«УТВЕРЖДАЮ»
Декан биологического факультета МГУ

Академик М.П.Кирпичников
«___» _____ 2015 г.

Рабочая программа дисциплины (модуля)

1. Код и наименование дисциплины (модуля): **«Генетическая инженерия»**

2. Уровень высшего образования – подготовка научно-педагогических кадров в аспирантуре.

3. Направление подготовки – **06.06.01 Биологические науки**. Направленность (профиль) программы – Генетика

4. Место дисциплины (модуля) в структуре ООП: вариативная часть ООП, весенний семестр), спецкурс по выбору (читается на кафедре генетики)

5. Планируемые результаты обучения по дисциплине (модулю), соотнесенные с планируемыми результатами освоения образовательной программы (компетенциями выпускников)

Формируемые компетенции ***(код компетенции)***	**Планируемые результаты обучения по дисциплине (модулю)**
УК-1: Способность к критическому анализу и оценке современных научных достижений, генерированию новых идей при решении исследовательских и практических задач, в том числе в междисциплинарных областях	***Владеть:*** навыками анализа методологических проблем, возникающих при решении исследовательских и практических задач, в том числе в междисциплинарных областях Код **В1 (УК-1)** ***Владеть:*** навыками критического анализа и оценки современных

1

	научных достижений и результатов деятельности по решению исследовательских и практических задач, в том числе в междисциплинарных областях Код **В2 (УК-1)**
УК-2 *Способность проектировать и осуществлять комплексные исследования, в том числе междисциплинарные, на основе целостного системного научного мировоззрения с использованием знаний в области истории и философии науки.*	***Знать:*** методы научно-исследовательской деятельности Код **З1 (УК-2)**
УК-3: *Готовность участвовать в работе российских и международных исследовательских коллективов по решению научных и научно-образовательных задач*	***Владеть:*** технологиями оценки результатов коллективной деятельности по решению научных и научно-образовательных задач, в том числе ведущейся на иностранном языке Код **В2 (УК-3)**
УК-4: *Готовность использовать современные методы и технологии научной коммуникации на государственном и иностранном языке*	***Владеть:*** навыками анализа научных текстов на государственном и иностранном языках Код **В1 (УК-4)** ***Знать:*** стилистические особенности представления результатов

	научной деятельности в устной и письменной форме на государственном и иностранном языках Код **32 (УК-4)**
ОПК-1 *Способность самостоятельно осуществлять научно-исследовательскую деятельность в соответствующей профессиональной области с использованием современных методов исследования и информационно-коммуникационных технологий*	***Уметь:*** собирать, отбирать и использовать необходимые данные и эффективно применять количественные методы их анализа

Оценочные средства для промежуточной аттестации по дисциплине (модулю) приведены в Приложении.

6. Объем дисциплины (модуля) составляет 2 зачетных единицы, всего 72 академических часа, из которых 24 часа составляет контактная работа аспиранта с преподавателем (24 часа занятий лекционного типа) и 48 часов составляет самостоятельная работа аспиранта (написание обзора современных научных статей на выбранную тему).

7. Входные требования для освоения дисциплины (модуля), предварительные условия:
ЗНАТЬ: биохимию, молекулярную биологию, генетику (на уровне программ специалиста/магистра), теоретические и методологические основы биологических научных исследований
УМЕТЬ: вырабатывать на основе рационального анализа экспериментальных результатов свою точку зрения в вопросах генетической инженерии и применения методов генетической инженерии в научных исследованиях и на практике и отстаивать ее во время дискуссии со специалистами и неспециалистами; читать и реферировать научную литературу в области генетической инженерии, в том числе на иностранных языках, при условии соблюдения научной этики и авторских прав.
ВЛАДЕТЬ: современными информационно-коммуникационными технологиями, иностранным языком.

8. Образовательные технологии: классические лекционные технологии.

