Н. В. Цымбаленко, Е. Е. Прохорова, Г. Л. Атаев

КУРС «БИОТЕХНОЛОГИЯ» ДЛЯ СТУДЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ УНИВЕРСИТЕТОВ

Рассматривается разработанный на кафедре зоологии факультета биологии РГПУ им. А. И. Герцена курс биотехнологии и возможности его внедрения в обучение студентов биологических специальностей университетов. Биотехнология — это стремительно развивающаяся область научной и практической деятельности человека, одно из направлений нанотехнологий, которое обеспечивает использование биологических объектов для создания и модификации продуктов или процессов различного назначения и позволяет наиболее полно реализовать возможности живых организмов или их производные. Задачами курса «Биотехнология» являются знакомство студентов с современной достижениями этой отрасли, а также овладение практическими умениями, необходимыми в дальнейшей профессиональной деятельности; формирование целостного представления о возможностях применения полученных знаний и навыков для решения конкретных задач.

Ключевые слова: биотехнология, биологическое образование, молекулярная биология, технология рекомбинатных ДНК.

N. Tsymbalenko, E. Prokhorova, G. Ataev

COURSE «BIOTECHNOLOGY» FOR THE BIOLOGICAL SPECIALIZATION OF UNIVERSITIES

The course of biotechnology developed at the zoological department of the Herzen State Pedagogical University for university's biological specialties is considered. Biotechnology is a swiftly developing area of the scientific and practical activities, one of the nanotechnology's directions. The main purpose of the biotechnology is considered in the most effective using of biological object's resources and possibilities for creating and modifications of commodities. The chief tasks of discipline "Biotecnology" are acquaintance of students with contemporary advances of this area of science and developing of professional practical abilities in biotechnology.

Keywords: course of biotechnology, students, professional practical abilities.

Основной целью современного высшего образования является подготовка специалистов, обладающих не только глубокими фундаментальными знаниями по базовым дисциплинам, но и умением эффективно применять их в практической профессиональной деятельности. В связи с этим актуально введение в учебные планы естественнонаучных факультетов дисциплин, знакомящих будущих специалистов с наукоемкими технологиями. В частности, достижения современной биологии потребовали не только значительных корректив в преподавании различных биологических дисциплин, но и появления новых предметов. В последние годы на кафедре зоологии РГПУ им. А. И. Герцена разработан и внедрен в учебный процесс ряд курсов, ориентирующих студентов в проблемах и методах современной биологии [1]. Одной из таких дисциплин является «Биотехнология».

Актуальность введения в учебный план данной дисциплины формально подтверждена на состоявшихся в 2009 году Пятом Московском международном конгрессе «БИОТЕХНОЛОГИЯ: состояние и перспективы развития» и 7-й Международной специализированной выставке «МИР БИОТЕХНОЛОГИИ — 2009». Среди организаторов этого форума значилось и Министерство образования и науки РФ [2].

Курс «Биотехнология» входит в учебную программу V курса специалитета факультета биологии, I курса магистратуры и VI курса отделения заочного обучения и Института естествознания. Во всех случаях освоение курса предполагает предварительное знакомство студентов с курсами цитологии, генетики, биохимии и молекулярной биологии.

***Цель курса*:** обеспечить приобретение профессиональной компетентности в области биотехнологии путем формирования системы знаний и представлений о данной отрасли как одного из современных наукоемких направлений деятельности человека, которое базируется на обширных фундаментальных знаниях физики, химии, биологии, медицины, технологии производства, экологии, социологии и права.

Соответственно в курсе биотехнологии решаются следующие задачи:

1. Сформировать у студентов *общенаучные (информационные)* компетенции в области биотехнологии:

- сформировать систему знаний об основных достижениях общебиологических наук (биохимии, общей генетики, микробиологии, цитологии, физиологии, молекулярной биологии), используемых в биотехнологии;
- сформировать представление о современном состоянии отраслей биотехнологии и их влиянии на жизнь человека;
- обеспечить овладение знаниями по основам молекулярной биотехнологии;
- обеспечить становление представлений о методах современных биотехнологических исследований и знакомство с современными методами технологии рекомбинантных ДНК, на которых базируется развитие прикладной биотехнологии;
- обеспечить овладение практическими умениями и навыками профессиональной оценки достижений биотехнологии, включая их практическую ценность, целесообразность, этическую допустимость и правовую обеспеченность;
- выработать умения и навыки самостоятельного приобретения знаний в области биотехнологии, переработки и адаптации информации к различным уровням образований в соответствии с принципами научности и доступности.

