

## ПРОГРАММА

### спецкурса "ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ"

для биологов и химиков 4 курса ФЕН. Лектор – проф. С.Н. Щелкунов. (32 часа).

**1.1. "ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ".** Естественно-научный раздел, вузовская компонента

1.2. Дисциплина *предназначена* для ознакомления студентов с современными представлениями о новейшей области экспериментальной молекулярной биологии – генетической инженерии. *Основной целью* дисциплины является свободная ориентация студентов в проблематике генетической инженерии бактерий, дрожжей, животных и растений. *Для достижения этого* выделяются задачи: а). информировать студентов об основных подходах и методических достижениях генетической инженерии; б). дать представления о молекулярных векторах различных систем клонирования генов; в). дать представления о методах создания суперпродуцентов белков в прокариотических и эукариотических системах; в). ознакомить с подходами по созданию современных безопасных противовирусных вакцин методами генетической инженерии; г) дать представление о методах создания трансгенных животных и растений

1.3. По окончании изучения курса студент должен *иметь представление* о проблематике генетической инженерии и *знать* основные понятия, методический арсенал и достижения генетической инженерии

1.4. Итоговый контроль: экзамен

## 2. Содержание дисциплины

2.1. Курс основан на новейших данных о методических возможностях и достижениях генетической инженерии. Аналогичные курсы в России мне не известны

2.2. Тематический план курса

Наименование разделов и тем	Лекции (часов)			Самостоятельная работа	Всего часов
<i>Ферменты генетической инженерии</i>	2			1	3
<i>Общие принципы клонирования генов</i>	2			1	3
<i>Генно-инженерная система грамотрицательной бактерии E.coli</i>	6			3	9
<i>Генетическая инженерия грамположительной бактерии B.subtilis</i>	2			1	3
<i>Генно-инженерная система дрожжей S.cerevisiae</i>	2			1	3
<i>Генетическая инженерия культивируемых</i>	4			2	6

клеток животных					
Трансгенные животные и растения	2			1	3
Итого по курсу	20			10	30

### 3.3. Содержание отдельных разделов и тем

**ВВЕДЕНИЕ.** История появления и развития генетической инженерии.

**ФЕРМЕНТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ.** Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы). Изменчивость фага ●, контролируемая хозяином. Рестрикция-модификация фаговой ДНК в бактериальных клетках. Классификация ферментов рестрикции. Участок узнавания (сайт) рестриктазы на молекуле ДНК. Липкие и тупые концы фрагментов ДНК. Изошизомеры. Прототип. Методы поиска штаммов, продуцирующих рестриктазы.

ДНК-лигазы *E.coli* и фага Т4. ДНК-полимераза I *E.coli*, ее ферментативные активности. Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I. Метод репарации, направляемой праймером. Таq полимераза. Полимеразная цепная реакция. Концевая дезоксинуклеотидил трансфераза (терминальная трансфераза). РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза, ревертаза). Нуклеаза Bal31. Полинуклеотидкиназа фага Т4. Щелочная фосфатаза. Нуклеаза S1. Экзонуклеаза фага ●.

### ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНОВ

Методы конструирования гибридных молекул ДНК. Коннекторный и рестриктазно-лигазный методы. Линкерные молекулы и их использование.

Векторные молекулы ДНК. Требования, предъявляемые к молекулярному вектору. Понятия о клонирующих, интегративных и экспрессирующих векторах.

Введение молекул ДНК в клетки. Компетентность клеток физиологическая и индуцированная. Трансфекция. Трансформация биохимическая (генетическая) и онкогенная. Биохимические и физические методы трансфекции /трансформации.

Методы отбора гибридных клонов. Фенотипическая система селекции. Функциональная комплементация мутаций. Гибридизация нуклеиновых кислот *in situ*. Радиоиммуноанализ белков *in situ*.

Методы определения последовательности нуклеотидов (секвенирования) молекул ДНК.

### ГЕННО-ИНЖЕНЕРНАЯ СИСТЕМА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *ESCHERICHIA COLI*

Методы введения плазмидных и фаговых молекул ДНК в клетки *E.coli*. Получение сферопластов. Индукция компетентности клеток. Упаковка фаговой ДНК *in vitro*. Электропорация.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕКТОРЫ *E.COLI*.** Клонирование плазмидные векторы. ColE1-, pSC101-, pKN-, pUR-производные. Клонирование векторы на основе нитевидных фагов. Создание фага M13mp2 и его производных. Преимущества и недостатки векторных нитевидных фагов. Векторы на основе ДНК фага лямбда. Векторы внедрения или замещения. Емкость фаговых векторов. Селекция гибридных фагов. Космиды. Создание библиотек генов. Векторные плазмиды, обеспечивающие прямой отбор гибридных ДНК. Векторы,

обеспечивающие экспрессию клонированных нуклеотидных последовательностей в клетках *E.coli*. Разработка векторов *E.coli*, детерминирующих секрецию чужеродных белков.

**ПОДХОДЫ К ДОСТИЖЕНИЮ ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИИ БЕЛКОВ, КОДИРУЕМЫХ КЛОНИРОВАННЫМИ ГЕНАМИ.** Эффект дозы гена в экспериментах по молекулярному клонированию. Влияние на уровень экспрессии клонированных генов эффективности их транскрипции. Организация бактериальных промоторов. Сила промотора. Эффективность трансляции матричных РНК. Структура участка связывания рибосом с мРНК. Использование штаммов *E.coli* с пониженной активностью нуклеаз и протеаз. Оптимизация условий культивирования гибридных штаммов.

**ЭКСПРЕССИЯ КЛОНИРОВАННЫХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ *E.COLI*.** Сравнительный анализ организации генетического аппарата прокариот и эукариот. Экспрессия хромосомных эукариотических генов. Клонирование ДНК-копий матричных РНК и изучение их экспрессии. Клонирование химико-ферментативно синтезированных эукариотических генов.