9. Содержание дисциплины (модуля), структурированное по темам (разделам) с указанием отведенного на них количества академических часов и виды учебных занятий

1.	Введение в генетическую инженерию	2				

2.	Ферменты, используемые в молекулярном клонировании. Ферменты рестрикции и модификации ДНК.	2				
3.	Ферменты, используемые в молекулярном клонировании. Анализ фрагментов ДНК с помощью гель-электрофореза. ДНК-лигазы. Топоизомеразы. Модификация концов фрагментов ДНК.	2				
4.	Векторные молекулы ДНК.	2				
5.	Методы отбора и анализа рекомбинантных молекул ДНК	2				
6.	Векторы на основе однонитевых фагов. Фагмиды. Векторы на основе бактериофага лямбда. Упаковка фаговой ДНК *in vitro*. Фазмиды. Космиды.	2				
7.	Геномные библиотеки	2				
8.	Химико-ферментативный синтез ДНК. Синтез и клонирование ДНК. Полимеразная цепная реакция. Направленный мутагенез молекул ДНК in vitro.	2				
9.	Экспрессия генов в клетках *E.coli*. Секреция чужеродных белков. Генетическая инженерия дрожжей.	2				
10	Генетическая инженерия растений.	2				
11	Генетическая инженерия растений. Генетическая инженерия животных.	2				
12	Генетическая инженерия животных.	2				

Наименование и краткое содержание разделов и тем дисциплины (модуля), **форма промежуточной аттестации по дисциплине (модулю)**	**Всего (часы)**	В том числе								
		Контактная работа (работа во взаимодействии с преподавателем), часы из них						**Самостоятельная работа обучающегося, часы** из них		
		Занятия лекционного типа	Занятия семинарского типа	Групповые консультации	Индивидуальные консультации	Учебные занятия, направленные на проведение текущего контроля успеваемости коллоквиумы, практические контрольные занятия и др)*	**Всего**	Выполнение домашних заданий	Подготовка рефератов и т.п.	**Всего**
Введение в генетическую инженерию	**4**	2					**2**	2		**2**
Ферменты, используемые в молекулярном клонировании. Ферменты рестрикции и модификации ДНК. Ферменты, используемые в молекулярном клонировании. Анализ фрагментов ДНК с помощью гель-электрофореза. ДНК-лигазы. Топоизомеразы. Модификация концов фрагментов ДНК.	**18**	4					**4**	8	2	**10**
Векторные молекулы ДНК. Методы отбора и анализа рекомбинантных	**32**	8					**8**	10	10	**20**

молекул ДНК Векторы на основе однонитевых фагов. Фагмиды. Векторы на основе бактериофага лямбда. Упаковка фаговой ДНК *in vitro*. Фазмиды. Космиды.										
Химико-ферментативный синтез ДНК. Синтез и клонирование ДНК. Полимеразная цепная реакция. Направленный мутагенез молекул ДНК in vitro.	**6**	2					**2**	2	2	**4**
Экспрессия генов в клетках *E.coli*. Секреция чужеродных белков. Генетическая инженерия дрожжей.	**6**	2					**2**	2	2	**4**
Генетическая инженерия растений.	**7**	3					**3**	2	2	**4**
Генетическая инженерия животных	**7**	3					**3**	2	2	**4**
Промежуточная аттестация - зачет										
Итого:	**72**	**24**					**24**	**28**	**20**	**48**

10. Учебно-методические материалы для самостоятельной работы аспирантов.

Конспекты лекций, аудио- и видеозаписи лекций, файлы презентаций лекций, основная и дополнительная учебная литература (см. п.11)

11. Ресурсное обеспечение:

Основная литература

1. *Маниатис Т., Фрич Э. и Сэмбрук Дж.* **Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.** М.: Мир, 1984.

2. *Рыбчин В.Н.* **Основы генетической инженерии.** Издательство СПбГТУ, 1999.
3. *Щелкунов С.Н.* **Генетическая инженерия.** Сибирское университетское издательство. 2004.

Дополнительная литература

1. *Баранов В.С.* **Генная терапия – медицина XXI века.** Соросовский образовательный журнал, 1999, №3, 63-68.
2. *Глеба Ю.Ю.* **Биотехнология растений.** Соросовский образовательный журнал, 1998, №6, 3-8.
3. *Корочкин Л.И.* **Клонирование животных.** Соросовский образовательный журнал, 1999, №4, 10-16.
4. *Кучук Н.В*. **Генетическая инженерия высших растений.** Киев: Наукова думка, 1997.
5. *Лутова Л.А.* **Генетическая инженерия растений: свершения и надежды.** Соросовский образовательный журнал, 2000, №10, 10-17.
6. *Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа и Р. Уолдена.* **Генетическая инженерия растений. Лабораторное руководство.** М.: Мир, 1991.
7. *Под ред. М. Гловера*. **Клонирование ДНК. Методы.** М.: Мир. 1988.
8. *Под ред. М. Гловера.* **Новое в клонировании ДНК. Методы**. М.: Мир, 1989.
9. *Уотсон Дж., Туз Дж. и Курц Д.* **Рекомбинантные ДНК.** М.:Мир, 1986.
10. *Фаворова О.О.* **Лечение генами – фантастика или реальность?** Соросовский образовательный журнал, 1997, №2, 21-27.
11. *Чемерис А.В., Ахунов Э.Д.* и *Вахитов В.А.* **Секвенирование ДНК.** М.: Наука, 1999.
12. *Шабарова З.А., Богданов А.А. и Золотухин А.С.* **Химические основы генетической инженерии.** Издательство Московского университета, 1994.
13. *Янковский Н.К.* **Конструирование и анализ клонотек геномов. (Биотехнология.** Итоги науки и техники ВИНИТИ АН СССР). М., 1989.

Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
http://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf

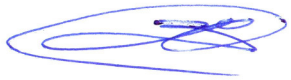
Перечень используемых информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса, включая программное обеспечение, информационные справочные системы (при необходимости):
Интернет-браузер, базы данных PubMed (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed),

Описание материально-технической базы.

Кафедра генетики биологичесского факультета МГУ располагает необходимым аудиторным фондом, компьютерами, проекторами и экранами, аудиоаппаратурой.

12. Язык преподавания: русский

14. Преподаватель (преподаватели): профессор кафедры генетики В.В.Зинченко



Приложение

Оценочные средства для промежуточной аттестации по дисциплине (модулю) «Генетическая инженерия» на основе карт компетенций выпускников

РЕЗУЛЬТАТ ОБУЧЕНИЯ по дисциплине (модулю)	**КРИТЕРИИ и ПОКАЗАТЕЛИ ОЦЕНИВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТА ОБУЧЕНИЯ по дисциплине (модулю), баллы БРС**					**ОЦЕНОЧНЫЕ СРЕДСТВА**
	1,	2	3	4	5	
Владеть: навыками анализа методологических проблем, возникающих при решении исследовательских и практических задач, в том числе в междисциплинарных областях Код В1 (УК-1)	0	1-29	30-59	60-89	90-100	*- индивидуальное собеседование, реферат, зачет*
Владеть: навыками критического анализа и оценки современных научных достижений и результатов деятельности по решению исследовательских и практических задач, в том числе в междисциплинарных областях Код В2 (УК-1)	0	1-29	30-59	60-89	90-100	*- - индивидуальное собеседование, реферат, зачет*
Знать: методы научно-исследовательской деятельности Код З1(УК-2)	0	1-29	30-59	60-89	90-100	*- индивидуальное собеседование, реферат, зачет*
Владеть:	0	1-29	30-59	60-89	90-100	*- индивидуальное собеседование, реферат,*

технологиями оценки результатов коллективной деятельности по решению научных и научно-образовательных задач, в том числе ведущейся на иностранном языке Код В2(УК-3)						*зачет*
Знать: стилистические особенности представления результатов научной деятельности в устной и письменной форме на государственном и иностранном языках Код З2(УК-4)	0	1-29	30-59	60-89	90-100	*- индивидуальное собеседование, реферат, зачет*
Владеть: навыками анализа научных текстов на государственном и иностранном языках Код В1(УК-4)	0	1-29	30-59	60-89	90-100	*- индивидуальное собеседование, реферат, зачет*
Уметь: собирать, отбирать и использовать необходимые данные и эффективно применять количественные методы их анализа	0	1-29	30-59	60-89	90-100	*- индивидуальное собеседование, реферат, зачет*

Фонды оценочных средств, необходимые для оценки результатов обучения

Примеры вопросов к промежуточному контролю (темы рефератов, вопросы для индивидуального собеседования):

