

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ»

УТВЕРЖДАЮ
И.о. проректора по учебной работе

_____ Василенко В.Н.
(подпись) (Ф.И.О.)

«30» мая 2024 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

Практические подходы геномного редактирования для пищевой биотехнологии

Направление подготовки

06.04.01 Биология

Направленность (профиль)

Микробиология

Квалификация выпускника

магистр

Воронеж

1. Цели и задачи дисциплины

Целью освоения дисциплины (модуля) «Практические подходы геномного редактирования для пищевой биотехнологии» является формирование компетенций обучающегося в области профессиональной деятельности и сфере профессиональной деятельности:

- 22 Пищевая промышленность, включая производство напитков и табака (в сфере технологий комплексной переработки мясного и молочного сырья);
- 40 Сквозные виды профессиональной деятельности.

В рамках освоения программы магистратуры выпускники могут готовиться к решению задач профессиональной деятельности следующих типов: *научно-исследовательский; экспертно-аналитический.*

Программа составлена в соответствии с требованиями Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.04.01 Биология (уровень образования - магистратура).

2. Перечень планируемых результатов обучения, соотнесенных с планируемыми результатами освоения образовательной программы

№ п/п	Код компетенции	Наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения компетенции
1	ПКв-5	Способностью применять знания и навыки в области разработки и применения генетических технологий, в том числе геномного редактирования	ИД1 _{ПКв-5} - Применяет знания и навыки в области биологии и микробиологии для геномного редактирования в профессиональной деятельности
			ИД2 _{ПКв-5} - Разрабатывает методики применения генетических технологий, в том числе геномного редактирования в профессиональной деятельности

Код и наименование индикатора достижения компетенции	Результаты обучения (показатели оценивания)
ИД1 _{ПКв-5} - Применяет знания и навыки в области биологии и микробиологии для геномного редактирования в профессиональной деятельности	Знать: способы использования специальных и постоянно развивающихся новых разделов генетики и генетических технологий, в том числе геномного редактирования, для решения научно-исследовательских и прикладных задач
	Уметь: применять методы геномного, в том числе, метагеномного, транскриптомного, протеомного, метаболомного и биоинформатического анализа, создавать экспериментальные модели профессиональных задач, работать с микроорганизмами
	Владеть: знаниями законодательства и нормативной документации РФ об ограничениях и границах применимости моделей и интерпретации полученных результатов
ИД2 _{ПКв-5} - Разрабатывает методики применения генетических технологий, в том числе геномного редактирования в профессиональной деятельности	Знать: современные генетические технологии в биотехнологии и методики применения генетических технологий, в том числе геномного редактирования в профессиональной деятельности
	Уметь: применять современные методы генетических технологий, в том числе геномного редактирования, в практической деятельности; разрабатывать и внедрять в практику новые методы генетических технологий в сфере пищевой индустрии, основанные на современных перспективных разработках в области генетики и экспериментальной биологии
	Владеть: методами геномной и молекулярной инженерии в практической деятельности для получения биотехнологической продукции

3. Место дисциплины (модуля) в структуре ООП ВО/СПО

Дисциплина относится к *части, формируемой участниками образовательных отношений* Блока 1 ООП. Дисциплина является обязательной к изучению.

Изучение дисциплины основано на знаниях, умениях и навыках, полученных при изучении обучающимися дисциплин: *Биология различных таксономических групп микроорганизмов, Молекулярная биология микробной клетки, Большой практикум по микробиологии, Генетика адаптаций, Система ХАССП в пищевых производствах.*

Дисциплина является предшествующей для следующих дисциплин и практик: *Специальный практикум по микробиологии, Геномика, протеомика и эпигенетика, Современные методы физико-химической биологии, Стратегия биохимической адаптации, Молекулярные методы диагностики в биологии, Современные методы производства микробных биопрепаратов, Учебная практика, практика по направлению профессиональной деятельности, Производственная практика, практика по профилю профессиональной деятельности, практическая подготовка, подготовка к процедуре защиты и защита выпускной квалификационной работы, проведения государственной итоговой аттестации.*

4. Объем дисциплины (модуля) и виды учебной работы

Общая трудоемкость дисциплины (модуля) составляет 3 зачетные единицы.

Виды учебной работы	Всего ак. ч.	Распределение трудоемкости по семестрам, ак. ч
		2 семестр
Общая трудоемкость дисциплины (модуля)	108	108
Контактная работа в т.ч. аудиторные занятия:	80,1	80,1
Лекции	40	40
<i>в том числе в форме практической подготовки</i>	-	-
Практические/лабораторные занятия	38	38
<i>в том числе в форме практической подготовки</i>	38	38
Консультации текущие	2	2
Вид аттестации (зачет)	0,1	0,1
Самостоятельная работа:	27,9	27,9
Проработка материалов по лекциям, учебникам, учебным пособиям	13,9	13,9
Подготовка к лабораторным занятиям	6	6
Домашнее задание, реферат	4	4
Другие виды самостоятельной работы	4	4

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

5.1 Содержание разделов дисциплины (модуля)

№ п/п	Наименование раздела дисциплины	Содержание раздела (указываются темы и дидактические единицы)	Трудоемкость раздела, ак.ч
1	Основы геномного редактирования	Современная классификация генетических разделов. Общегенетические понятия. Структурная организация генома. Процессы переноса генетического материала у микроорганизмов. Генетические технологии – в широком спектре их возможного применения. Биотехнологии – обзор, процессы и перспективы применения. История становления геномной инженерии. Достижение геномной инженерии в настоящее время. Редактирование генома – прикладные аспекты. Современные представления о генетически модифицированных организмах. Нормативная база, обеспечивающая беспрепятственный научный поиск и внедрение полученных результатов.	53,95

2	Подходы к геномному редактированию в пищевой промышленности	Основные молекулярно-генетические методы, применяемые для генетического редактирования. Обзор эндонуклеаз и принцип их работы. Обзор системы CRISPR/CAS. Использование непатогенных вирусов для доставки генетического материала внутрь клеток. Метагеномика как мощный предиктор генетического потенциала микроорганизмов. Транскриптомные и протеомные исследования микроорганизмов. Введение в биоинформатику. Обзор баз данных для успешного геномного редактирования. Практика методов генетических технологий в сфере пищевой индустрии. Недавние международные дискуссии и исследовательская инициатива в научном сообществе.	51,95
<i>Консультации текущие</i>			2,0
<i>Вид аттестации (зачет)</i>			0,1

5.2 Разделы дисциплины и виды занятий

№ п/п	Наименование раздела дисциплины	Лекции, ак. ч	ЛР (или С), ак. ч	СРО, ак. ч
1	Основы геномного редактирования	20	19	13,95
2	Подходы к геномному редактированию в пищевой промышленности	20	19	13,95
<i>Консультации текущие</i>			2,0	
<i>Вид аттестации (зачет)</i>			0,1	