2. Сформировать у студентов *инструментальные компетенции*, в том числе:

- обеспечить овладение подходами и методами, используемыми в биотехнологии (методы технологии рекомбинантной ДНК, культивирования клеток и тканей; статистический и компьютерный анализ данных);
- обеспечить овладение современными информационными и коммуникативными технологиями для поиска, хранения и представления информации по проблемам биотехнологии;
- способствовать развитию способностей к творчеству, к научно-исследовательской работе, к самостоятельной работе с литературой и к анализу получаемой информации для применения ее в дальнейшей практической деятельности;
- сформировать умение критически оценивать достоинства и потенциальные опасности новых или модифицированных биотехнологических разработок.

3. Сформировать *коммуникативные*, *социально-личностные* и *общекультурные компетенции* студентов, в том числе:

- развить способности к адаптации в современной информационной среде по нанотехнологиям;
- обеспечить овладение терминологией и основами речевой коммуникации в профессиональной среде, сформировать навыки обсуждения современного состояния биотехнологии;
- сформировать умения работы в группе; подготовить студентов к профессиональной деятельности в научно-исследовательском и педагогическом коллективах;
- сформировать представление о биотехнологии как мощном факторе адаптивной эволюции человека, ускоряющем масштабы антропогенного воздействия на живую природу.

Принципы построения программы курса

Программа курса в основном имеет линейную структуру и требует последовательного изучения материала. Только на заключительном этапе освоения курса студентам предлагается на выбор углубленное знакомство с различными разделами практической биотехнологии. Дифференцированный подход может быть осуществлен за счет лекционного материала или самостоятельной подготовки студентами докладов и рефератов.

Содержание основной части учебного курса «Биотехнология» распределяется между лекционной и практической частями на основе принципов фундаментальности, интегрированности и дополнительности.

Лекционный материал включает мультимедийное сопровождение, обеспечивающее наглядность материала курса (рисунки, схемы процессов, фотографии, видеоматериалы). Особое внимание уделено демонстрации методических подходов с разбором конкретных экспериментов, осуществляемых при решении научных задач технологии рекомбинантной ДНК.

Лабораторно-практические занятия содержат материал, ориентированный на практическое овладение методами биотехнологии, решение практических задач, на закрепление и углубление пройденного материала.

Краткое содержание курса лекций

ЛЕКЦИЯ 1. ВВЕДЕНИЕ. Предмет биотехнологии. Связь биотехнологии с фундаментальными и прикладными науками. Надежды и опасения. История развития молекулярной биотехнологии. Основы молекулярной биотехнологии (биологические системы, фундаментальные знания по структуре и функциям биологических полимеров: нуклеиновых кислот и белков, технология рекомбинантных ДНК).

ЛЕКЦИЯ 2. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БИОПОЛИМЕРОВ (1). Структура белка. Уровни организации белков: первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры белка, связи, стабилизирующие их. Глобулярные белки. Фибриллярные белки. Функции белков. Ферменты. Белки, ассоциированные с клеточными мембранами.

ЛЕКЦИЯ 3. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БИОПОЛИМЕРОВ (2). Принципы строения нуклеиновых кислот. Основные функции нуклеиновых кислот: репликация ДНК (принципы, ферменты, особенности репликации прокариот и эукариот), транскрипция (принципы, функциональные модули, ферменты, особенности транскрипции и ее регуляции у прокариот и эукариот), синтез белка в клетке (генетический код, рекогниция, структура рибосом, трансляция, особенности обеспечения синтеза белка у прокариот и эукариот).

