

**Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)**

СОГЛАСОВАНО:
Ученый совет ИБХ РАН
Протокол № от « » 2021 г.

УТВЕРЖДАЮ:
Директор ИБХ РАН

Ученый секретарь
д.ф.-м.н. В.А.Олейников

академик А.Г.Габибов

от « » 2021 г.

от « » 2021 г.

**РАБОЧАЯ ПРОГРАММА
по дисциплине
ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

Направление подготовки:

1.5. Биологические науки

Направленность (профиль) программы:

1.5.4. Биохимия

1.5.6. Биотехнология

1.5.3. Молекулярная биология

Направление подготовки:

1.4. Химические науки

Направленность (профиль) программы:

1.4.9. Биоорганическая химия

Уровень высшего образования: подготовка научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре

Квалификация выпускника: Исследователь. Преподаватель-исследователь.

Форма обучения: очная

Москва – 2021

Составители курса: д.х.н. Смирнов И.В.

Рабочая программа составлена на основании федеральных государственных образовательных стандартов высшего образования (ФГОС ВО), разработанных для реализации основных профессиональных образовательных программ высшего образования - программ подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению 1.5. Биологические науки, 1.4. Химические науки.

Согласно ФГОС ВО по направлению подготовки 1.5. Биологические науки, 1.4. Химические науки (уровень подготовки кадров высшей квалификации) и учебному плану аспирантов, разработанного на основе этих требований, дисциплина «Основы генной инженерии» является обязательной учебной дисциплиной обязательной части Блока 1 образовательной программы по направленности (профилю) 1.5.4. Биохимия, 1.5.6. Биотехнология, 1.5.3. Молекулярная биология и 1.4.9. Биоорганическая химия. Объём курса составляет 36 академических часов (1 зачетная единица), из них 12 академических часов лекций, 20 часов самостоятельной внеаудиторной работы аспирантов, включая подготовку к дифференцированному зачету и 4 часа на контроль знаний.

I. Цели и задачи изучения дисциплины.

Генная инженерия или технология рекомбинантных ДНК - изменение с помощью биохимических и генетических методик хромосомного материала - основного наследственного вещества клеток. Генная инженерия играет важную роль в формировании у будущих исследователей и преподавателей научного мировоззрения и современного биолого-химического мышления, достаточной теоретической базы для успешного усвоения аспирантами общепрофессиональных и специальных дисциплин. В процессе изучения генной инженерии происходит ознакомление аспирантов с современной научной литературой, вырабатываются умение решать конкретные профессионально ориентированные задачи в объёме.

1.1. Цель курса: ознакомление основных принципов и методов генной инженерии животных и растений.

1.2. Задачи курса: рассмотрение и усвоение принципов и основных методов генной инженерии.

1.3. Связь с другими дисциплинами: Генная инженерия как наука, в той или иной степени имеет непосредственную связь практически со всеми дисциплинами, изучаемыми на протяжении всего времени овладения аспирантами образовательной программы по направлению подготовки 1.5. Биологические науки, 1.4. Химические науки. Курс «Основы генной инженерии» является обязательной дисциплиной при подготовке специалистов по направленности (профилю) Биохимия, Биотехнология, Молекулярная биология и Биоорганической химии.

II. Требования к уровню освоения дисциплины

Курс «Основы генной инженерии» знакомит с наиболее современными экспериментальными методами исследования нуклеиновых кислот. В рамках данной дисциплины углубляются и развиваются следующие компетенции:

Универсальные компетенции (УК):

- способность к критическому анализу и оценке современных научных достижений, генерированию новых идей при решении исследовательских и практических задач, в том числе в междисциплинарных областях (УК-1);
- способность планировать и решать задачи собственного профессионального и личностного развития (УК-5).

