любым методом создается иммобилизованная клональная библиотека одноцепочечных фрагментов ДНК на твердой фазе, таким образом, чтобы метод создания позволял отделить каждую колонию ДНК от других так, чтобы выравнивание pH, в случае его изменения в районе колонии, происходило достаточно медленно. При использовании эПЦР это обеспечивается закатыванием микросфер в микрореакторы, в каждом реакторе помещается только одна частица. Реакторы сообщаются только одной поверхностью на проточном чипе.

Секвенирование начинают с отжига праймера, который комплементарен адаптеру на одном из концов библиотеки ДНК. Затем к микрореакторам с микросферами по очереди добавляют обычные нуклеотиды. Если добавленный нуклеотид комплементарен матрице, ДНК-полимераза встраивает его в синтезируемую цепь. В результате этой реакции выделяется пирофосфат и протон, вызывающий локальное изменение водородного показателя раствора в микрореакторе, которое детектируется сенсором, подключенным к каждому микрореактору. В случае, если нуклеотид не комплементарен матрице, то сигнал отсутствует. После каждого добавленного нуклеотида прибор промывает систему от остатков не включившихся дНТФ данного типа. У полупроводникового секвенирования есть трудности с детекцией гомополимерных участков – в случае протяженного мононуклеотида, например ТТТТТТТ, сигнал теряет дискретность, определение количества нуклеотидов становится трудным.

Важным отличием полупроводникового секвенирования от пиросеквенирования и других методов является отсутствие оптического детектора сигнала. Это значительно упрощает и удешевляет конструкцию прибора. Оптическая детекция осуществляется встроенным в секвенатор микроскопом и имеет ограничения, которые связаны с полем зрения этого микроскопа и его разрешающей способностью. Детекция на полупроводниковом чипе такого ограничения практически не имеет.

На этом методе основана коммерческая технология Ion Torrent от Life Technologies Thermo Fisher Scientific.

**1.2 Методы, основанные на детекции сигнала от одной молекулы ДНК (секвенирование одиночных молекул ДНК)**

Эти методы отличаются отсутствием этапа клональной амплификации библиотеки или фрагмента ДНК. Это упрощает методику, а главное, убирает один из этапов искажения исходного материала – в перечисленных выше методах определяется последовательность не исходной ДНК, а ее 20-ой копии. С другой стороны, регистрация сигнала от одной молекулы нуклеиновой кислоты накладывает высокие требования к соответствующим детекторам.

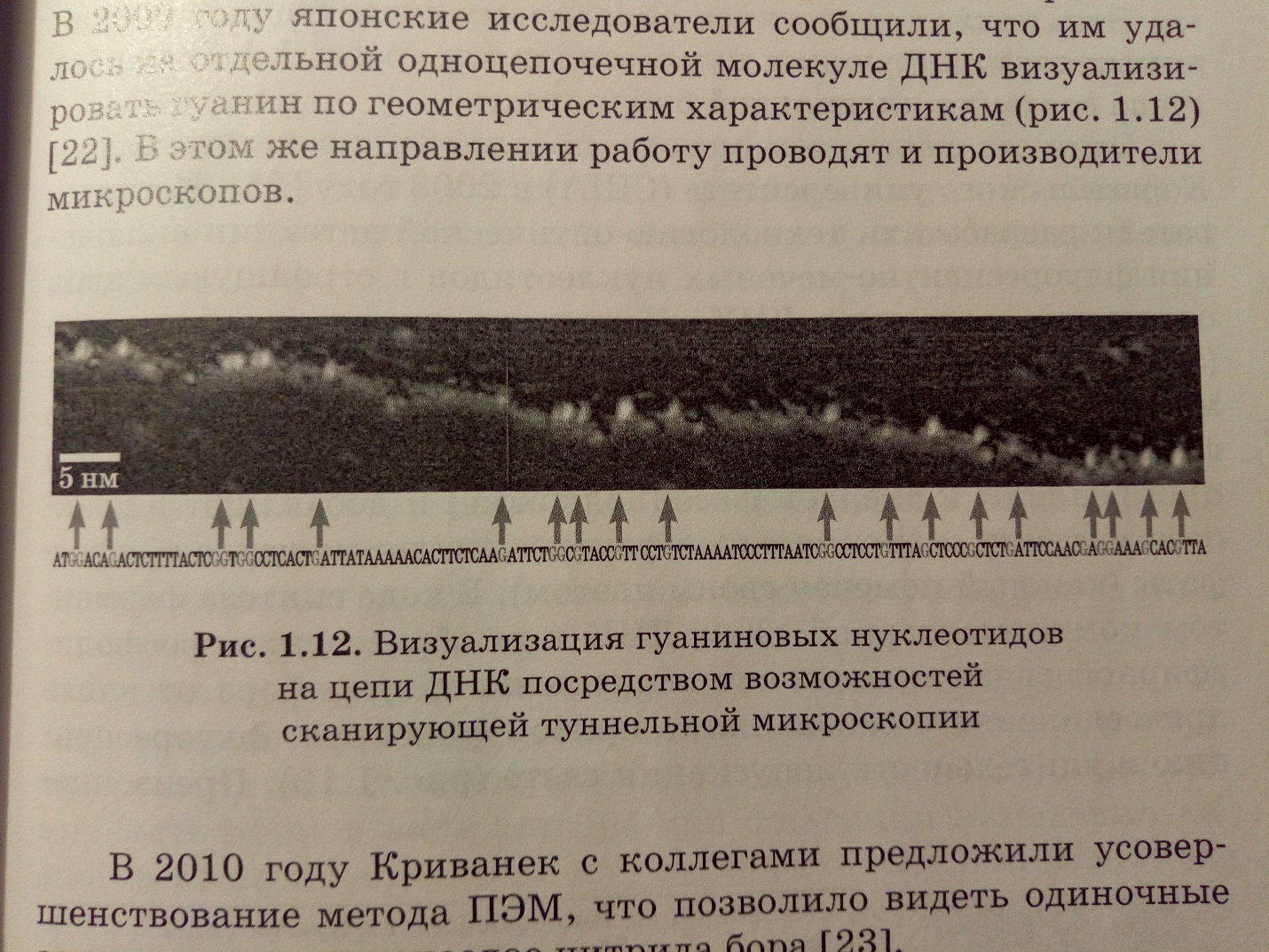
Ряд авторов называют методы, описанные ниже, технологиями третьего поколения.