5.2.1 Лекции

№ п/п	Наименование раздела дисциплины	Тематика лекционных занятий	Трудоемкость, ак. ч
1	Основы геномного редактирования	Современная классификация генетических разделов. Общегенетические понятия. Структурная организация генома. Процессы переноса генетического материала у микроорганизмов. Генетические технологии – в широком спектре их возможного применения. Биотехнологии – обзор, процессы и перспективы применения. История становления геномной инженерии. Достижение геномной инженерии в настоящее время. Редактирование генома – прикладные аспекты. Современные представления о генетически модифицированных организмах. Нормативная база, обеспечивающая беспрепятственный научный поиск и внедрение полученных результатов.	20
2	Подходы к геномному редактированию в пищевой промышленности	Основные молекулярно-генетические методы, применяемые для генетического редактирования. Обзор эндонуклеаз и принцип их работы. Обзор системы CRISPR/CAS. Использование непатогенных вирусов для доставки генетического материала внутрь клеток. Метагеномика как мощный предиктор генетического потенциала микроорганизмов. Транскриптомные и протеомные исследования микроорганизмов. Введение в биоинформатику. Обзор баз данных для успешного геномного редактирования. Практика методов генетических технологий в сфере пищевой индустрии. Недавние международные дискуссии и исследовательская инициатива в научном сообществе.	20

5.2.2 Практические занятия (семинары) не предусмотрены

5.2.3 Лабораторный практикум

№ п/п	Наименование раздела дисциплины	Тематика лабораторных занятий	Трудоемкость, ак. ч
1	Основы геномного редактирования	Лабораторная работа №1 "Методы выделения ДНК и последующая оценка количественных и качественных характеристик"	4

		Лабораторная работа №2 "Освоение принципов подбора и конструирования праймеров"	4
		Лабораторная работа №3 "ДНК в молекулярно-генетических исследованиях. Полимеразная цепная реакция"	4
		Лабораторная работа №4 "Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Интерпретация полученных результатов"	4
		Лабораторная работа №5 "Процесс обратной транскрипции"	4
2	Подходы к геномному редактированию в пищевой промышленности	Лабораторная работа №6 "Освоение инструментов для поиска сайтов рестрикции в заданной последовательности"	4
		Лабораторная работа №7 "Генотипирование методом полимеразной цепной реакции с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов"	4
		Лабораторная работа №8 "Методика секвенирования ДНК"	2
		Лабораторная работа №9 "Конструирование плазмиды и ее трансформация в бактерию"	4
		Лабораторная работа №10 "Оценка эффективности трансформации с помощью классических методов микробиологии и современных молекулярно-биологических методов"	4
		Итого:	38

5.2.4 Самостоятельная работа обучающихся

№ п/п	Наименование раздела дисциплины	Вид СРО	Трудоемкость, ак. ч
1	Основы геномного редактирования	Проработка материалов по лекциям, учебникам, учебным пособиям	6,95
		Подготовка к практическим/лабораторным занятиям	3
		Домашнее задание, реферат	2
		Другие виды самостоятельной работы	2
2	Подходы к геномному редактированию в пищевой промышленности	Проработка материалов по лекциям, учебникам, учебным пособиям	6,95
		Подготовка к практическим/лабораторным занятиям	3
		Домашнее задание, реферат	2
		Другие виды самостоятельной работы	2

6 Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины (модуля)

Для освоения дисциплины обучающийся может использовать:

6.1 Основная литература

Генетика : учебник для вузов / Н. М. Макрушин, Ю. В. Плугатарь, Е. М. Макрушина [и др.] ; под редакцией д. с.-х. н. [и др.]. — 3-е изд., перераб. и доп. — Санкт-Петербург : Лань, 2021. — 432 с. <https://e.lanbook.com/book/177828>

Якупов, Т. Р. Молекулярная биотехнология. Биоинженерия : учебное пособие. — Казань : КГАВМ им. Баумана, 2018. <https://e.lanbook.com/book/12295>

Куцев, М. Г. Биоинженерия растений. Основные методы : учебное пособие. — Красноярск : СФУ, 2020. — 80 с. <https://e.lanbook.com/book/181629>

Практикум по молекулярной генетике и биоинженерии : учебно-методическое пособие / составители М. Ю. Сыромятников [и др.]. — Воронеж : ВГУ, 2016. — 55 с. <https://e.lanbook.com/book/165370>

6.2 Дополнительная литература

Якупов, Т. Р. Молекулярная биотехнология : учебник для вузов. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2021. — 160 с. <https://e.lanbook.com/book/179623>

Субботина, Т. Н. Молекулярная биология и генная инженерия : учебное пособие. — Красноярск : СФУ, 2018. — 60 с. <https://e.lanbook.com/book/157528>

Карманова, Е. П. Практикум по генетике : учебное пособие для вузов. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2022. — 228 с. <https://e.lanbook.com/book/200846>

Абылкасымов, Д. Ветеринарная генетика : учебное пособие. — Тверь : Тверская ГСХА, 2020. — 92 с. <https://e.lanbook.com/book/151290>

6.3 Перечень учебно-методического обеспечения для самостоятельной работы обучающихся

Мишанин, Ю. Ф. Биотехнология рациональной переработки животного сырья : учебное пособие для вузов. — Санкт-Петербург : Лань, 2021. — 720 с. <https://e.lanbook.com/book/175152>

Кострова, Ю. С. Задачи линейной алгебры биоинженерной направленности : учебное пособие. — Рязань : РГРТУ, 2018. — 68 с. <https://e.lanbook.com/book/168247>

Кострова, Ю. С. Дифференциальное и интегральное исчисление в задачах биоинженерной направленности : учебное пособие. — Рязань : РГРТУ, 2019. — 72 с. <https://e.lanbook.com/book/168256>

Бурова, Т. Е. Безопасность продовольственного сырья и продуктов питания : учебник. — Санкт-Петербург : Лань, 2020. — 364 с. <https://e.lanbook.com/book/130155>

6.4 Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет», необходимых для освоения дисциплины (модуля)

Наименование ресурса сети «Интернет»	Электронный адрес ресурса
Научная электронная библиотека	http://www.elibrary.ru/defaulttx.asp?
Образовательная платформа «Юрайт»	https://urait.ru/
ЭБС «Лань»	https://e.lanbook.com/
АИБС «МегаПро»	https://biblos.vsuet.ru/MegaPro/Web
Сайт Министерства науки и высшего образования РФ	http://minobrnauki.gov.ru
Электронная информационно-образовательная среда ФГБОУ ВО «ВГУИТ»	http://education.vsuet.ru

6.5 Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса по дисциплине (модулю), включая перечень программного обеспечения и информационных справочных систем

При изучении дисциплины используется программное обеспечение, современные профессиональные базы данных и информационные справочные системы: ЭИОС университета, в том числе на базе программной платформы «Среда электронного обучения ЗКЛ», автоматизированная информационная база «Интернет-тренажеры», «Интернет-экзамен» и пр. (указать средства, необходимы для реализации дисциплины).