1. Основные принципы, на которых базируется генно-инженерная технология.
2. Схема типичного эксперимента по получению и клонированию рекомбинантных молекул ДНК.
3. Методология и ключевые инструментальные средства генетической инженерии.
4. Рестриктазы класса II – ключевые ферменты генетической инженерии.
5. Использование рестриктаз для конструирования рекомбинантных молекул *in vitro*.
6. Единица активности рестриктазы. Определение количества фермента, необходимого для гидролиза ДНК определенного размера и с известным числом рестрикционных сайтов.
7. Снижение специфичности рестриктаз и обуславливающие ее факторы.
8. ДНК-лигазы *E.coli* и фага T4. Скорости лигирования липких концов, образованных различными рестриктазами. Особенности лигирования фрагментов ДНК с липкими и тупыми концами. Объединение молекул с помощью топоизомеразы.
9. Фосфорилирование и дефосфорилирование ДНК.
10. Анализ фрагментов ДНК с помощью гель-электрофореза. Рестрикционное картирование.
11. Анализ фрагментов ДНК с помощью гель-электрофореза. Маркеры размеров ДНК.
12. Особенности метилирование ДНК у *Escherichia coli*. Системы рестрикции, специфичные к модифицированной ДНК.
13. Метилазы в генетической инженерии.
14. Модификация концов фрагментов ДНК. Использование линкеров и адаптеров для объединения фрагментов ДНК с разными концами.
15. Модификация липких концов фрагментов ДНК в тупые с помощью ДНК-полимераз и нуклеаз.
16. Понятие вектора и реципиента. Системы клонирования. Плазмидные и вирусные ДНК – естественные клонирующие векторы.
17. Основные и дополнительные требования, предъявляемые к векторным молекулам. Различные системы классификации векторов.
18. Введение рекомбинантных ДНК в клетки бактерий.
19. Селективные маркеры бактериальных векторов: маркеры устойчивости к антибиотикам, ауксотрофные маркеры, ген *lacZ E.coli.*
20. Плазмидные векторы. Генетические элементы плазмидных векторов.
21. Характеристика бактериальных векторов с ColE1-подобным репликоном (серия векторов pBR, серия векторов pUC).

22. Характеристика бактериальных векторов с репликоном плазмиды RSF1010.

23. Плазмидные векторы специального назначения. Векторы для отбора промоторов. Векторы прямой селекции рекомбинантных клонов.

24. Возможность проведения генно-инженерных экспериментов в бактериях, не относящимся к роду *Esherichia*. Плазмидные векторы для клонирования в клетках грамотрицательных бактерий. Челночные векторы.

25. Возможность проведения генно-инженерных экспериментов в бактериях, не относящимся к роду *Esherichia*. Плазмидные векторы для клонирования в клетках грамположительных. Челночные векторы.

26. Методы прямого отбора рекомбинантных клонов. Фенотипическая комплементация. Векторы прямой селекции.

27. Методы непрямого отбора рекомбинантных клонов. Методы отбора, основанные на фенотипическом различии рекомбинантных и нерекомбинантных клонов.

28. Методы непрямого отбора рекомбинантных клонов. Клонирование с инсерционной инактивацией.

29. Методы непрямого отбора рекомбинантных клонов. Ген *lacZ E.coli* как маркер при клонировании. Использование индикаторных сред с X-gal.

30. Методы отбора и анализа рекомбинантных молекул ДНК, основанные на гибридизации.

31. Методы отбора и анализа рекомбинантных молекул ДНК, основанные на иммуноблотинге.

32. Капиллярный перенос ДНК и РНК (Саузерн-блоттинг, Нозерн-блоттинг).

33. Метод гибридизации колоний.

34. Способы введения метки в нуклеиновые кислоты. Nick-трансляция.

35. Способы введения метки в нуклеиновые кислоты. Метод случайного праймирования.

36. Способы введения метки в нуклеиновые кислоты. Методы концевого мечения. 5'-концевое мечение ДНК и РНК с помощью Т4 полинуклеотидкиназы. 3'-концевое мечение ДНК с помощью терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы.

37. Способы введения метки в нуклеиновые кислоты. Методы репарирования концов фрагментов ДНК с помощью ДНК-полимераз.

38. Методы определения первичной структуры ДНК по Максаму-Гилберту и по Сэнгеру. Автоматическое секвенирование ДНК.

39. Векторы на основе однонитевых фагов. Отбор рекомбинантных молекул. Преимущества и недостатки данного типа векторов.

40. Фагмиды. Клонирование в фагмидах. Отбор рекомбинантных молекул. Преимущества фагмид по сравнению с векторами на основе нитевидных фагов.

41. Фаг λ как потенциальный вектор клонирования. Общие принципы конструирования векторов на основе фага. Векторы внедрения и векторы замещения.

42. Векторы на основе бактериофага λ. Методы отбора рекомбинантных молекул.

43. Упаковка фаговой ДНК *in vitro*. Потенциальные проблемы, связанные с упаковкой *in vitro* и их решение.

44. Фазмиды. Использование для клонирования кДНК и геномной ДНК. Преимущества фазмид по сравнению с другого типа векторами для конструирования геномных библиотек.

45. Основные свойства космид. Использование космид для конструирования банков генов. Преимущества и недостатки космидной системы.