**1.2.1 Секвенирование при помощи электронного микроскопа**

В конце 50-х годов ХХ века Ричард Фейнман предложил метод секвенирования, предполагающий использование электронного микроскопа. В электронной микроскопии можно выделить три технологических разновидности: сканирующая электронная микроскопия (СЭМ, SEM), просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ, TEM), и сканирующая просвечивающая электронная микроскопия (СПЭМ, STEM).

В двух последующих десятилетиях методы ПЭМ активно разрабатывались, тогда же разрабатывали и подходы для определения последовательности в ДНК. В 1970 году Альберт Крю предложил метод визуализации в сканирующем электронном микроскопе (high-angle annular dark-field imaging, HAADF). Использование этой техники дает возможность обнаружить отдельные тяжелые атомы на тонких пленках аморфного углерода. Визуализировать отдельные основания в ДНК можно, пометив их атомами тяжелых металлов. Методом не пользовались и не пользуются на практике, ввиду быстрого разрушения молекулы ДНК пучком электронов.

В 1990-х годах получила широкое распространение технология секвенирования с помощью метода сканирующей туннельной микроскопии, однако возможность воспроизвести результаты секвенирования была достаточно низкой, в какой-то момент принимать к публикации исследования перестали. В 2009 году японские исследователи сообщили, что им удалось на отдельной одноцепочечной молекуле ДНК визуализировать гуанин по геометрическим характеристикам.



**Рис.1.4** Визуализация гуаниновых нуклеотидов на цепи ДНК посредством возможностей сканирующей туннельной микроскопии

В 2010 году Криванек с коллегами предложили усовершенствование метода ПЭМ, это позволило видеть одиночные замены атомов в монослое нитрида бора.

Теоретически электронная микроскопия может обеспечить чрезвычайно длинные прочтения, это важно для сборки эукариотических геномов, в основном состоящих из повторяющихся последовательностей. В 2012 году коллектив ученых из Гарвардского университета, Университета штата Нью-Гемпшир и компании ZS Genetics продемонстрировал возможность прочтения длинных последовательностей при помощи электронной микроскопии, однако подобные технологии пока далеки от широкого коммерческого применения.

**1.2.2 Секвенирование путем протаскивания ДНК через нанопоры**

Идея этого метода была предложена Касьяновичем в 1996 году. Принцип метода заключается в регистрации изменений ионного тока, вызванных прохождением одноцепочечной ДНК через нанопору в тонкой пленке под действием электрического поля. Поры могут быть биологическими, например, могут использовать клеточную мембрану с порой, а могут быть искусственными, это могут быть поры в виде сенсора для фиксации изменения какой-либо характеристики – туннельного тока, емкости, ионного тока, флуоресценции и т.д. При проходе через нанопору каждый тип азотистых оснований по-своему «закрывает» пору и влияет на ток. Предварительные результаты показали возможность различать длинные гомополимерные отрезки, например, 30 аденинов за ними 70 цитозинов. Однако короткое время прохождения основания сквозь пору и тепловые колебания пока не позволяют определять количество стоящих подряд однотипных нуклеотидов, метод не получил практического применения.

Дальше всех в разработке технологий секвенирования путем протаскивания ДНК через нанопоры продвинулась компания Nanopore, заявившая выпуск секвенатора в 2013 году, но на начало 2014 года коммерческого варианта технологии на рынке не появилось. Разработкой занимаются также и другие компании.  
Основная проблема – высокая чувствительность к факторам внешней среды, в результате чего происходит разрыв билипидного слоя, в котором находятся поры.