ЛЕКЦИЯ 4. ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК (1). Ферменты. Нуклеазы. Эндонуклеазы рестрикции II типа (на примере EcoRI). Другие ферменты генной инженерии (фосфатаза, полинуклеотидкиназа, ДНК-лигаза, ДНК-полимеразы). Плазмидные векторы для переноса генетической информации. Требования, предъявляемые к векторам. Вектор pBR322 (структура вектора клонирования, система селекции рекомбинантных ДНК).

ЛЕКЦИЯ 5. ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК (2). Векторы экспрессии. Вектор pUC19 (структура вектора клонирования и экспрессии в

прокариотической системе, система селекции рекомбинантных ДНК). Векторы для клонирования крупных фрагментов ДНК (векторы на основе бактериофага λ, космиды, приготовление экстрактов для упаковки фаговой ДНК in vitro).

ЛЕКЦИЯ 6. ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК (3). Создание геномных библиотек. Частичный гидролиз эндонуклеазами рестрикции. Схема создания геномной библиотеки на основе ДНК фага λ. Скрининг геномных библиотек с помощью гибридизации. Получение меченых ДНК-зондов. Иммунологический скрининг.

ЛЕКЦИЯ 7. ЭКСПРЕССИЯ КЛОНИРОВАННЫХ ГЕНОВ В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ. Важнейшие функциональные модули экспрессирующих векторов для прокариот. Трансляционные экспрессирующие векторы. Интеграция чужеродной ДНК в хромосому хозяина. Химерные белки (химерные белки используют и для упрощения процедуры очистки рекомбинантного белка, включение белков в поверхностные структуры, повышение эффективности секреции, причины метаболических перегрузок). Бесклеточные белоксинтезирующие системы.

ЛЕКЦИЯ 8. ЭКСПРЕССИЯ КЛОНИРОВАННЫХ ГЕНОВ В ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ. Эукариотические экспрессирующие векторы. Системы экспрессии Sacharomyces cerevisiae (векторы, YAC-система клонирования). Экспрессирующие векторы для работы с клетками млекопитающих (ЭВМ) (внехромосомные ЭВМ, селективные маркерные гены для эукариотических систем).

ЛЕКЦИЯ 9. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ (1). Клеточная инженерия. Выращивание эукариотических клеток в культуре. Особенности питательных сред и режима выращивания. Основные способы культивирования животных клеток. Культуры животных тканей и особенности культивирования органов. Получение и использование культур клеток человека. Гибридизация животных клеток. Клетки химеры. Гибридомы. Методы получения моноклональных антител.

ЛЕКЦИЯ 10. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ (2). Применение культуры клеток высших растений. Суспензионные культуры. Особенности культивирования отдельных клеток. Протопласты растительных клеток в биотехнологии растений. Парасексуальная гибридизация и виды соматических гибридов, их жизнеспособность. Использование культур растительных клеток в генетике и селекции. Получение безвирусных растений — хемотерапия, термотерапия. Криоконсервация культивируемых клеток растений и животных как метод сохранения генофонда.

ЛЕКЦИЯ 11. ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ (1). ПРОЦЕССЫ И АППАРАТЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ. Общая схема процессов в биотехнологии. Основные типы биотехнологических производств. Связь между биообъектом и биотехнологией. Методы разделения культуральных сред и клеточной массы. Первичные и вторичные метаболиты. Управляемые, неуправляемые, совместные, последовательные и ступенчатые биотехнологические процессы. Требование асептики в биотехнологии. Массообмен в биотехнологических процессах. Основные принципы управления биотехнологическими процессами. Системы GLP (Good Laboratory Practice) и GMP (Good Manufacturing Practice). Основные принципы технического оснащения биопроизводств. Основные

группы коррозийных процессов, действующих в биореакторах (химическая, физическая, биологическая). Интенсивность коррозийных процессов. Ферментаторы периодического и постоянного действия. Отходы биотехнологических производств. Обезвреживание и утилизация отходов биотехнологических производств.