46. Принципы клонирования в космидах с одним и двумя cos-сайтами.

47. Расчет количества клонов в библиотеке генов. Определение представительности библиотеки генов.

48. Векторная система PAC.

48. Векторная система BAC.

49. Использование векторов PAC и BAC для конструирования геномных библиотек эукариотических организмов. Преимущества векторов PAC и BAC по сравнению искусственными хромосомами дрожжей (YAC).

50. Стратегия создания библиотек генов.

51. Построение физических карт с помощью метода «прогулки по хромосоме».

52. Метод высоточного рестрикционного картирования.

53. Мультифункциональные векторы – области использования.

54. Химико-ферментативный синтез ДНК. Схема сборки синтетических генов.

55. Синтез и клонирование кДНК.

56. Полимеразная цепная реакция. Оптимизация ПЦР.

57. Ассиметричная ПЦР.

58. Амплификация фрагментов ДНК с неизвестной последовательностью нуклеотидов.

59. Аллель-специфичная ПЦР.

60. Подготовка ПЦР-фрагментов для клонирования. Векторы для клонирования ПЦР-фрагментов.

61. Использование рестриктаз и нуклеаз для введение делеций в ДНК**.**

62. Получение набора делеций для анализа протяженных фрагментов ДНК.

63. Сегмент-направленный мутагенез.

64. Использование векторов на основе однонитевых фагов для мутагенной обработки клонированных фрагментов ДНК.

65. Сайт-направленный мутагенез с использованием двух олигонуклеотидных праймеров и селекцией мутантной плазмиды по утрате уникального сайта рестрикции.

66. Сайт-направленный мутагенез с помощью полимеразной цепной реакции.

67. Сайт-направленный мутагенез с помощью двух комплементарных мутагенных праймеров.

68. Условия, необходимые для эффективного синтеза белков, кодируемых клонированными генами. Уровни регуляции экспрессии генов.

69. Структура вектора экспрессии. Простейшие векторы экспрессии.

70. Использование фагоспецифических промоторов для регулируемой экспрессии целевого белка на примере Т7-регулируемой экспрессии.

72. Структура современного вектора экспрессии.

73. Особенности экспрессии прокариотических и эукариотических генов в клетках *E.coli.*

74. Сигнальные пептиды. Векторы секреции.

75. Векторы для клонирования генов в клетках дрожжей.

76. Линейные векторы или искусственные хромосомы дрожжей (YAC). Использование векторов YAC для конструирования геномных библиотек.

77. Дрожжевые векторы экспрессии. Оптимизация экспрессии чужеродных генов в дрожжах.

78. Продукция дрожжами экзогенных белков, имеющих важное значение для медицины и производства продуктов питания.

79. Методы введения ДНК в клетки растений. Общая схема строения вектора для переноса генов посредством ДНК.

80. Векторы для трансформации хлоропластов. Преимущества трансгенной системы хлоропластов.

81. Агробактерии как природные переносчики генетической информации в клетки двудольных растений. Структурная и функциональная организация Ti плазмид.

82. Получение трансгенных растений с помощью коинтегративной и бинарной векторных систем.

83. Регуляторные элементы векторов, обеспечивающие экспрессию в клетках растений чужеродной ДНК.

84. Селективные маркеры для растений и гены-репортеры. Экспрессия и наследование чужеродных генов, введенных в растения в составе Т-ДНК.

85. Основные практические задачи генной инженерии растений.

86. Трансгенные растения в сельском хозяйстве и проблема потенциальной опасности генетически модифицированных источников пищи.

87. Трансгенные растения для синтеза медицинских препаратов – антител, съедобных вакцин.

88. Проблемы биобезопасности генетически модифицированных организмов.

89. Методы введения ДНК в клетки животных.

90. Трансформация нереплицирующейся ДНК: Временная и стабильная трансформация.

91. Котрансформация и селекция стабильных трансформантов.

92. Селективные генетические маркеры для клеток животных.

93. Эндогенные селективные маркеры, доминантные селективные маркеры.

94. Селективные маркеры и амплификация трансгена. Использование амплификации для получения линий клеток-продуцентов целевого белка.

95. Плазмидные векторы генетической трансформации. Гены-репортеры.

96. Плазмидные векторы на основе генетических элементов SV40. Векторы на основе вируса бычьей папилломы.

97. Аденовирусы в качестве векторов. Рекомбинантные аденовирусные вакцины.

98. Вирус осповакцины и создание на его основе рекомбинантных живых поливацин.