При освоении дисциплины используется лицензионное и открытое программное обеспечение

Программы	Лицензии, реквизиты подтверждающего документа
Adobe Reader XI	(бесплатное ПО) https://acrobat.adobe.com/ru/ru/acrobat/pdf-reader/volume-distribution.html
Альт Образование	Лицензия № AAA.0217.00 с 21.12.2017 г. по «Бессрочно»
Microsoft Windows 8	Microsoft Open License

Microsoft Windows 8.1	Microsoft Windows Professional 8 Russian Upgrade Academic OPEN 1 License No Level#61280574 от 06.12.2012 г. https://www.microsoft.com/ru-ru/licensing/licensing-programs/open-license
Microsoft Office Professional Plus 2010	Microsoft Open License Microsoft Office Professional Plus 2010 Russian Academic OPEN 1 License No Level #48516271 от 17.05.2011 г. https://www.microsoft.com/ru-ru/licensing/licensing-programs/open-license Microsoft Open License Microsoft Office Professional Plus 2010 Russian Academic OPEN 1 License No Level #61181017 от 20.11.2012 г. https://www.microsoft.com/ru-ru/licensing/licensing-programs/open-license
Microsoft Office 2007 Standart	Microsoft Open License Microsoft Office 2007 Russian Academic OPEN No Level #44822753 от 17.11.2008г. https://www.microsoft.com/ru-ru/licensing/licensing-programs/open-license
Libre Office 6.1	Лицензия № AAA.0217.00 с 21.12.2017 г. по «Бессрочно» (Включен в установочный пакет операционной системы Альт Образование 8.2)

Справочно-правовые системы

Программы	Лицензии, реквизиты подтверждающего документа
Справочные правовая система «Консультант Плюс»	Договор о сотрудничестве с «Информсвязь-черноземье», Региональный информационный центр общероссийской сети распространения правовой информации Консультант Плюс № 8-99/RD от 12.02.1999 г.

7. Материально-техническое обеспечение дисциплины

Учебная аудитория для проведения учебных занятий №403	Ноутбук, мультимедийный проектор ACER, экран. Комплекты мебели для учебного процесса. Альт Образование 8.2 [Лицензия № AAA.0217.00 г. по «Бессрочно»], Libre Office 6.1 [Лицензия № AAA.0217.00 с 21.12.2017 г. по «Бессрочно» (Включен в установочный пакет операционной системы Альт Образование 8.2)].
Учебная аудитория для проведения учебных занятий №415	Ферментный анализатор ПЛАГ-И, баня водяная УТ 4329Е, насос вакуумный Комовского, поляриметр СМ-3, ноутбук, мультимедийный проектор ACER, экран. Комплекты мебели для учебного процесса. Альт Образование 8.2 [Лицензия № AAA.0217.00 г. по «Бессрочно»], Libre Office 6.1 [Лицензия № AAA.0217.00 с 21.12.2017 г. по «Бессрочно» (Включен в установочный пакет операционной системы Альт Образование 8.2)].
Учебная аудитория для проведения учебных занятий №415	Ячейка BioRad для блота Mini Trans-Blot с камерой комплект, аквадистиллятор АЭ-10 VIO, баня водяная LT-2 двухместная, вертикальная камера для электрофореза, термостат жидкостной 5 ОК-20/0,05, устройство для намотки ватных пробок, рН-метр рН-150 МИ, насос вакуумный 2VP-2, водяной термостат Дольфин ОБН-8, фотометр планшетный Start Fax 2100, принтер внешний Awareness Technology для ФП анализатора Start Fax 2100, рефрактометр ИРФ 454 Б 2М, центрифуга CR3i, горизонтальные весы, прецизионные весы, микроцентрифуга вортекс «Microspin» FV-2400, центрифуга MiniSpin Eppendorf, термостат твердотельный с таймером ТТ-2- «Термит», источник питания Эльф-4, трансиллюминатор ЕТХ-20С, электрофорезная камера Sub-Cell System горизонтальная, термостат с охлаждением ТСО-1/80, термостат 93 л (инкубатор), шейкер-инкубатор Multitron с платформой, термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, шкаф холодильный DM-105S (ШХ-0.5ДС), термостат воздушный 1/20, автоклав автоматический MLS-3020U, стерилизатор паровой ВК-75, морозильник ММ-180 «Позис», сушилка лиофильная ЛС-500, бокс ультрафиолетовый УФ-1, ферментер автоклавируемый с программно-аппаратным комплексом на базе компьютера с монитором Ф-301, ноутбук, мультимедийный проектор ACER, экран. Комплекты мебели для учебного процесса. 0.
Помещение для самостоятельной работы № 416	Компьютеры - 2 шт., ноутбук, мультимедийный проектор ACER, экран. Комплекты мебели для учебного процесса. Альт Образование 8.2 [Лицензия № AAA.0217.00 г. по «Бессрочно»], Libre Office 6.1 [Лицензия №

	AAA.0217.00 с 21.12.2017 г. по «Бессрочно» (Включен в установочный пакет операционной системы Альт Образование 8.2)].
--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Дополнительно, самостоятельная работа обучающихся, может осуществляться при использовании:

Читальные залы ресурсного центра	Компьютеры со свободным доступом в сеть Интернет и Электронными библиотечными и информационно справочными системами.
---------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

8 Оценочные материалы для промежуточной аттестации обучающихся по дисциплине (модулю)

Оценочные материалы (ОМ) для дисциплины (модуля) включают в себя:

- перечень компетенций с указанием индикаторов достижения компетенций, этапов их формирования в процессе освоения образовательной программы;
- описание шкал оценивания;
- типовые контрольные задания или иные материалы, необходимые для оценки знаний, умений, навыков;
- методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности.

ОМ представляются отдельным комплектом и **входят в состав рабочей программы дисциплины (модуля)**.

Оценочные материалы формируются в соответствии с П ВГУИТ «Положение об оценочных материалах».

ПРИЛОЖЕНИЕ
к рабочей программе

1. Организационно-методические данные дисциплины для очно-заочной формы обучения

1.1 Объемы различных форм учебной работы и виды контроля в соответствии с учебным планом

Общая трудоемкость дисциплины (модуля) составляет 3 зачетные единицы.