ЛЕКЦИЯ 12. ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ (2). МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ. Лекарственные препараты. Интерфероны. Гормон роста человека, полученный генно-инженерными методами. Моноклональные антитела как лекарственные средства. Профилактика отторжения трансплантированных органов. Лекарственные вещества, связанные с моноклональными антителами (структура иммунотерапевтического тромболитического агента, производство антител с помощью E. coli). Биотехнологическое производство молочных продуктов, сахаров, спиртов и полиолов).

ЛЕКЦИЯ 13. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ. Биодеградация токсических соединений и утилизация биомассы (утилизация ксенобиотиков генно-инженерной технологии, крахмала и сахара, целлюлозы и др.). Бактерии, стимулирующие рост растений (фиксация азота и др.). Микробные инсектициды. Аэробные системы очистки сточных вод.

ЛЕКЦИЯ 14. ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ. Методология (на примере мыши: векторы, микроинъекции ДНК, модифицированные эмбриональные стволовые клетки и т. д.). Применение (мыши, крупный рогатый скот, овцы, птицы, рыбы и др.) методов.

ЛЕКЦИЯ 15. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА. Методы иммунодиагностики. Ферментный-иммуносорбентный анализ (ELISA) Моноклональные антитела. Методы ДНК-диагностики. Геномная дактилоскопия или метод ДНК-типирования. Блотинг ДНК для саузерн-гибридизации. Использование саузерн-гибридизации для судебной экспертизы. Молекулярная диагностика генетических заболеваний

ЛЕКЦИЯ 16. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ. Физическое картирование генома человека. Клонирование генов, ответственных за заболевания человека. Программа «Геном человека». Генная терапия ex vivo и in vivo. Системы доставки генов (вирусные и невирусные). Активация «пролекарства». Контроль применения биотехнологических методов. Патентование биотехнологических изобретений.

Содержание лабораторно-практических занятий

На практических занятиях происходит знакомство с основными методами, используемыми в генетической инженерии: экстракция ДНК, рестрикционный анализ, гель-электрофорез, клонирование фрагментов ДНК, построение физических карт и др. Студентам предлагаются мультимедийные презентации с демонстрациями работы приборов, инструментов, использования биопрепаратов и реактивов. Кроме того, рассматриваются конкретные примеры экспериментальных исследований с разбором протокольных документов и демонстрацией виртуального процесса. Такой комплексный подход позволяет сформировать целостное представление о возможностях применения рассматриваемых методов для решения конкретных задач.

В табл. 1 представлен план практического занятия по теме «Гельэлектрофорез нуклеиновых кислот». Основным средством наглядности на таком занятии является мультимедийная презентация.

Таблица 1

План практического занятия по теме «Гельэлектрофорез нуклеиновых кислот»

Обсуждаемый вопрос	Демонстрационное сопровождение
1. Метод фракционирования нуклеиновых кислот: основные принципы	Слайд со схемой, поясняющей физический принцип разделения нуклеиновых кислот путем электрофореза
2. Необходимое оборудование	Фотослайды из фирменных каталогов: источники питания, аппараты для проведения гельэлектрофореза, электроды, камеры и гребенки для заливки гелей
3. Принцип выбора типа и спецификации агарозы для конкретных целей анализа	Фотослайды из фирменных каталогов, демонстрирующие спектр имеющихся возможностей выбора необходимого типа агарозы
4. Характеристика способов окрашивания ДНК в разных гелях	Фотографии протоколов экспериментов (окрашивание в агарозе бромистым этидием и в полиакриламидном геле с помощью азотнокислого серебра)
5. Способы визуализации и протоколирования результатов гельэлектрофореза	Фотослайды из фирменных каталогов: трансиллюминаторы, фотоаппараты, сканеры
6. Характеристика способов обработки данных, полученных при гельэлектрофорезе ДНК	Примеры графиков относительной подвижности в геле, построенных на основании подвижности маркерных ДНК. Обучающая презентация по определению плотности зоны исследуемого фрагмента ДНК относительно выбранного стандарта с помощью компьютерной программы Scion Image
7. Рассмотрение протокола конкретного эксперимента и суммирование возможностей данного метода анализа	Фотографии протокола эксперимента