99. Ретровирусные векторы. Ретровирусы в качестве инструмента для генной терапии.

100. Общие подходы к конструированию векторов, обеспечивающих эффективную экспрессию трансгенов в клетках животных.

101. Получение трансгенных животных.

102. Инсерционная инактивация генов у мышей и ее использование в фундаментальных исследованиях.

103. Применения трансгенной технологии для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных и получения медицинских препаратов.

104. Трансгенные животные как фармацевтические фабрики (биореакторы).

105. Генотерапия, характеристика возможных подходов.

106. Системы переноса генов в клетки человека.

107. Соматическая терапия, типы соматической терапии в зависимости от природы болезни.

108. Подходы к генной терапии онкологических заболеваний.

109. Этические проблемы, связанные с генотерапией.

ПРОГРАММА
зачета по спецкурсу «Генетическая инженерия»

Введение. Генетическая инженерия – технология, обусловленная развитием молекулярной биологии и генетики микроорганизмов. Суть генетической инженерии. Основные принципы, на которых базируется генно-инженерная технология. Основные этапы развития генетической инженерии. Схема типичного эксперимента по получению и клонированию рекомбинантных молекул ДНК. Использование методологии генетической инженерии при решении задач различных областей биологии. Генно-инженерная биотехнология. Использование достижений генетической инженерии в сельском хозяйстве и медицине. Проблемы безопасности при работе с рекомбинантными ДНК. Проблемы биобезопасности генетически модифицированных организмов.

Ферменты, используемые в молекулярном клонировании

Рестрикционные эндонуклеазы. Основные принципы организации систем рестрикции–модификации у бактерий. Роль систем рестрикции – модификации в регуляции переноса генетической информации между бактериями. Классификация и номенклатура рестриктаз. Изошизомеры. Крупно- и мелкощепящие рестриктазы. Фрагменты с выступающими 3'- , 5'- и тупыми концами. Встречаемость тетра- и гексануклеотидов в ДНК. Лигирование фрагментов ДНК с липкими концами, образуемыми разными рестриктазами. Гибридные сайты.

Единица активности рестриктазы. Определение количества фермента, необходимого для гидролиза ДНК определенного размера и с известным числом рестрикционных сайтов. Активность рестриктазы и свойства субстрата (длина и состав оснований фланкирующих последовательностей, расположение сайтов узнавания по отношению друг к другу, структура ДНК). Специфичность рестриктаз. Снижение специфичности рестриктаз ("star-activity" - активность со звездочкой) и обуславливающие ее факторы.

Определение размеров рестрикционных фрагментов с помощью электрофореза в агарозных и полиакриламидных гелях. Конформационные формы молекул ДНК. Маркеры размеров ДНК.

Использование рестриктаз для конструирования рекомбинантных молекул *in vitro*. Сайты рестрикции как генетические маркеры. Использование рестриктаз для физического картирования, анализа полиморфизма ДНК, штаммоспецифической характеристики вирусов и бактерий, идентификации плазмид. Использование сайтов рестрикции в качестве точек отсчета при секвенировании.

Метилазы в генетической инженерии.

Метилирование ДНК в клетках про- и эукариот. Системы рестрикции, специфичные к модифицированной ДНК.

ДНК-лигаза.

ДНК-полимеразы из различных источников; их свойства и применение.

ДНК-полимераза I из *E.coli*. Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I. ДНК-полимераза фага T4. Термостабильные ДНК-полимеразы. Обратные транскриптазы (РНК-зависимые ДНК-полимеразы).

РНК-полимеразы. РНК-полимеразы фагов Т3, Т7, SP6.

Поли (А)-полимеразы.

Дезоксирибонуклеазы. Дезоксирибонуклеаза I (панкреатическая дезоксирибонуклеаза). Нуклеаза *Bal*31. Нуклеаза S1. Нуклеаза из проростков золотистой фасоли. Экзонуклеазы III и VII. Экзонуклеаза фага λ.

Рибонуклеазы. Рибонуклеазы А и Т1. Рибонуклеаза Н.

Другие ферменты. Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфе-раза. Полинуклеотидкиназа фага Т4. Терминаза фага λ. Щелочные фосфатазы. Топоизомеразы.

Векторы клонирования в бактериях

онятие вектора и реципиента. Требования, предъявляемые к векторным молекулам. Системы классификации векторных молекул.