Виды учебной работы	Всего ак. ч.	Распределение трудоемкости по семестрам, ак. ч
		3 семестр
Общая трудоемкость дисциплины (модуля)	108	108
Контактная работа в т.ч. аудиторные занятия:	32,9	32,9
Лекции	16	16
<i>в том числе в форме практической подготовки</i>	-	-
Практические/лабораторные занятия	16	16
<i>в том числе в форме практической подготовки</i>	16	16
Консультации текущие	0,8	0,8
Вид аттестации (зачет)	0,1	0,1
Самостоятельная работа:	75,1	75,1
Проработка материалов по лекциям, учебникам, учебным пособиям	27,1	27,1
Подготовка к лабораторным занятиям	16	16
Домашнее задание, реферат	16	16
Другие виды самостоятельной работы	16	16

**ОЦЕНОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ
ДЛЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ**

по дисциплине

**Практические подходы геномного редактирования
для пищевой биотехнологии**

1. Перечень планируемых результатов обучения, соотнесенных с планируемыми результатами освоения образовательной программы

№ п/п	Код компетенции	Наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения компетенции
1	ПКв-5	Способностью применять знания и навыки в области разработки и применения генетических технологий, в том числе геномного редактирования	ИД1 _{ПКв-5} - Применяет знания и навыки в области биологии и микробиологии для геномного редактирования в профессиональной деятельности
			ИД2 _{ПКв-5} - Разрабатывает методики применения генетических технологий, в том числе геномного редактирования в профессиональной деятельности

Код и наименование индикатора достижения компетенции	Результаты обучения (показатели оценивания)
ИД1 _{ПКв-5} - Применяет знания и навыки в области биологии и микробиологии для геномного редактирования в профессиональной деятельности	Знать: способы использования специальных и постоянно развивающихся новых разделов генетики и генетических технологий, в том числе геномного редактирования, для решения научно-исследовательских и прикладных задач
	Уметь: применять методы геномного, в том числе, метагеномного, транскриптомного, протеомного, метаболомного и биоинформатического анализа, создавать экспериментальные модели профессиональных задач, работать с микроорганизмами
	Владеть: знаниями законодательства и нормативной документации РФ об ограничениях и границах применимости моделей и интерпретации полученных результатов
ИД2 _{ПКв-5} - Разрабатывает методики применения генетических технологий, в том числе геномного редактирования в профессиональной деятельности	Знать: современные генетические технологии в биотехнологии и методики применения генетических технологий, в том числе геномного редактирования в профессиональной деятельности
	Уметь: применять современные методы генетических технологий, в том числе геномного редактирования, в практической деятельности; разрабатывать и внедрять в практику новые методы генетических технологий в сфере пищевой индустрии, основанные на современных перспективных разработках в области генетики и экспериментальной биологии
	Владеть: методами геномной и молекулярной инженерии в практической деятельности для получения биотехнологической продукции

2 Этапы формирования компетенций в процессе освоения дисциплины

№ п/п	Разделы дисциплины	Код и наименование индикатора достижения компетенции	Оценочные средства		Технология/процедура оценивания (способ контроля)
			наименование	№№ заданий	
1	Основы геномного редактирования	ПКв-5	Банк тестовых заданий	1-35	Компьютерное тестирование Компьютерное тестирование Процентная шкала. 0-100 %; 0-59,99% - неудовлетворительно; 60-74,99% - удовлетворительно; 75- 84,99% -хорошо; 85-100% - отлично.
				36-60	Проверка преподавателем

					Отметка в системе «зачтено – не зачтено»
			Собеседование (вопросы для зачета)	61-95	Проверка преподавателем Отметка в системе «зачтено – не зачтено»
			Задания для практических работ	131-134	Проверка преподавателем Отметка в системе «зачтено – не зачтено»
			Домашнее задание	139-141	Проверка преподавателем Отметка в системе «зачтено – не зачтено»
2	Подходы к геномному редактированию в пищевой промышленности	ПКв-5	Банк тестовых заданий	1-35	Компьютерное тестирование Компьютерное тестирование Процентная шкала. 0-100 %; 0-59,99% - неудовлетворительно; 60-74,99% - удовлетворительно; 75- 84,99% -хорошо; 85-100% - отлично.
				36-60	Проверка преподавателем Отметка в системе «зачтено – не зачтено»
			Собеседование (вопросы для зачета)	96-130	Проверка преподавателем Отметка в системе «зачтено – не зачтено»
			Задания для практических работ	135-138	Проверка преподавателем Отметка в системе «зачтено – не зачтено»
			Домашнее задание	142-145	Проверка преподавателем Отметка в системе «зачтено – не зачтено»

3 Оценочные материалы для промежуточной аттестации.

Типовые контрольные задания или иные материалы, необходимые для оценки знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций в процессе освоения образовательной программы

Для оценки знаний, умений, навыков студентов по дисциплине применяется бально-рейтинговая система оценки сформированности компетенций студента.

Бально-рейтинговая система оценки осуществляется в течение всего семестра при проведении аудиторных занятий и контроля самостоятельной работы.

Показателями ОМ являются: текущий опрос в виде собеседования на лабораторных работах, практических занятиях, тестовые задания в виде решения контрольных работ на практических работах и самостоятельно (домашняя контрольная работа) и сдачи курсовой работы по предложенной преподавателем теме (при наличии). Оценки выставляются в соответствии с графиком контроля текущей успеваемости студентов в автоматизированную систему баз данных (АСУБД) «Рейтинг студентов».

Обучающийся, набравший в семестре более 60 % от максимально возможной балльно-рейтинговой оценки работы в семестре получает зачет автоматически. Студент, набравший за текущую работу в семестре менее 60 %, т.к. не выполнил всю работу в семестре по объективным причинам (болезнь, официальное освобождение и т.п.) допускается до зачета, однако ему дополнительно задаются вопросы на собеседовании по разделам, выносимым на зачет.

Аттестация обучающегося по дисциплине проводится в форме тестирования и предусматривает возможность последующего собеседования (зачета). Зачет проводится в виде тестового задания.

Каждый вариант теста включает 15 контрольных заданий, из них:

- 5 контрольных заданий на проверку знаний;
- 5 контрольных заданий на проверку умений;
- 5 контрольных заданий на проверку навыков;

В случае неудовлетворительной сдачи зачета студенту предоставляется право повторной сдачи в срок, установленный для ликвидации академической задолженности по итогам соответствующей сессии. При повторной сдаче зачета количество набранных студентом баллов на предыдущем зачете не учитывается.

3.1 Тесты (тестовые задания)

3.1.1 Шифр и наименование компетенции

ПКв-5 способен применять знания и навыки в области разработки и применения генетических технологий, в том числе геномного редактирования

№ задания	Тестовое задание
1.	Наука о наследственности и изменчивости — это ... А. Биология Б. Цитология В. Генетика Г. Вирусология
2.	Генная инженерия зародилась в: А. 1970 г. Б. 1972 г. В. 1974 г. Г. 1982 г.
3.	Методы исследования, применяемые в цитологии: А. микроскопические и биохимические Б. цитогенетический и моделирования В. гистохимические и микрургии Г. генеалогический и микроскопические Д. дифференциальное центрифугирование и цитогенетический
4.	Функции ядра: А. синтез специфических белков Б. хранение и передача генетической информации В. реализация генетической информации Г. синтез полисахаридов Д. регуляция процессов жизнедеятельности клетки
5.	Генетический аппарат вирусов представлен: А. ДНК Б. РНК В. комплексом ДНК и РНК Г. комплексом ДНК и белка Д. комплексом РНК и белка
6.	Нуклеоид — это: А. «хромосома» прокариот Б. хромосома эукариот В. кольцевая молекула ДНК, образующая комплекс с белками гистонами Г. кольцевая молекула ДНК, образующая комплекс с негистоновыми белками