**1.2.3 Секвенирование методом спектроскопии комбинационного рассеяния**

Комбинационное рассеяние (эффект Рамана) – неупругое рассеяние оптического излучения на молекулах вещества, сопровождающееся заметным изменением частоты излучения. В случае комбинационного рассеяния света в спектре рассеянного излучения появляются спектральные линии, которых нет в спектре первичного, возбуждающего света. Число и расположение этих линий определяется молекулярным строением вещества. Спектроскопия комбинационного рассеяния света, или рамановская спектроскопия – эффективный метод химического анализа, изучения состава и строения веществ.

В 2007 году немецкий исследователь Волкер Дэкерт показал, что с помощью этой методики, или методики TERS (tip-enhanced raman spectroscopy) можно, пройдя по цепочке РНК, определить по спектрам, какие нуклеотиды находятся в цепи. За счет усиления сигнала комбинационного рассеяния на таких металлах, как золото и серебро, получается спектр, который можно детектировать. По усиленному таким образом спектру удается расшифровать последовательность нуклеотидов со всеми модификациями, так как спектр содержит необходимую информацию. Через 5 лет после своей первой работы Дэкерт на одной из конференций показал работу, где он различил отдельные модификации на молекуле ДНК.

Сейчас работы в этом направлении ведутся крупнейшими компаниями, такими как Intel, IBM, HP. Intel пытается секвенировать ДНК с помощью разбиения ее на отдельные нуклеотиды и последующим получением сигнала с наночастиц серебра.

**1.2.4 Использование обратимых терминирующих нуклеотидов на одиночных молекулах нуклеиновых кислот (регистрация каждого присоединенного нуклеотида по отщепляемой метке)**

Один из вариантов был предложен исследователями Корнелльского университета в 2003 году, они разработали технологию оптической детекции включения флуоресцентно-меченых нуклеотидов в строящуюся цепь одной молекулы ДНК. Используя принципы ближнего поля с апертурой в несколько нанометров, становится возможно регистрировать флуоресценцию единственного флуорофора. Для секвенирования ДНК-полимеразу прикрепляют к твердой фазе, затем добавляют в реакцию матрицу и специальные флуоресцентно-меченые нуклеотиды, каждый из которых помечен своим светом. В процессе синтеза комплементарной цепи ДНК при образовании фосфодиэфирной связи происходит отщепление флуорофора от вновь присоединенного основания. Прибор фиксирует флуоресценцию и длительность.  
Преимущества этого метода в возможности читать очень длинные фрагменты ДНК – десятки тысяч нуклеотидов – и теоретическая возможность определять модифицированные азотистые основания.

Компания Helicos Biosciences предложила другой метод, но он по сути отличается лишь принципом регистрации сигнала: компания использует четыре лазера и систему, схожую с конфокальным микроскопом.

На этом методе секвенирования основаны технологии PacBio (Pacific Bioscience) и HeliScope (Helicos Biosciences).

**1.2.5 Другие методы секвенирования**

Кроме выше перечисленных подходов есть множество менее технически и идейно проработанных методов: метод колебаний, секвенирование при помощи вращающегося поля и т.д.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ:

1 - **Амплификация** - процесс образования дополнительных копий участков хромосомной ДНК.

2 - **Хроматография** - метод выделения, разделения и идентификации близких по химическим свойствам веществ.

3 - **Агент** - действующий фактор в каком-либо процессе или явлении.

4 - **Рентгеноструктурный анализ** - один из дифракционных методов исследования структуры вещества.

5 - **Масс-спектрометрия** - метод исследования вещества, основанный на определении отношения массы к заряду ионов.

6 - **Метилирование** – это химическая модификация, катализируемая ферментом, реакция добавления метильных  группп на ДНК.

7 - **Вставка** - чужеродный ген, вносимый в клетку.

8 - **Субклонирование** — перенос части уже клонированной молекулы ДНК в другой клонирующий вектор. С. используют для секвенирования длинных фрагментов ДНК, а также для получения различных сложных генно-инженерных конструкций.

9 - **Вектор** — это последовательность ДНК, в которую вшивается вставка.

10 **- Библиотека (банк) генов** — это набор фрагментов ДНК, в котором представлены все (или определенная часть) генов организма. Библиотека генов представляет собой совокупность культур микроорганизмов (бактерий, дрожжей), в каждую клетку которых введен вектор, несущий один из фрагментов генома организма.  
Библиотеку генов можно длительно хранить (в замороженном состоянии) и, по необходимости, выделять отдельные микроорганизмы, содержащие фрагменты ДНК с нужными генами, и клонировать их.

11 - **Адаптер** — синтетический двухцепочечный олигонуклеотид с одним тупым и одним липким концами или с двумя липкими концами; после пришивания А. тупым концом к ДНК-мишени последнюю можно затем встраивать в подходящий вектор, используя приобретенный ею от А. липкий конец;

12 - **Праймер** - это короткий фрагмент нуклеиновой кислоты, комплементарный ДНК- или РНК-мишени, служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы.