

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ
ИМ. К.А. ТИМИРЯЗЕВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

ОДОБРЕНО

Ученым советом ИФР РАН

Протокол № 7 от «27» октября 2022 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИФР РАН

д.б.н., чл. корр. РАН

Д.А. Лось



2022 г.

ПРОГРАММА УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЫ

«Теория и практика генетической инженерии»

уровень подготовки кадров высшей квалификации

группа научных специальностей 1.5 Биологические науки

Москва – 2022

Рабочая программа дисциплины *«Теория и практика генетической инженерии»* является базовым методическим документом, соответствующим Федеральным государственным требованиями к структуре программ подготовки научных и научно-педагогических кадров, утвержденных Приказом Минобрнауки РФ от 20.10.2021 г. № 951 и учитывает специфику обучения аспирантов по избранной научной специальности, предусмотренной номенклатурой научных специальностей, по которым присуждаются ученые степени:

1.5.6 Биотехнология

1.5.21 Физиология и биохимия растений.

Объем рабочей программы дисциплины *«Теория и практика генетической инженерии»* составляет 2 зачетные единицы (72 а.ч.).

Форма отчетности – зачет.

Программа дисциплины

Биологические молекулы и биологические процессы в генной инженерии

Молекулярные основы наследственности. Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) и белки. Структуры ДНК, РНК и белков. Ключевые эксперименты в исследовании роли и структуры нуклеиновых кислот, и белков. Функции нуклеиновых кислот и белков: структура, разнообразие и функции. Транскрипция: основные принципы, ключевые участники процесса, структура промоторов генов растений, основные этапы транскрипции. Процессинг РНК: этапы процессинга РНК, основные функции модификаций РНК, структура зрелой мРНК. Трансляция: основной принцип трансляции, ключевые участники процесса; генетический код и его основные свойства.

Инструменты генной инженерии

Ферменты молекулярного клонирования и принципы клонирования генов. Эндонуклеазы рестрикции: классификация и номенклатура; изоизомеры, изокаундомеры. Специфичность эндонуклеаз рестрикции, принцип снижения специфичности и обуславливающие ее факторы. ДНК-лигаза. Лигирование фрагментов ДНК с липкими концами, образуемыми разными рестриктазами. Гибридные сайты. ДНК-полимеразы из различных источников; их свойства и применение. ДНК-полимераза I из *E.coli*. Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I. Термостабильные ДНК-полимеразы. Обратные транскриптазы (РНК-зависимые ДНК-полимеразы). Дезоксирибонуклеазы. Нуклеаза Bal31. Нуклеаза S1. Нуклеаза из проростков золотистой фасоли. Другие ферменты: терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза; полинуклеотидкиназа фага Т4; щелочные фосфатазы. Дефосфорилирование ДНК. Лигирование фрагментов с гетерологичными концами. Превращение выступающих 3'-концов в тупые с помощью ДНК-полимеразы фага Т4. Превращение выступающих 5'-концов в тупые с помощью фрагмента Кленова. Использование нуклеаз для превращения выступающих концов в тупые. Использование синтетических линкеров и адаптеров.

Методы и алгоритмы молекулярного клонирования

Основы ПЦР. Использование ПЦР для клонирования и синтеза рекомбинантных молекул ДНК. Основные характеристики ДНК-полимераз, необходимые для клонирования целевых генов. Клонирование ПЦР-фрагментов. Векторы для клонирования ПЦР-фрагментов. ПЦР и ее использование для клонирования целевых генов и регуляторных элементов. Клонирование генов с помощью ОТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией): принцип метода. Амплификация фрагментов ДНК с известной и неизвестной последовательностью нуклеотидов. Использование ПЦР для химико-ферментативного синтеза ДНК. Классификация плазмид. Основные свойства плазмиды-вектора. Экспрессионные вектора: основные составляющие векторов. Основные методы трансформации бактерий. Получение бактериальных трансформантов

и их селекция. Общий алгоритм работ по молекулярному клонированию целевых генов в экспрессионных векторах. Основные этапы клонирования. Анализ последовательности целевого гена и вектора для клонирования, особенности подбора и проверки праймеров для клонирования целевых последовательностей.