	Д. мономер нуклеиновой кислоты
7.	Цели генной инженерии: А. преодоление межвидовых барьеров Б. передача отдельных наследственных признаков одних организмов другим В. способность нарабатывать «человеческие» белки Г. все верны
8.	Свойства гена: А. стабильность и лабильность Б. целостность и плейотропность В. целостность, специфичность и однозначность Г. дискретность и неспецифичность Д. специфичность, триплетность и универсальность
9.	Основные этапы генной инженерии: А. получение необходимого генетического материала Б. построение генетической карты хромосомы В. расшифровка порядка нуклеотидов участка ДНК и создание рекомбинантной ДНК Г. отбор трансформированных клеток Д. включение рекомбинантной молекулы ДНК в хромосому
10.	Будущее генной инженерии базируется на следующих достижениях молекулярной биологии: А. возможности переноса генетической информации у эукариот половым путем Б. получении модификаций с помощью химических мутагенов В. секвенировании генов Г. замене дефектных генов Д. включении в геном человека искусственно синтезированных генов
11.	Белки, конденсирующие хроматин при делении клеток А. когезины Б. гистоны В. циклины Г. конденсины Д. тубулины
12.	<u>Названия комплексов:</u> А. Реплисома (комплекс репликативной вилки); Б. ДНК-лигаза; В. РНК-полимераза; Г. Рибосома; Д. Нуклеаза Cas9; <u>Информация о комплексах:</u> 1. В этом комплексе встречаются три основных типа РНК: мРНК, тРНК и рРНК; 2. Этот комплекс осуществляет синтез ДНК; 3. Этот белок является удобным инструментом для редактирования геномов; 4. Этот белок необходим для соединения фрагментов Оказаки; 5. Субстратами для этого фермента служат рибонуклеозидтрифосфаты; Ответы: А-2; Б-4; В-5; Г-1; Д-3.
13.	CRISPR в прокариотической клетке выполняет функцию: А. Противовирусной защиты Б. Репликации ДНК В. Устойчивости к антибиотикам Г. Устойчивости к факторам окружающей среды

14.	<p>Сущность процесса трансляции заключается:</p> <p>А. В синтезе молекулы видоспецифичного белка</p> <p>Б. В синтезе тРНК</p> <p>В. В удвоении молекулы ДНК</p> <p>Г. В синтезе иРНК</p>
15.	<p>В состав рнк входят азотистые основания:</p> <p>А. Гуанин</p> <p>Б. Аденин</p> <p>В. Урацил</p> <p>Г. Тимин</p> <p>Д. Глицин</p>
16.	<p>Функция РНК в клетке:</p> <p>А. Запасающая</p> <p>Б. Энергетическая</p> <p>В. Сократительная</p> <p>Г. Участие в биосинтезе белка</p>
17.	<p>Для доставки нуклеиновых кислот в клетке не может быть использован:</p> <p>А. Аденоассоциированный вирус</p> <p>Б. Аденовирус</p> <p>В. Вирус Эпштейна-Барр</p> <p>Г. Лентивирус</p>
18.	<p>К методу геномного редактирования относят:</p> <p>А. ПЦР</p> <p>Б. ПДРФ</p> <p>В. CRISPR-Cas9</p> <p>Г. NGS</p>
19.	<p>Лентивирусные векторы отличаются:</p> <p>А. Высокой пакующей емкостью</p> <p>Б. Инсерционным мутагенезом</p> <p>В. Транзиторной экспрессией</p> <p>Г. Тропизмом к определенным клеткам</p>
20.	<p>Определенная мутация в гене CCR5 делает человека не восприимчивым к:</p> <p>А. Бледной трепонеме</p> <p>Б. Вирусу гепатита С</p> <p>В. Вирусу гриппа</p> <p>Г. Вирусу иммунодефицита человека</p>
21.	<p>Под редактированием оснований понимают метод геномного редактирования, позволяющий:</p> <p>А. Внести индел в последовательность ДНК</p> <p>Б. Внести однонуклеотидную замену в ДНК</p> <p>В. Интегрировать фрагмент гена</p> <p>Г. Удалить экзон из ДНК</p>
22.	<p>Участки транскриптона, активирующие или дезактивирующие РНКполимеразу через транскрипционные факторы у эукариот:</p> <p>А. энхансеры</p> <p>Б. промоторы</p> <p>В. терминаторы</p> <p>Г. сайленсеры</p> <p>Д. домен Прибнова</p>

23.	<p>Гомеозисные гены:</p> <p>А. кодируют факторы транскрипции Б. кодируют РНК-полимеразы В. контролируют формирование структур тела в развитии Г. кодируют белки типа «лейциновая молния» кодируют гистоны</p>
24.	<p>Энхансер:</p> <p>А. имеется только у эукариот Б. входит в состав промотора В. обладает ткане- и видоспецифичностью Г. активен только вблизи кодирующей части гена Д. связывается с белком-активатором</p>
25.	<p>Репарация ДНК происходит:</p> <p>А. в G0-периоде клеточного цикла Б. в G1-периоде В. в S-периоде Г. в G2-периоде Д. во всех перечисленных выше периодах</p>
26.	<p>У любого человека в течение жизни в норме может изменяться:</p> <p>А. Количество хромосом Б. Количество генов В. Последовательность нуклеотидов генов, кодирующих белки Г. Последовательность нуклеотидов не кодирующих участков генома Д. Длина теломер хромосом</p>
27.	<p>Резкое увеличение риска развития рака при мутациях генов BRCA обусловлено:</p> <p>А. нарушением репарации ДНК Б. нарушением репликации ДНК В. увеличением количество онкогенов Г. нарушением механизмов апоптоза Д. увеличением длины теломер хромосом</p>
28.	<p>Генная инженерия, позволяющая исправить генетические ошибки и лечить наследственные заболевания</p> <p>А. у человека в настоящее время не возможна: Б. будет внедрена в клиническую практику в ближайшем будущем В. проходит клинические испытания в настоящее время Г. начала применяться уже более 20 лет назад Д. применяется только в экспериментах на животных</p>
29.	<p>Учение о способах улучшения генофонда человека:</p> <p>А. Геномика Б. Транскриптомика В. Протеомика Г. Эпигенетика Д. Евгеника</p>
30.	<p>Геном это:</p> <p>А. хромосомный набор данного организма Б. набор хромосом и содержащихся в них генов организма или вида В. совокупность генов и аллелей данного организма Г. совокупность генов, содержащихся в клетке в одинарном наборе ДНК Д. последовательность нуклеотидов, содержащаяся в одинарном наборе хромосом и митохондрий клетки</p>
31.	<p>Бактерии это:</p> <p>А. Микроорганизмы, не имеющие оформленного ядра Б. Относятся к эукариотам В. Имеют ядерную оболочку Г. Имеют капсид Д. Мельчайшие, не видимые в световом микроскопе частицы</p>