Лабораторный демонстрационный практикум по курсу биотехнологии для студентов РГПУ им. А. И. Герцена проводится на материальной базе Лабораторатории экспериментальной зоологии, организованной на кафедре зоологии факультета биологии. В лаборатории имеется оборудование, необходимое для ознакомления студентов с методами экстракции нуклеиновых кислот и белков, с методом спектрофотометрического определения концентрации в препаратах этих биополимеров, с методами гельэлектрфореза ДНК и РНК, рестрикционного анализа ДНК, с методом полимеразной цепной реакции, а также с анализом экспрессии генов с помощью метода обратной транскрипции, сопряженной с полимеразной цепной реакцией, с методами молекулярного клонирования, гибридизационного и иммунологического анализа и др.

В то же время демонстрационный лабораторный практикум может быть организован и в учебных кабинетах или в студенческой лаборатории при условии наличия необходимого набора оборудования и материалов (табл. 2).

В табл. 2 представлен план организации лабораторного практикума по методам экстракции и анализа нуклеиновых кислот.

Таблица 2

План организации лабораторного практикума по методам экстракции и анализа нуклеиновых кислот

Лабораторная работа (кол-во часов)	Описание методики	Материалы	Оборудование
1. Выделение хромосомной ДНК из тканей животных (6)	Херрингтон, Макги, 1999	Биологические образцы Фенол Хлороформ Изоамиловый спирт Сахароза Этанол Буфер Трис-HCl (трис-(оксиметил)-аминометан, кислота соляная), pH 8.0 Раствор этилендиамин-тетрауксусной кислоты, pH 8.0 Додецилсульфат натрия Протеиназа К Панкреатическая РНК-аза	Центрифуга с охлаждением, 12000 g Пробирки центрифужные Микропробирки типа «Эппендорф», 1,5 мл Гомогенизатор Вентилятор Холодильная камера, +4 °С Пипетки-дозаторы переменного объёма Водяная баня или термостат
2. Электрофоретический анализ препаратов ДНК в агарозном геле (2)	Маниатис и др., 1984; Херрингтон, Макги, 1999	Препараты ДНК разной концентрации Агароза Трис-боратный буфер (трис-(оксиметил)-аминометан, борная кислота) Бромистый этидий Стандартные ДНК-маркеры молекулярного веса	Аппарат для горизонтального электрофореза Столик для заливки гелей Трансиллюминатор Пипетки-дозаторы переменного объёма Микропланшет Фотоаппарат
3. Полимеразная цепная реакция (2)	Херрингтон, Макги, 1999	Препарат ДНК или РНК Специфические праймеры или случайные праймеры Набор реагентов для ПЦР-реакции (Taq-ДНК-полимераза, инкубационный буфер, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, свободная от РНК-аз вода) Минеральное масло	Термоциклер Микропробирки типа «Эппендорф», 0,5 мл Пипетки-дозаторы переменного объёма
4. Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов в полиакриламидном геле (4)	Маниатис и др., 1984; Херрингтон, Макги, 1999	ПЦР-продукты Акриламид N,N'-Метиленбисакриламид N,N,N’,N’-тетраметилэтилендиамин Трис-боратный буфер (трис-(оксиметил)-аминометан, борная кислота) Этидия бромид Серебра нитрат Натрия карбонат Натрия тиосульфат Аммоний серноватистокислый Уксусная кислота Стандартные ДНК-маркеры молекулярного веса	Аппарат для вертикального электрофореза Пипетки-дозаторы переменного объёма Ванночки Качающаяся платформа

Кроме того, в практическую часть курса входит экскурсионное знакомство с лабораториями, в которых занимаются проблемами молекулярной биологии, генетики, биохимии. Студенты получают возможность увидеть, как организованы современные лаборатории, их приборное оснащение и направления исследовательской работы. Например, экскурсии в отделы биохимии, молекулярной генетики, иммунологии НИИ экспериментальной медицины РАМН, НИИ цитологии РАН и НИИ гриппа РАМН.