Плазмидные векторы. Основные сведения о плазмидах. Механизмы репликации плазмид. Понятие о репликоне. Плазмиды со строгим и ослабленным контролем репликации. Амплификация плазмидной ДНК. Плазмидные гены устойчивости к лекарственным препаратам. Конъюгативные и неконъюгативные плазмиды. Мобилизация неконъюгативных плазмид. Несовместимость плазмид. Плазмиды с узким и широким кругом хозяев. Характеристика основных типов плазмид, используемых в генетической инженерии.

Плазмидные векторы клонирования в клетках *E.coli*. Плазмида pSC101 – первая векторная плазмида. Свойства плазмиды ColE1 и векторов на ее основе (серия векторов pBR, серия векторов pUC).

Плазмидные векторы для клонирования в клетках других грамотрицательных бактерий. Челночные векторы. Характеристика плазмиды RK2 и векторов на ее основе. Характеристика плазмиды RSF1010 и векторов на ее основе.

Плазмидные векторы для клонирования генов в клетках грамположительных бактерий.

Введение рекомбинантных ДНК в клетки бактерий. Особенности трансформации у разных видов бактерий. Трансформация клеток *E.coli*. Трансформация плазмидными ДНК клеток бацилл. Электропорация. Перенос рекомбинантных плазмид из клеток *E.coli* в клетки других бактерий с помощью мобилизации конъюгативными плазмидами.

Векторы на основе бактериофага λ. Биология фага λ. Фаг как потенциальный вектор клонирования. Структурная и генетическая организация фаговой хромосомы. Литический цикл, ранняя и поздняя транскрипция генов. Репликация фага и упаковка фаговой ДНК. Ограничение размера ДНК, способной к упаковке. Участки фагового генома, несущественные для лизиса клеток. Общие принципы конструирования векторов на основе фага. Векторы внедрения и векторы замещения. Емкость векторов. Стратегия клонирования в фаговых векторах. Упаковка фаговой ДНК *in vitro*. Образование конкатамеров и роль cos-сайтов при упаковке ДНК в фаговые частицы *in vivo* и *in vitro*. Методы селекции против нерекомбинантных родительских фагов.

Векторы на основе однонитевых фагов. Основные свойства однонитевых фагов. Векторы на основе фага M13. Отбор рекомбинантных фагов. Преимущества и недостатки векторов на основе фага M13. Области использование векторов на основе однонитевых фагов.

Гибридные векторы

Фагмиды. Структурные и функциональные свойства фагмид. Фагмиды на основе плазмид с ColE1-подобным репликоном. Репликация фагмид в клетках *E.coli*. Преимущества фагмид по сравнению с векторами на основе нитевидных фагов.

Фазмиды. Способность фазмид развиваться как по литическому пути, так и поддерживаться в плазмидном состоянии. Преимущества фазмид по сравнению с другого типа векторами для конструирования геномных библиотек. Емкость фагмид. Использование для клонирования кДНК и геномной ДНК. Хранение клонотек в виде гибридных фагов.

Космиды. Основные свойства космид. Принципы клонирования в космидах с одним и двумя cos-сайтами. Упаковка рекомбинантных молекул в фаговые частицы *in vitro*. Образование конкатамеров и роль cos-сайтов при упаковке ДНК в фаговые частицы *in vitro*. Преимущества и недостатки космидной системы.

Векторы специального назначения. Векторы на основе искусственных бактериальных хромосом для клонирования больших фрагментов ДНК в клетках *E.coli*. Векторы для отбора промоторов. Векторы прямой селекции рекомбинантных клонов. Прокариотические и эукариотические векторы экспрессии; их структурная организация. Векторы секреции и их структурная организация. Использование различных векторов для секвенирования ДНК, сайт-направленного мутагенеза и картирования геномов.

Принципы клонирования фрагментов ДНК. Увеличение эффективности клонирования путем подбора оптимального молярного соотношения концов вектора и клонируемого фрагмента. Клонирование фрагментов в определенной ориентации. Дефосфорилирование ДНК. Лигирование фрагментов с гетерологичными концами. Превращение выступающих 3’-концов в тупые с помощью ДНК-полимеразы фага T4. Превращение выступающих 5’-концов в тупые с помощью фрагмента Кленова. Использование нуклеаз для превращения выступающих концов в тупые. Использование синтетических линкеров и адаптеров.

Конструирование геномных библиотек (банков генов, клонотек)

Расчет количества клонов в библиотеке генов в зависимости от размера генома и размера клонируемых фрагментов. Клонотека, эквивалентная по объему геному. Определение представительности библиотеки генов. Стратегия создания библиотек генов: выбор вектора клонирования, выбор рестриктазы для фрагментирования геномной ДНК, условия гидролиза геномной ДНК, фракционирование фрагментов ДНК по размерам.