32.	<p>Введение рекомбинантных плазмид в бактериальные клетки – это:</p> <p>А. Лигирование Б. Скрининг В. Трансформация Г. Рестрикция</p>
33.	<p>Рестрикция – это:</p> <p>А. Отбор клонов трансформированных бактерий, содержащих плазмиды, несущие нужный ген человека Б. Введение бактериальных плазмид в бактериальную клетку В. Разрезание ДНК человека и плазмиды ферментом рестрикционной эндонуклеазой Г. Включение фрагментов ДНК человека в плазмиды и сшивание «липких» концов</p>
34.	<p>Основоположником генной инженерии по праву считают:</p> <p>А. Вернера Арбера Б. Пола Берга В. Дэвида Балтимора Г. Говарда Темина</p>
35.	<p>Протеомика характеризует состояние микробного патогена:</p> <p>А. По ферментативной активности Б. По скорости роста В. По экспрессии отдельных белков Г. По нахождению на конкретной стадии ростового цикла</p>
36.	<p>Агробактерии используют для модификации генома: Ответ – растений</p>
37.	<p>Наличие интронов и экзонов не характерно для ДНК: Ответ – прокариот</p>
38.	<p>С помощью какого метода осуществляют расшифровку первичной структуры ДНК: Ответ – секвенирование</p>
39.	<p>Фермент, который разрезает молекулу ДНК: Ответ – рестриктаза</p>
40.	<p>Фермент, который сшивает фрагменты ДНК: Ответ – лигаза</p>
41.	<p>Какая бактерия стала первым объектом генной инженерии: Ответ – E.coli</p>

42.	CRISPR в прокариотической клетке выполняет функцию: Ответ - противовирусной защиты
43.	Биологической функцией системы CRISPR-Cas9 является: защита прокариотической клетки от вирусов путем расщепления нуклеиновых кислот
44.	Направляющая РНК используется в методе геномного редактирования: Ответ – CRISPR-Cas9
45.	Основной проблемой использования CRISPR-Cas9 в эукариотических клетках является: Ответ – неспецифическое связывание с последовательностью ДНК
46.	У бактерий система CRISPR-Cas9 уничтожает вирус путем: Ответ – фрагментации ДНК вируса
47.	Для амплификации фрагментов длиной 10 т.п.н требуется использовать следующий вид ПЦР: 1. Long-range ПЦР 2. SNP-detected ПЦР 3. ПЦР с Taq-Man зондами 4. RAPD-ПЦР
48.	В ПЦР-лаборатории в качестве средства для деконтаминации используется: 1) 70%-ный раствор этилового спирта; 2) 6%-ный раствор пероксида водорода; 3) 3%-ный раствор хлорамина Б; 4) 0,2%-ный раствор ДП-2Т.
49.	С какой целью применяются ионы магния в ПЦР? Ответ – для функционирования ДНК-полимеразы
50.	Полимераза из какого организма чаще всего используется для проведения ПЦР? Ответ – <i>Thermus aquaticus</i>
51.	В эксперименте было показано повышение активности бета-галактозидазы после внесения лактозы в культуральную среду с <i>E. coli</i> . Какой участок лактозного оперона становится разблокированным от репрессора в этих условиях? Ответ – оператор

52.	Совокупность методов, позволяющих переносить генетическую информацию из одного организма в другой – это: Ответ – генная инженерия;
53.	Скрининг в генной инженерии эти? Ответ – отбор клонов трансформированных бактерий, содержащих плазмиды, несущие нужный ген
54.	Какой краситель используется для окрашивания одноцепочечной ДНК? Ответ – SYBR GOLD
55.	Укажите, какие ключевые реактивы необходимы для выделения РНК тризольным методом. Ответ – фенол, гуанидин-изотиоцианат, хлороформ, изопропанол, этанол.
56.	Рассчитайте температуру плавления представленных последовательностей ДНК: AGAGTTTGGCTCAGAGAGTTTGGCTCAG и AGTGTGGCTCAGAGATGATCCTGGCTGAG. Возможно ли их дифференциация (идентификация) с помощью анализа кривых плавления. Ответ – первая последовательность – 69 °С, вторая последовательность – 68 °С. Дифференцировать возможно.
57.	С помощью какого метода можно увеличить чистоту выделенного препарата ДНК. Ответ – с помощью очистки на основе магнитных частиц.
58.	О чем может свидетельствовать наличие двух и более пиков при анализе кривых плавления ПЦР продукта? Ответ – О наличии двух и более ПЦР продуктов с разной температурой плавления
59.	После выделения ДНК соотношение 260/280 было меньше 1.8. Что вы можете предпринять чтобы улучшить качество ДНК. Ответ – переосадить спиртом и промыть или осуществить дополнительную очистку магнитными частицами.
60.	С помощью какого метода можно оценивать длины рестрикционных фрагментов? Ответ – с помощью электрофореза в агарозном геле

Критерии и шкалы оценки:

Процентная шкала **0-100 %**; отметка в системе

«неудовлетворительно, удовлетворительно, хорошо, отлично»

0-59,99% - неудовлетворительно;

60-74,99% - удовлетворительно;

75- 84,99% -хорошо;

85-100% - отлично.

3.2 Собеседование (вопросы для зачета)

ПКв-5 способен применять знания и навыки в области разработки и применения генетических технологий, в том числе геномного редактирования

Номер вопроса	Текст вопроса
61	<p>Современная классификация генетических разделов. Генетические разделы применимые для геномного редактирования.</p> <p>Ответ: Генетика – фундамент современной биологии. Вся генетика (как и любая наука) подразделяется на фундаментальную и прикладную. Фундаментальная генетика изучает общие закономерности наследования признаков у лабораторных, или модельных видов: вирусов (например, Т-чётных фагов), прокариот (например, кишечной палочки), плесневых и дрожжевых грибов, дрозофилы, мышей и некоторых других. К ней относятся следующие разделы: классическая (формальная) генетика, цитогенетика, молекулярная генетика (в т.ч., генетика ферментов и иммуногенетика), генетика мутагенеза (в т.ч., радиационная и химическая генетика), эволюционная генетика, геномика и эпигеномика, генетика индивидуального развития и эпигенетика, генетика поведения, генетика популяций, экологическая генетика (в т.ч., генетическая токсикология), математическая генетика. Для геномного редактирования активно используется геномная инженерия. Генетическая инженерия – это раздел молекулярной генетики, связанный с целенаправленным созданием <i>in vitro</i> новых комбинаций генетического материала, способного размножаться в клетке-хозяине и синтезировать конечные продукты обмена. Геномная инженерия возникла в 1972, когда в лаборатории П. Берга была получена первая рекомбинантная (гибридная) ДНК (рекДНК), в которой были соединены фрагменты ДНК фага лямбда и кишечной палочки с кольцевой ДНК обезьяньего вируса SV40.</p>
62	<p>Классическая генетика. Законы Менделя.</p> <p>Ответ: Предметом генетики является изучение закономерностей и механизмов, а также структуры и функции реализации генетического материала и генетической информации. Т.о. генетика изучает два фундаментальных свойства живого: наследственность и изменчивость. Наследственность – свойство живых организмов передавать в ходе размножения особенности структур и функций. Изменчивость – это свойство живых систем существовать в различных состояниях, переходя из одного состояния в другое. Главным методом генетики является изучение процесса наследования, т.е. процессов передачи генетической информации от родителей к потомкам, включая результаты этой передачи. Наследственность связана с работами Грегора Менделя, который впервые сформулировал законы наследования – основу дискретной теории наследственности. Методы работы Менделя. Он впервые вводит гибридологический метод исследования, который подразумевает скрещивание разных форм в нужном состоянии. В качестве объекта исследования выступало самоопыляемое растение с большим количеством сортов - горох. Для различных сортов характерны альтернативные признаки. Признаки передаются из поколения в поколение.</p> <p>Мендель впервые ввел в науку статистические методы обработки. Эти методы подразумевают анализ большого количества исследуемого материала, поэтому горох был достаточно удобным объектом. Законы Менделя. Закон единообразия 1ого поколения (1ый закон Менделя). При скрещивании двух родителей, различающихся по одному признаку (гомозиготы) все потомство будет единообразно. Второй закон Менделя (закон расщепления): при моногибридном скрещивании гетерозиготных особей во втором поколении наблюдается расщепление по фенотипу 3:1 и по генотипу 1:2:1. Третий закон Менделя (закон независимого наследования): гены разных аллельных пар и соответствующие им признаки наследуются независимо.</p>
63	<p>Цитогенетика. Хромосомная теория наследственности.</p> <p>Ответ: Раздел генетики, изучающий хромосомы как носители наследственной информации, называется цитогенетикой. Существует два основных способа деления эукариотических клеток: митоз и мейоз. При митозе и мейозе часть хромосом перемещается к одному полюсу клетки, а часть – к другому. При этом морфология хромосом изменяется. Митоз и мейоз различаются по способам перемещения хромосом. Митоз (от древнегреч. «митос» – нить) является универсальным способом деления эукариотических клеток. Иногда митоз называют непрямым делением.</p>