При знакомстве с основами и направлениями молекулярной диагностики студенты получают задание собрать информацию о диагностических лабораториях Санкт-Петербурга с рассмотрением спектра предлагаемых ими медико-биологических услуг. Также полезны задания по сбору информации об имеющихся в городе биотехнологических производствах и фирмах, обеспечивающих работу таких производств и лабораторий.

Организация самостоятельной работы

Самостоятельная работа студентов по дисциплине «Биотехнология» обеспечивает как освоение части основного материала курса, так и получение студентами дополнительных знаний по интересующим их разделам биотехнологии (например, связанных с выполняемой квалификационной работой). Она включает:

1. Выполнение заданий для самостоятельной работы на протяжении курса: составление схем, таблиц, алгоритмов с использованием материала лекций и практических занятий, решение задач и выполнение упражнений. Особое внимание уделяется точному знанию терминологии биотехнологии. Для этого студентам рекомендуется заполнять словарь терминов, регулярно проводятся терминологические диктанты.

2. Подготовка докладов и сообщений (примерные темы приведены ниже).

3. Индивидуальная работа со студентами магистратуры предполагает дополнительное углубленное изучение вопросов молекулярной биологии или биотехнологии, связанных непосредственно с исследованиями, которые осуществляются в рамках выпускных квалификационных работ. Работа выполняется под руководством и по рекомендациям преподавателя: например, направляемый преподавателем поиск соответствующей интересам студента литературы, которая может быть использована для работы над магистерской диссертацией.

Темы докладов и рефератов

1. Методы переноса генов в растительные клетки.
2. Методы генетической модификации животных.
3. Генноинженерные методы повышения устойчивости растений к фитопатогенам и гербицидам.
4. Генноинженерные методы повышения устойчивости растений к вирусам и бактериям.
5. Генноинженерные методы получения растений, противостоящих неблагоприятному воздействию и старению.
6. Растения как биореакторы.
7. Практическое применение трансгенных животных. Трансгенные мыши.
8. Трансгенный крупный рогатый скот. Цели трансгеноза.
9. Трансгенные овцы, козы, свиньи. Цели трансгеноза.

10. Трансгенные животные как продуценты ценных биологически активных белков.

11. Промышленный синтез белков с помощью рекомбинантных микроорганизмов.

12. Использование рекомбинантных микроорганизмов для получения биополимеров.

13. Получение инсулина на основе методов генной инженерии.

14. Трансгенные растения. Проблемы биобезопасности.

15. Пищевая продукция из генетически модифицированных источников.

16. Проблема оценки риска трансгенных растений.

17. Методы молекулярной диагностики в медицине.

18. Подготовить лекцию по биотехнологии для школьного факультатива по углубленному изучению биологии, включая наглядные схемы и рисунки.

19. Биотехнологические и фармацевтические предприятия и компании Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

20. Применение диагностических методов (ДНК-диагностика, иммунодиагностика) в медико-диагностических лабораториях.

Текущая и итоговая аттестация

Проверка качества усвоения знаний в течение семестра обеспечивается в устной (коллоквиумы, доклады) и письменной (контрольные работы, решение задач) форме. Дисциплина завершается устным зачетом, на котором проверяется усвоение теоретического материала и умения выполнять практические задачи.

Примеры вопросов для текущей аттестации

1. Что такое вектор в генной инженерии? Какие факторы являются определяющими при выборе клонирующего вектора?

2. В чем заключаются особенности клонирования больших фрагментов ДНК и какие векторы для этого применяют?

3. Каковы основные общие и различные черты векторов для клонирования и экспрессии генов? Может ли экспрессирующий вектор использоваться для клонирования генов?

4. Какие существуют способы введения чужеродной ДНК в клетки E. coli?

5. Что такое эндонуклеазы рестрикции II и почему они так важны для технологии рекомбинантных ДНК?

6. Что означает понятие «регулируемый промотор»? Приведите пример.

7. Опишите применение плазмиды pBR322 в качестве вектора.

8. Опишите основные свойства системы клонирования pUC.