Проблема клонирования больших по размеру фрагментов ДНК для создания геномных библиотек и анализа эукариотических генов. Искусственные хромосомы. Клонирование больших фрагментов ДНК в искусственных хромосомах дрожжей (YAC), искусственных

хромосомах на основе фага P1 (PAC) и искусственной бактериальной хромосоме (BAC). Мультифункциональные векторы и их использование для картирования генов и геномов**.**

Химико-ферментативный синтез ДНК

Метод Кораны. Метод с использованием ДНК-полимераз. Конструирование искусственных генов.

Синтез и клонирование кДНК

Синтез первой цепи кДНК. Синтез второй цепи кДНК. Праймеры для синтеза первой и второй цепей кДНК. Метилирование кДНК. Клонирование кДНК. Использование синтетических линкеров и адапторов при клонировании кДНК. Библиотеки кДНК.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Основы ПЦР. Использование ПЦР для получения и анализа рекомбинантных молекул ДНК. Ассиметричная ПЦР. Амплификация фрагментов ДНК с неизвестной последовательностью нуклеотидов (инверсная ПЦР). Сайт-специфическая ПЦР. Клонирование ПЦР-фрагментов. Векторы для клонирования ПЦР-фрагментов. Использование ПЦР для секвенирования ДНК.

Методы отбора и анализа рекомбинантных молекул ДНК

Методы отбора, основанные на фенотипическом различии рекомбинантных и нерекомбинантных клонов. Метод прямого отбора рекомбинантных клонов по фенотипической комплементации. Клонирование с инсерционной инактивацией. Ген *lacZ E.coli* как маркер при клонировании.

Векторы прямой селекции рекомбинантных клонов.

Методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот. Принципы гибридизации нуклеиновых кислот. Гибридизация нуклеиновых кислот в смешанных фазах. Способы переноса нуклеиновых кислот на мембранные фильтры: гибридизация в пятнах (“dot-blotting”, гибридизация колоний и фаговых бляшек *in situ*, капиллярный перенос ДНК по Саузерну (Southern-blotting) и РНК (Nothern-blotting), другие способы переноса ДНК на мембраны.

Способы введения метки в нуклеиновые кислоты. Радиоактивные и нерадиоактивные метки. Методы выявления меченных нуклеиновых кислот.

Методы определения первичной структуры ДНК по Максаму-Гилберту и по Сэнгеру. Автоматическое секвенирование ДНК.

Перенос белков на мембраны (Western-blotting). Иммунологические методы анализа рекомбинантных клонов.

Направленный мутагенез молекул ДНК in vitro

Введение делеций и вставок в ДНК**.** Сегмент-направленный и сайт-направленный мутагенез.

Генетическая инженерия дрожжей

Введение ДНК в клетки дрожжей с помощью трансформации. Экстрахромосомная ДНК дрожжей. Простейшие векторы для клонирования генов в клетках дрожжей: интегративные векторы и эписомные векторы на основе двухмикронной ДНК. Автономно-реплицирующиеся векторы, содержащие участки ARS. Векторы, содержащие центромерные участки. Линейные векторы или искусственные хромосомы дрожжей (YAC). Использование векторов YAC для конструирования геномных библиотек. Дрожжевые векторы экспрессии.

Генетическая инженерия растений

Методы введения ДНК в клетки растений. Агробактерии как природные переносчики генетической информации в клетки двудольных растений. Индукция опухолей агробактериями. Структурная и функциональная организация Ti плазмид. Т-ДНК. Vir-область. Перенос Т-ДНК в клетки растений. Синтез опинов. Разработка векторов на основе Ti-плазмид. Бинарная векторная система. Коинтегративные или цис-векторные системы. Регуляторные элементы векторов, обеспечивающие экспрессию в клетках растений чужеродной ДНК. Трансгенная системы хлоропластов и ее преимущества. Успехи генной инженерии растений.

Генетическая инженерия животных

Методы введения ДНК в клетки животных. Векторы на основе вирусов животных: вирус SV40, вирус бычьей папилломы, аденовирусы, вирус осповакцины, ретровирусы. Получение трансгенных животных. Применения трансгенной технологии для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных и получения медицинских препаратов. Генотерапия. Этические проблемы, связанные с генотерапией