**МУТАГЕНЕЗ ГИБРИДНЫХ ДНК.** Статистический мутагенез плазмид. Направленный мутагенез молекул ДНК. Сегмент-направленный и сайт-направленный мутагенез.

**БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ.** Получение новых форм белков сайт-направленным мутагенезом. Создание белков с гибридными свойствами. Иммунотоксины. Искусственные иммуногены. Фаговый дисплей.

**СТАБИЛЬНОСТЬ ВНЕХРОМОСОМНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК В КЛЕТКАХ *E.COLI*** Влияние условий культивирования клеток на поддержание плазмид. Структура молекулы ДНК и ее стабильность в клетке. Повторяющиеся последовательности. раг-локус. Связь копияности плазмид со стабильностью их наследования.

### **ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *BACILLUS SUBTILIS***

Трансформация клеток бацилл хромосомной ДНК. Плазмидная трансформация компетентных клеток *B.subtilis*. Введение плазмид в протопласты бацилл. Трансфекция клеток *B.subtilis*.

Клонирующие векторы *B.subtilis* на основе плазмид *Staphylococcus*. Векторная система бацилл на основе плазмид *Streptococcus*. Использование плазмид *Bacillus* в качестве векторов. Челночные векторные плазмиды, реплицирующиеся как в *B.subtilis*, так и в *E.coli*. Плазмидные интегративные векторы. Фаговые векторы бацилл.

Некоторые особенности строения и экспрессии генов бактерий рода *Bacillus*. Экспрессия в клетках бацилл клонированных генов. Секреция из клеток бацилл чужеродных белков. Стабильность плазмид в клетках *B.subtilis*. Перспективы использования создаваемых штаммов-продуцентов бацилл в биотехнологии.

Бактериальные векторные системы с широким спектром хозяев и задачи, решаемые с их помощью.

### **ГЕНО-ИНЖЕНЕРНАЯ СИСТЕМА ДРОЖЖЕЙ**

## **SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Генетическая организация дрожжей-сахаромицетов. Плазмиды дрожжей 2мкм (Scp1) и 3мкм, их молекулярно-генетическая структура. Плазмидная трансформация клеток дрожжей. Получение сферопластов. Индукция компетентности клеток дрожжей.

Векторные молекулы дрожжей-сахаромицетов. Векторы интеграции (YIp-типа). Клонирование векторы (YEp-, YRp- и YCp-типа). Метод клонирования последовательностей ДНК, обеспечивающих репликацию гибридных плазмид в клетках дрожжей.

Стабильность гибридных молекул ДНК в клетках дрожжей. Метод клонирования центромерных областей дрожжевых хромосом. Клонирование генов в клетках дрожжей. Секретия чужеродных белков из дрожжевых клеток. Генно-инженерные субъединичные вакцины, продуцируемые клетками дрожжей.

## **ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ**

МЕТОДЫ ПЕРЕНОСА МОЛЕКУЛ ДНК В КЛЕТКИ ЖИВОТНЫХ. Гипертонический солевой метод. ДЭАЭ-декстрановый метод. Кальций-фосфатный метод. Использование липосом для трансфекции вирусных ДНК. Микроинъекция молекул ДНК в клетки животных. Введение плазмид и фрагментов ДНК в культивируемые клетки животных. Прямой перенос плазмид из бактерий в клетки животных. Метод прокалывания клеток. Стабильность гибридных молекул ДНК в клетках животных.

ВЕКТОРНЫЕ СИСТЕМЫ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ. Вирус SV40 как молекулярный вектор. Литические векторы. Использование вирусов помощников. Комплементирующая ранние функции SV40 культура клеток COS. Нелитические эписомные векторы. Трансформирующие векторы. Использование генома вируса полиомы для конструирования молекулярных векторов.

Введение генов в клетки животных совместно с селективным маркером, обуславливающим генетическую (биохимическую) трансформацию клеток. Генетическая трансформация мутантных линий клеток животных. Котрансформация. Доминантные амплифицируемые маркеры генетической трансформации клеток животных. Коамплификация. Эписомные векторы генетической трансформации клеток животных.

Экспрессирующие векторы на основе ортопоксвирусов. Создание живых поливалентных вакцин на основе вируса осповакцины. Типы противовирусных вакцин. ДНК вакцины.

Высокоэффективные экспрессирующие векторы на основе бакуловирусов.

## **ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ**

Методы создания трансгенных животных. Нокаутные животные. Тканеспецифичная и индуцируемая экспрессия трансгенов в организме животных. Подходы к генной терапии и перспективы развития данных исследований.

## **ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ**

Методы получения трансгенных растений. Бинарная векторная система агробактерий. Прямой перенос трансгенов в растения. Съедобные вакцины. Транспластомные растения.

### **3. Учебно-методическое обеспечение дисциплины**

#### **3.3. Образец билета**

*Билет № 1*

1. Эндонуклеазы рестрикции. Классификация ферментов рестрикции. Изошизомеры. Прототип.
2. Клонирование векторы на основе нитевидных фагов. Создание фага M13mp2 и его производных. Преимущества и недостатки векторных нитевидных фагов.

**3.4. ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА**

1. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: Учеб. пособие: В 2 ч. - Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 1994; 1997.
2. Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. Краткий курс. М., Мир", 1986.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА**

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., "Мир", 1984.
2. Клонирование ДНК. Методы: Пер. с англ./ Под ред. Д.Гловера. - М.:Мир, 1988.
3. Новое в клонировании ДНК. Методы: Пер. с англ./ Под ред. Д.Гловера. - М.:Мир, 1989.