9. Зачем рестрицированную плазмидную ДНК перед лигированием часто обрабатывают щелочной фосфатазой?

10. Что такое частота и эффективность трансформации?

11. Что такое клонирование ДНК? Что необходимо для этого процесса?

12. Какими способами можно влиять на экспрессию генов, клонированных в прокариотических организмах?

13. Иногда стратегия синтеза белка-мишени включает получение этого белка в составе химерного продукта. В чем преимущества такого подхода?

14. Какая стратегия используется для того, чтобы сделать белки секретируемыми?

15. Что такое метаболические перегрузки и что является их причиной?

Примеры практических заданий

1. Построить карту расположения участков узнавания эндонуклеаз рестрикции на линейной ДНК, если известно, что при действии на эту ДНК ферментом EcoR1 получаются три фрагменты длиной 850, 500 и 300 пар нуклеотидов, а BamH1 разрезает эту ДНК на фрагменты 950 п. н., 600 п. н. и 100 п. н. При совместном расщеплении данной ДНК указанными рестриктазами получается следующий набор фрагментов: 600 п. н., 400 п. н., 300 п. н., 250 п. н. и 100 п. н.

2. При обработке кольцевой двухцепочечной плазмиды pCEL1 различными рестриктазами и их комбинациями получаются следующие фрагменты (размеры указаны в тысячах пар нуклеотидов): EcoR1 6.0; BamH1 — 6.0; HindIII — 6.0; HaeII — 3.0, 2.0, и 1.0; EcoR1+ HaeII 2.0 и 1.0; EcoR1+ HindIII 3.5 и 2.5; EcoR1+ BamH1 4.5 и 1.5; BamH1+ HindIII 5.0 и 1.0; BamH1+ HaeII 3.0, 1.5и 0. 5; HaeII+ HindIII 3.0, 1.5, 1.0 и 0.5. Используя эти данные, постройте карту ДНК плазмиды pCEL1.

3. Построить физическую карту кольцевой ДНК по сайтам рестрикции гипотетических рестриктаз R1 и R2. Фрагменты ДНК при действии R1 9.0 т. п. н. и 3.0 т. п. н.; R2 6.5, 4.5 и 1.5 т. п. н.; R1+R2 5.5., 2.5., 2.0 и 1.0 т. п. н.

4. Сколько молекул бета-галактозидазы присутствует в одной клетке кишечной палочки, если бактерии растут на лактозе? Кишечная палочка имеет цилиндроподобную форму длиной 2 мкм и диаметром 1 мкм; молекулярный вес бета-галактозидазы — 450 000.

5. Плотность бактериальной клетки — около 1,2 г/мл. На долю растворимых белков, к которым относится и бета-галактозидаза, приходится 14% всей массы, из которых бета-галактозидаза составляет 1%.

6. Содержание лизина в рибонуклеазе составляет 10,5% по весу (мол. вес лизина — 147). Рассчитайте минимальную молекулярную массу рибонуклеазы и реальную, если известно, что она содержит 10 остатков лизина.

7. Используйте концевую трансферазу для создания гибридных кольцевых и линейных молекул ДНК, принадлежащих разным геномам. Какие еще ферменты вам понадобятся для этого?

8. Создайте конструкцию, несущую прокариотический ген устойчивости к неомицину, подходящую для переноса генов в эукариотические клетки. Опишите план клонирования с помощью такого вектора.

9. Предложите план получения кДНК библиотеки генов, тканеспецифически экспрессирующихся в печени человека.

Перечень вопросов итоговой аттестации по курсу «Биотехнология»

1. Ферменты-инструменты генетической инженерии (название, катализируемая реакция и этап применения при создании рекомбинантных ДНК).

2. Понятие вектора в генетической инженерии. Требования, предъявляемые к векторам. Плазмидные векторы клонирования. Векторы на основе фага λ.

3. Экспрессирующие векторы. Особенности модулей векторов для экспрессии генов. Челночные векторы.

4. Создание геномных библиотек. Экспрессионные библиотеки кДНК. Методы скрининга, применяемые при анализе геномных библиотек.