	<p>Мейоз – это особый способ деления эукариотических клеток, при котором исходное число хромосом уменьшается в два раза. Изучение хромосом как носителей информации происходило в лаборатории Томаса Морган (США). В качестве основного объекта исследований Морган использовал плодовую мушку дрозофилу (<i>Drosophila melanogaster</i>). Основные положения хромосомной теории наследственности: Ген – это элементарный наследственный фактор (термин «элементарный» означает «неделимый без потери качества»). Ген представляет собой участок хромосомы, отвечающий за развитие определенного признака. Иначе говоря, гены локализованы в хромосомах. В одной хромосоме могут содержаться тысячи генов, расположенных линейно (подобно бусинкам на нитке). Эти гены образуют группы сцепления. Число групп сцепления равно числу хромосом в гаплоидном наборе. Если гены сцеплены между собой, то возникает эффект и сцепленного наследования признаков, т.е. несколько признаков наследуются так, как будто они контролируются одним геном. При сцепленном наследовании в череде поколений сохраняются исходные сочетания признаков. Сцепление генов не абсолютно: в большинстве случаев гомологичные хромосомы обмениваются аллелями в результате перекреста (кроссинговера) в профазе первого деления мейоза. Вероятность появления новых сочетаний признаков вследствие кроссинговера прямо пропорциональна физическому расстоянию между генами. Это позволяет определять относительное расстояние между генами и строить генетические (кроссоверные) карты разных видов организмов. Кроссинговер (от англ. crossing-over – перекрёст) – это процесс обмена гомологичными участками гомологичных хромосом (хроматид).</p>
64	<p>Молекулярная генетика. Общая схема биосинтеза белка. Ответ: Молекулярная генетика – раздел генетики, который занимается изучением наследственности на молекулярном уровне. Нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК) были открыты в 1868 году швейцарским биохимиком И.Ф. Мишером. Нуклеиновые кислоты – линейные биополимеры, состоящие из мономеров – нуклеотидов. Химическую структуру ДНК расшифровали в 1953 г. американский биохимик Дж. Уотсон и английский физик Ф. Крик. Молекула ДНК состоит из 2 цепей, которые закручены в спираль одна вокруг другой и вокруг общей оси. Вдоль спирали молекулы ДНК соседние нуклеотиды располагаются на расстоянии 0,34 нм друг от друга. Полный оборот спирали включает 10 пар нуклеотидов. Его длина составляет 3,4 нм. Биосинтез белков представляет собой начальный этап реализации, или экспрессии генетической информации. К главным матричным процессам, обеспечивающим биосинтез белков, относятся транскрипция ДНК и трансляция мРНК. Транскрипция ДНК заключается в переписывании информации с ДНК на мРНК (матричную, или информационную РНК). Трансляция мРНК заключается в переносе информации с мРНК на полипептид. Молекула мРНК служит матрицей для синтеза полипептида на рибосомах. Триплеты мРНК, кодирующие определенную аминокислоту, называются кодонами. В трансляции принимают участие молекулы тРНК. Каждая молекула тРНК содержит антикодон – распознающий триплет, в котором последовательность нуклеотидов комплементарна по отношению к определенному кодону мРНК. Общая схема биосинтеза: ДНК – РНК – Белок</p>
65	<p>Генная инженерия и этапы её развития. Область применения. Ответ: Генная инженерия (генетическая инженерия), совокупность методов молекулярной генетики, направленных на искусственное создание новых, не встречающихся в природе сочетаний генов. Те или иные чужеродные для данного организма гены вводят в его клетки и встраивают в его геном с различными целями: для изучения строения и функций генетического аппарата, для эффективной выработки продукта данного гена (для гормона или антибиотика), для придания организму-хозяину каких-либо желаемых свойств (для сельскохозяйственных растений и животных – большей продуктивности или большей устойчивости к инфекциям или паразитам), для замещения (компенсации) генов, дефекты которых вызывают наследственные заболевания. Во второй половине XX века было сделано несколько важных открытий и изобретений, лежащих в основе генной инженерии. Работа была начата английским учёным Ф. Сенгером и американским учёным У. Гилбертом. В генах содержится информация для синтеза в организме молекул РНК и белков, в том числе ферментов. Генная инженерия служит для получения желаемых качеств изменяемого или генетически модифицированного организма. В отличие от традиционной селекции, в ходе которой генотип подвергается изменениям лишь косвенно, генная инженерия позволяет непосредственно вмешиваться в генетический аппарат, применяя технику молекулярного клонирования. Примерами</p>