Биоинформатика и генетическая инженерия растений

NCBI и другие интернет-ресурсы для анализа последовательностей нуклеиновых кислот и белков. Алгоритмы биоинформатики. Выравнивания – основной инструмент, принцип, оценка выравниваний. Гомологи (ортологи и паралоги). Программы BLAST и их применение для генетической инженерии. Дополнительные программы – анализ сайтов рестрикции. Анализ праймеров. Алгоритм работ по молекулярному клонированию целевых генов в экспрессионных векторах. Анализ BLAST. Определить ген, с которым работаем, охарактеризовать его белковый продукт. Составить схему клонирования: подобрать праймеры, проверка праймеров.

Белковая биоинженерия

Методы направленной эволюции и рационального дизайна. Создание рекомбинантных белков для фармацевтики. Обзор биореакторов для наработки целевых белков. Подходы к конструированию продуцентов рекомбинантных белков с использованием методов генной инженерии.

Генетическая инженерия растений

Ключевые научные события и исследования, которые послужили основой для развития генетической инженерии растений. Основные задачи генетической инженерии растений. Ti-плазмида агробактерий: последовательности (гены) и их функциональное значение для процесса инфицирования растений. Корончатые галлы. T-область экспрессионных векторов для трансформации растений. Регуляторные элементы, используемые для контроля экспрессии генов растениях- промоторы и лидерные последовательности, используемые для экспрессии генов в растениях, их классификации и принципы работы. Методология поиска и анализа промоторов и лидерных последовательностей. Репортерные гены: стратегия использования, требования к репортерным генам и их продуктам. примеры использования репортерных генов. Гены селективных маркеров: классификация генов селективных маркеров, основные механизмы действия селективных маркеров. Векторы для трансформации растений – разнообразие векторных систем. Основные методы трансформации растений: агробактериальный и биобалистика. Редактирование геномов растений: основные подходы и их принципы.

Методы отбора и анализа трансгенных растений

Полимеразная цепная реакция. Мультиплексная ПЦР – принципы работы, преимущества. Определение количества копий трансгена, интегрированных в геномную ДНК растений. Основные методы и примеры анализа. Определение целостности интегрированной последовательности трансгена в геном растений. Основные методы и примеры анализа. Методы определения экспрессии трансгена на уровне транскрипции. Методы определения экспрессии трансгена на уровне белкового продукта. Методы анализа для определения физиологической роли трансгена в растительной клетке.

Генная инженерия в решении прикладных задач

Генно-инженерные подходы к конструированию организмов устойчивых к стрессовым факторам среды. Принципы конструирования организмов, устойчивых к биотическим стрессовым

факторам. Принципы конструирования организмов толерантных к абиотическим стрессовым факторам. Обзор современных подходов и полученных результатов. Принципы конструирования трансгенных растений с измененными декоративными характеристиками или пищевой ценностью. Подходы к конструированию растений-продуцентов с использованием методов генетической инженерии.

Генно-инженерные подходы к конструированию экспериментальных моделей

Принципы конструирования моделей для изучения функции генов, моделей для изучения регуляции метаболических путей, моделей для тонкого исследования функциональных элементов белков. Проблемы экспрессии гетерологичных генов и подходы к их преодолению. Генно-инженерные подходы к тонкой настройке экспрессии гетерологичного гена на уровне транскрипции, трансляции и стабильности белкового продукта.

Литература:

Основная:

Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М.: «Мир», 2002.
Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2004. – 496 с.

Шмид Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия. М.: Биоком, 2014. – 327 с.

Рыбчин В.Н. Генная инженерия растений. Издательство СПбГТУ, 1999.

Редактирование генов и геномов. отв. редакторы С.М. Закиян, С.П. Медведев, Е.В. Дементьева, В.В. Власов. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2016 г., 432 с.

Дополнительная:

Дополнительная литература рекомендуется лектором в зависимости от тематики лекций с учетом новейшей периодической литературы.

Составитель: дбн, доцент Голденкова-Павлова И.В.