5. Методы введения чужеродных генов в клетки прокариот и эукариот. Трансформация и количественные способы оценки этого процесса. Маркерные системы для скрининга трансформантов.

6. Химический синтез — один из подходов в технологии получения рекомбинантных ДНК. Сиквенирование ДНК.

7. ПЦР и ОТ-ПЦР как методы, оптимизирующие изучение структуры и функций генетического аппарата клеток.

8. Биологические системы, используемые для изучения экспрессии эукариотических генов.

9. Векторы для экспрессии клонированных генов (структура, принцип функционирования). Плазмидные векторы, векторы на основе бактериофага **λ,** космиды, дрожжевые векторы.

10. Методы введения чужеродных генов в эукариотические клетки.

11. Представить схему получения химерных белков.

12. Направленный мутагенез и его роль при создании дизайна белковых биотехнологических продуктов.

13. Перечислить направления деятельности человека, где находят применение методы молекулярной диагностики. Привести примеры. Какие молекулярно-биологические методы исследования для этого используют?

14. Моноклональные антитела. Принцип их получения и сфера применения. Привести примеры.

15. Изложить подходы к биотехнологическому производству лекарственных препаратов и пищевых добавок.

16. Методы получения трансгенных животных. Преимущества и недостатки методов.

17. Генотерапия. Возможные пути реализации. Этические проблемы.

Список литературы, рекомендуемой по курсу «Биотехнология»

А. Основной

1. *Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Робертс К., Уотсон Дж.* Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994.

2. *Глик Б., Пастернак Дж.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002.

3. *Дымшиц Г. М. и др*. Введение в молекулярную биологию**:** Курс лекций. НГУ, 2000.

4. *Льюин Б.* Гены. М.: Мир, 1987.

5. *Рис Э., Стернберг М*. Введение в молекулярную биологию (от клеток к атомам). М.: Мир, 2002.

6. *Рыбчин В. Н.* Основы генетической инженерии. СПб.: СПбГТУ, 1999.

7. *Сингер М., Берг П.* Гены и геномы. М.: Мир, 1998.

8. *Уотсон Дж., Туз Дж*. Рекомбинантные ДНК: Краткий курс. М.: Мир, 1986.

9. *Клаг У., Каммингс М.* Основы генетики. М.: Техносфера, 2007.
10. *Эллиот В., Эллиот Д.* Биохимия и молекулярная биология. М., 2000.

Б. Дополнительный

1. Генная терапия — медицина будущего: Сборник обзорных материалов по программе «Геном человека» / Под ред. А. В. Зеленина. М., 2000.
2. *Горбунова В. Н., Баранов В. С.* Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. СПб.: Специальная литература, 1997.
3. *Калинин В. Л.* Введение в молекулярную вирусологию. СПб.: СПбГТУ, 2000.
4. *Калинин В. Л.* Транскрипция и регуляция экспрессии генов. СПб.: СПбГТУ, 2001.
5. Компьютерный анализ генетических текстов / Под ред. М. Д. Франк-Каменецкого. М.: Наука, 1990.
6. *Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Клонирование генов. М.: Мир, 1984.
7. *Воробьева И.* Промышленная микробиология. М.: МГУ, 1989.
8. *Ленинджер А.* Основы биохимии. 2004.
9. Молекулярная клиническая диагностика / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. М.: Мир, 1999.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Примерные программы дисциплин предметной подготовки магистров образования по направлению «Естественнонаучное образование» / Под ред. Г. А. Бордовского, Н. Ф. Радионовой, Е. А. Тумалевой. СПб.: Изд-во РГПУ им. А. И. Герцена, 2006. 290 с.
2. www.mosbiotechworld.ru

REFERENCES

1. Primernye programmy disciplin predmetnoj podgotovki magistrov obrazovanija po napravleniju «Estestvennonauchnoe obrazovanie» / Pod red. G. A. Bordovskogo, N. F. Radionovoj, E. A. Tumalevoj. SPb.: Izd-vo RGPU im. A. I. Gercena, 2006. 290 s.
2. www.mosbiotechworld.ru