Общепрофессиональные компетенции (ОПК):

- способность самостоятельно осуществлять научно-исследовательскую деятельность в соответствующей профессиональной области с использованием современных методов исследования и информационно-коммуникационных технологий (ОПК-1);
- готовность организовать работу исследовательского коллектива в области химии и смежных наук (ОПК-2);
- готовность к преподавательской деятельности по основным образовательным программам высшего образования (ОПК-3).

Профессиональные компетенции (ПК):

- способность к самостоятельному проведению научно-исследовательской работы и получению научных результатов, удовлетворяющих установленным требованиям к содержанию диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук по направленности (профилю) «Биоорганическая химия» (ПК-1);
- обладание представлениями о системе фундаментальных понятий и методологических аспектов химии, форм и методов научного познания (ПК-2);
- способность приобретать новые знания с использованием современных научных методов и владение ими на уровне, необходимом для решения задач, возникающих при выполнении профессиональных функций (ПК-3);
- обладание опытом профессионального участия в научных дискуссиях, умение представлять полученные в исследованиях результаты в виде отчетов и научных публикаций (стендовые доклады, рефераты и статьи в периодической научной печати) (ПК-4);
- владение методами отбора материала, преподавания и основами управления процессом обучения фундаментальной химии в школе и вузе (ПК-5).

В результате освоения дисциплины «Основы геномной инженерии» обучающиеся должны:

Знать:

- микробиологические методы работ с микроорганизмами;
- аналитические и препаративные методы работ с нуклеиновыми кислотами;
- гено-инженерные методы работ с нуклеиновыми кислотами;
- методы работ с биомассой микроорганизмов или эукариотических клеток;
- методы критического анализа и оценки современных научных достижений, а также методы генерирования новых идей при решении исследовательских и практических задач, в том числе в междисциплинарных областях;
- современные способы использования информационно-коммуникационных технологий.

уметь:

- проводить стерильную работу с микроорганизмами в ламинарном шкафу;
- выращивать микроорганизмы на жидких и твердых питательных средах;
- проводить рассев микроорганизмов до отдельных колоний на твердых питательных средах;
- проводить подготовку микроорганизмов к длительному хранению в музее;
- анализировать микроорганизмы с помощью обычной световой и флуоресцентной микроскопии;
- проводить аналитическое разделение фрагментов ДНК электрофорезом в агарозном геле;
- выделять нуклеиновые кислоты фенольным методом, а также сорбцией на стекле с использованием коммерческих наборов;
- работать с эндонуклеазами рестрикции, ДНК-лигазой и другими ферментами нуклеинового обмена;
- проводить анализ ДНК и РНК с помощью стандартной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР в режиме реального времени;
- проводить трансформацию бактериальных и/или эукариотических клеток векторными плазмидами, проводить отбор клонов, содержащих клонируемые фрагменты ДНК;
- анализировать нуклеиновые кислоты гибридизацией по Саузерну или Northern-методом;

- получать библиотеки фрагментов ДНК разного происхождения и оценивать их репрезентативность;
- проводить разрушение биомассы ультразвуком или с использованием лизоцима;
- проводить очистку и электрофоретический анализ рекомбинантных белков; работать с научно-технической информацией;
- выделять и систематизировать основные идеи в научных текстах;
- критически оценивать любую поступающую информацию, вне зависимости от источника;
- при решении исследовательских и практических задач генерировать новые идеи;
- выбирать и применять в профессиональной деятельности экспериментальные методы исследования.

Владеть:

- микробиологическими методами работ с микроорганизмами;
- аналитическими и препаративными методами работ с нуклеиновыми кислотами;
- генно-инженерными методами работ с нуклеиновыми кислотами; методами работ с биомассой микроорганизмов или эукариотических клеток;
- методами биоинформатики и статистической обработки данных (компьютерным анализом аминокислотных и нуклеотидных последовательностей, анализом основных характеристик олигонуклеотидов, включая температуру плавления гибридов с матричной ДНК, самокомплементарность и т.п., использованием компьютера для статистической обработки получаемых экспериментальных данных);
- навыками выбора методов и средств решения задач исследования;
- навыками поиска (в том числе с использованием информационных систем и баз данных), обработки, анализа и систематизации информации; навыками критического анализа и оценки современных научных достижений.

III. Объем дисциплины и виды учебной работы:

Форма обучения – ОЧНАЯ

Общий объем дисциплины: 1 зачетная единица или 36 академических часов.

Всего часов	Аудиторные занятия (час), в том числе:			Самостоятельная Работа (час)	Контроль (час)
	лекции	практические занятия (семинары)	лабораторные работы		
36	12		-	20	4
	12				

Распределение аудиторных часов по темам и видам учебной работы:

№	Наименование тем и разделов (час), (с развернутым содержанием курса в том числе: по каждой теме и разделу)	Аудиторные занятия (час) в том числе	
		Лекции	Семинары
1	Предмет и задачи генной инженерии. Генная инженерия в современной жизни. Генная инженерия в лаборатории. Генно-инженерное клонирование. ПЦР. Использование ПЦР в генной инженерии.	2	
2	Экспрессия белков в дрожжевой системе.	2	
3	Векторы – молекулярно-генетические конструкции. Маркерные последовательности. Селективные маркерные гены.	2	

4	Биосинтез белка. Создание конструкций для экспрессии рекомбинантного антитела.	2	
5	Ретровирусные векторы. Способы интеграции гена в клетки растений.	2	
6	Геномные библиотеки.	2	
	Всего:	12	
	Итого:		12

IV. Содержание курса

Раздел 1.

Предмет и задачи генной инженерии Полимеразная цепная реакция

Предмет и задачи генной инженерии Основоположники генной инженерии В. Арбер, Д. Натанс, Х. Смит, П. Берг, У. Гилберт, Ф. Сенгер. Их вклад в развитие данного направления исследований. Генная инженерия в современной жизни. Генная инженерия в лаборатории. Генно-инженерное клонирование. ПЦР. Использование ПЦР в генной инженерии. Общая схема ПЦР. Устройство современного амплификатора. Компоненты реакционной смеси, необходимые для проведения ПЦР. Особенности конструирования праймеров. Факторы, влияющие на точность синтеза ДНК и возможности ее повышения.

Раздел 2.

Экспрессия белков в дрожжевой системе

Дрожжевые векторы. Схема рекомбинации. Создание конструкций для экспрессии рекомбинантного антитела. Трансфекция. Получение ноакутов на примере мыши нокаутной по БуХЭ. Бакуловирусная экспрессия.

Раздел 3.

Вектора, молекулярно-генетические конструкции

Вектора для переноса генетического материала в клетки живых организмов. Маркерные последовательности. Селективные маркерные гены.

Раздел 4.

Экспрессия белков в прокариотической системе

Проблемы при синтезе белка. Экспрессия белков в прокариотической системе. Синтез м-РНК. Промоторы. Транскриптом и необходимость его изучения. Виды РНК, кодируемых геномами прокариот и эукариот.

Раздел 5.

Ретровирусные векторы. Способы интеграции гена в клетки растений.

Жизненный цикл ретровируса. Экспрессия в клетках растений. Способы интеграции гена в клетки растений. Ретровирусные векторы. Жизненный цикл ретровируса. Экспрессия в клетках растений. Способы интеграции гена в клетки растений. Генно-инженерные методы

в белковой инженерии. Кластеры (теги) для верификации и очистки рекомбинантных белков.

Раздел 6. Геномные библиотеки

Вектора для клонирования библиотек генов и способы их доставки. Бактериофаги. Фаговый дисплей. РНК дисплей (SELEX). Мишени аптамеров. Клеточный дисплей. Мутагенез библиотек.

V. Самостоятельная работа

Предусмотрено самостоятельное изучение отдельных вопросов лекционного курса дисциплины «Основы клеточной биологии» в виде проработки лекционного материала и соответствующих разделов курса по учебникам.

VI. Итоговая проверка знаний

Учебный план по дисциплине «Основы генной инженерии» предусматривает контроль знаний в форме дифференцированного зачета с выставлением оценок в пятибалльной системе.

Вопросы для дифференцированного зачета:

1. Рестриктазное картирование ДНК с использованием концевой метки. Картирование с помощью двух рестриктаз.
2. Антитела, обладающие каталитической активностью. Принципы получения абзимов.
3. Мутагенез с использованием олигонуклеотидов: метод Т.А. Кункеля; метод ПЦР с перекрывающимися праймерами; мегапраймеры в направленном мутагенезе.
4. Механизм ингибирующего действия антисмысловых нуклеиновых кислот: участие РНКазы H, дезаминирование остатков аденина расплетающим ферментом; РНК интерференция.
5. ДНК-метиلاзы, их использование для получения крупных рестрикционных фрагментов ДНК. ДНК-лигазы. Механизм лигирования ДНК T4-ДНК-лигазой.
6. Количественная ПЦР (ПЦР в реальном времени). Области применения метода.
7. ДНК-зависимая ДНК-полимераза 1 *E. coli* и ее фрагмент Кленова. Их использование для введения концевой радиоактивной метки, «затупления» концов ДНК и ник-трансляции. Термостабильные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы.
8. Триплекс-образующие олигонуклеотиды и их использование для регуляции экспрессии генов и направленного мутагенеза.
9. Этапы клонирования ДНК. Клонирование фрагментов ДНК по сайтам рестрикции, а также с использованием адаптеров и коннекторов.
10. Два подхода к клонированию человека - репродуктивное и терапевтическое клонирование.
11. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Стандартные условия проведения ПЦР. Наиболее критические параметры реакции. Разновидности ПЦР: метод «горячего старта», ОТ-ПЦР, амплификация длинных фрагментов ДНК, методы повышения точности амплификации.
12. Принципы получения трансгенных животных. Использование эмбриональных стволовых клеток в трансгенезе.
13. Понятие вектора и его емкости. Селектируемые маркеры. Полилинкер. Функциональная классификация векторов: экспрессирующие векторы, челночные (бинарные) векторы. Особенности строения плазмидах векторов.
14. Антисмысловые РНК и олигонуклеотиды. Механизмы ингибирующего действия на

экспрессию генов. Области применения этой технологии.

15. Векторы на основе хромосомы фага λ . Их использование для получения клонотек нуклеотидных последовательностей.

16. Генный нокаут. Исследование функций генов и моделирование наследственных заболеваний с помощью генного нокаута.

17. Рестриктазные карты и их построение. Гибридизация по Саузерну. Концепция STS маркеров. Контиги. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей.

Электронная ПЦР.

18. Ретровирусные векторы. Принципы адресной доставки трансгенов. Управление экспрессией трансгенов в клетках-мишенях.

19. Космиды и фазмиды в качестве векторов. Их емкость, области применения в генной инженерии.

20. Стратегии выделения новых генов и оптимизации их экспрессии.

21. Клонотеки к ДНК, генов и нуклеотидных последовательностей. Их репрезентативность. Способы введения ДНК в клетки: трансформация, трансфекция, электропорация.

22. Олигонуклеотидные аптамеры. Их получение и применение.

23. Методы отбора последовательностей из клонотек ДНК. Гибридизация с зондами. Использование ПЦР. Использование антител и функциональные тесты.

24. Исследование экспрессии генов. Нозерн-блоттинг. Защита мРНК от действия РНКаз. Анализ регуляторных последовательностей ДНК. Футпринтинг в исследовании ДНК белковых взаимодействий.

25. Сверхъемкие векторы YAC, BAC и PAC. Их использование для получения клоновой геномной ДНК.

26. Рестриктазы. Их номенклатура и классификация. Рестриктазы II типа – основной инструмент генной инженерии. Формы разрывов двухцепочечных ДНК, возникающих под действием рестриктаз. Изошизомеры. Изменение субстратной специфичности рестриктаз в неоптимальных условиях.

27. РНК-зависимые ДНК-полимеразы (обратные транскриптазы), их использование для получения кДНК. Клонотеки кДНК.

28. Причины низкой эффективности клонирования животных.

29. Предмет и задачи генной инженерии. Основоположники генной инженерии В. Арбер, Д. Натанс, Х. Смит, П. Берг, У. Гилберт, Ф. Сэнгер.

30. Два подхода к анализу дифференциальной экспрессии генов на уровне транскрипции при использовании микрочиповых технологий.

31. Денатурация и ренатурация ДНК. Температура плавления. Кинетика плавления и кривые

плавления ДНК. Гибридизация. Гибридизация по Саузерну и Северный блоттинг.

32. Основные этапы получения трансгенных растений.

33. Методы выделения ДНК и РНК.

34. Способы введения трансгенов клетки растений. Особенности трансформации протопластов.

35. Сравнение популяций мРНК методом серийного анализа экспрессии генов (SAGE).

36. Использование агробактерий и Ti-плазмид для получения трансгенных растений.

37. Секвенирование ДНК по методу Сэнгера.

38. Принципы высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК.

39. Системы секвенирования ДНК второго поколения. Создание молекулярных клонов секвенируемой ДНК: полимеразные колонии и кластеры на твердой подложке.

40. Системы секвенирования ДНК третьего поколения: секвенирование отдельных молекул ДНК.

41. Пиросеквенирование. Секвенирование лигированием. Обратимые терминаторы синтеза ДНК и особенности их структуры.

42. Три типа векторов, используемых при агробактериальной трансформации клеток растений: «обезоруженная» Т-ДНК, коинтеграты Ti-плазмид и бинарные векторы.
43. Трансформация хлоропластов для получения трансгенных (трансплантомных) растений. Мультигенная инженерия.
44. Дифференциальный дисплей и его использование для сравнения популяций мРНК.
45. Анализ репрезентативных различий в мРНК (метод RDA).
46. Гибридомы и получение с их помощью моноклональных антител. «Очеловеченные» животные.
47. Методы введения в ДНК случайных мутаций. ДНК-шаффлинг.
48. Биолюминесценция в природе. Зеленый флуоресцирующий белок и его аналоги.

VII. Учебно-методическое обеспечение дисциплины

Рекомендуемая литература для освоения теоретического курса

Основная литература:

1. Кребс Д., К. Стивен, Г.Эллиот. Гены по Льюису. Издательство Лаборатория знаний. М. 2022.
2. Албертс Б., Брей Д. et.al. Основы молекулярная биология клетки. М., Лаборатория знаний. 2018.
3. Jones M. The invention of recombinant DNA technology. Berg, Boyer, Cohen. Life sciences at Chemical Heritage Foundation 2015.
4. Doogab Yi. The Recombinant university: genetic engineering and the emergence of Stanford biotechnology. University of Chicago Press, 2015. 304 p.
5. Regalado A. The World's most expensive medicine is a bust. MIT Technology Review. 2016.
6. Heidi Ledford. Broad Institute wins bitter battle over CRISPR patents. Nature. 542, 401-401. 2017.
7. McDivitt P. Green technology: Disease-resistant GMO tomato that could eliminate need for copper pesticides, double yields—blocked by public fears. Genetic Literacy Project. 2017.

Дополнительная литература:

1. Genetic Engineering: Principles and Methods (J.K. Setlow ed.) Vol. 1 – Vol. 28. Springer.
2. Functional Nucleic Acids for Analytical Applications (Y. Li, Y. Lu Eds.) Springer, 2009.
3. From Nucleic Acids Sequences to Molecular Medicine (V.A. Erdmann, J. Barciszewski Eds) Springer, 2012.
4. Giacca M. Gene Therapy. Springer, 2011.