	<p>применения генной инженерии являются получение новых генетически модифицированных сортов зерновых культур, производство человеческого инсулина путём использования генномодифицированных бактерий, производство эритропоэтина в культуре клеток или новых пород экспериментальных мышей для научных исследований.</p>
66	<p>Генная инженерия влияет на здоровье и благополучие человека. Ответ: С появлением генно-инженерных методов стало ясно, что они несут в себе потенциальную опасность. В самом деле, если в бактерию кишечную палочку, обычного обитателя кишечника человека, ввести гены устойчивости к антибиотикам, а потом ген, кодирующий сильный яд, и вылить таких бактерий в водопровод, то это может привести к тяжелейшим последствиям. Из этого следует, что опыты по генной инженерии требуют соблюдения мер предосторожности и государственного контроля. Некоторые потенциально опасные исследования (например, включение генов опухолеродных вирусов в ДНК плазмид) еще недавно находились под запретом. Многие предлагают запретить генную инженерию. Однако эти предложения не обоснованы по следующим причинам. Во-первых, в настоящее время разработаны безопасные «векторы», которые вряд ли могут выживать и размножаться вне лабораторий. Он включает в себя несколько стадий: разрезание ДНК человека, включение фрагментов ДНК человека в плазмиды, введение рекомбинантных плазмид в бактериальные клетки, отбор среди клонов трансформированных бактерий тех, которые несут нужный человеческий ген. Во-вторых, в большинстве экспериментов используется бактерия <i>Escherichia coli</i>, а это повсеместно распространенный вид, живущий в кишечнике человека. Но лабораторные штаммы этой бактерии существуют вне тела человека уже на протяжении многих тысяч поколений. В-третьих, отработаны обычные меры техники безопасности, при соблюдении которых исключены утечки опасных генетических конструкций. В-четвертых, в природе существуют пути переноса ДНК от одних видов другим, аналогичные тем, что используются в лабораториях, а генную инженерию, осуществляемую природой, нельзя запретить.</p>
67	<p>Этические проблемы, касающиеся генной инженерии. Ответ: Последние десятилетия XX в. ознаменовались бурным развитием одной из главных ветвей биологической науки – молекулярной генетики, которое привело к появлению нового направления – генной инженерии. На основе ее методологии начали разрабатываться различного рода биотехнологии, создаваться генетически измененные организмы, генетически модифицированные продукты. Появились возможности генетической терапии некоторых заболеваний человека, его зародышевых и соматических клеток, получения идентичных генетических копий данного организма и другие, родственные им направления. Эти формы генетического вмешательства в природу организма уже сейчас требуют оценки и обсуждения своих социально-экономических последствий, как в силу того, что вырабатываемые в ходе дискуссий решения воздействуют на направления и темпы проводимых исследований, так и с точки зрения формирования адекватной реакции общества на возможность и необходимость их использования. Вместе с тем, если перестройка генома взрослого индивида по медицинским показаниям или по его желанию полностью приемлема в этическом отношении, то совершенно иная ситуация возникает при изменении генома зародышевых клеток, так как: а) деятельность может быть квалифицирована как проведение исследований на еще не рожденных индивидах, что само по себе аморально; б) если плохо сконструированная машина может быть разобрана, то аналогичное действие в случае неудачно завершившегося эксперимента с геномом человека уже невозможно; в) если допущенные при конструировании машины просчеты ограничиваются единичным объектом, то ошибочно сконструированный геном способен к распространению (передаче потомству); г) характер взаимодействия «новых» генов с геномом в целом все еще изучен недостаточно, и перестройка генома зародышевых клеток может приводить к возникновению непредсказуемых последствий.</p>
68	<p>Достижения современной генной инженерии. Ответ: К достижениям относят: а) создание банка генов клонов бактерий с частицами ДНК различных биологических организмов, в том числе – человека; б) промышленное производство инсулина, интерферона, гормональных фармацевтических препаратов на основе ГМ штаммов вирусов, бактерий и дрожжей; в) создание высших биологических организмов (растений, рыб, млекопитающих). Организмы, несущие в своем геноме рекомбинантный (чужеродный) ген, принято называть трансгенными, а ген, интегрированный в геном реципиента, — трансгеном.</p>

	<p>Продукт этого гена (белок) является трансгенным. Благодаря переносу генов у трансгенных животных возникают новые качества. Этапы получения трансгенных мышей от введения фрагмента ДНК, содержащего несколько копий нужного гена в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки мыши с помощью микропипетки до получения взрослых особей, несущих чужеродную ДНК в каждом клеточном ядре. Метод микроинъекции ДНК в оплодотворенные яйцеклетки с 1982-го года до настоящего времени остается наиболее популярным у исследователей, занятых получением трансгенных животных, несмотря на то, что он требует высокой квалификации и дорогостоящего оборудования. В последние годы при создании трансгенных животных используют также эмбриональные стволовые клетки (ЕС-клетки), которые берутся из эмбриона на самых ранних стадиях развития (из бластоцисты). ЕС-клетки можно культивировать <i>in vitro</i>, вводить в них целевые трансгены или методом прямой инъекцией, или с помощью векторов.</p>
69	<p>Организация генома вирусов. Ответ: Вирусы являются яркими представителями внеклеточной формы жизни. Просто организованные вирусы представляют собой нуклеопротеиды или нуклеокапсиды и состоят из нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК) и нескольких кодируемых ею белков, формирующих вирусную оболочку вокруг нуклеиновой кислоты — капсид. Сложно организованные вирусы содержат дополнительные оболочки, белковые или липопротеидные, и имеют более сложный химический состав. Помимо нуклеиновой кислоты и белков, они содержат липиды в наружных оболочках и углеводы в составе белков' наружных оболочек (гликопротеидов). Обычно липиды и углеводы имеют клеточное происхождение. В составе некоторых вирусов обнаруживаются также клеточные нуклеиновые кислоты и белки. Вирусные нуклеиновые кислоты характеризуются поразительным разнообразием форм. Вирусный геном может быть представлен как однонитчатыми, так и двунитчатыми молекулами РНК и ДНК. ДНК может быть как линейной, так и кольцевой молекулой, РНК — как непрерывной, так и фрагментированной и кольцевой молекулой.</p>
70	<p>Структурная организация генома прокариот. Кишечная палочка (<i>E. coli</i>) геном. Ответ: Прокариоты – это организмы, в клетках которых отсутствует оформленное ядро. Его функции выполняет нуклеоид (то есть «подобный ядру»); в отличие от ядра, нуклеоид не имеет собственной оболочки. Тело прокариот, как правило, состоит из одной клетки. Однако при неполном расхождении делящихся клеток возникают нитчатые, колониальные и полинуклеоидные формы (бактероиды). В прокариотических клетках отсутствуют постоянные двумембранные и одномембранные органоиды: пластиды и митохондрии, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи и их производные. Их функции выполняют мезосомы – складки плазматической мембраны. В цитоплазме фотоавтотрофных прокариот имеются разнообразные мембранные структуры, на которых протекают реакции фотосинтеза. Иногда их называют бактериальными хроматофорами. Специфическим веществом клеточной стенки прокариот является муреин, однако у некоторых прокариот муреин отсутствует. Поверх клеточной стенки часто имеется слизистая капсула. Пространство между мембраной и клеточной стенкой служит резервуаром протонов при фотосинтезе и аэробном дыхании. Размеры прокариотических клеток изменяются от 0,1-0,15 мкм (микоплазмы) до 30 мкм и более. Большинство бактерий имеет размеры 0,2-10 мкм. У подвижных бактерий имеются жгутики, основой которых служат белки флагеллины. Основу генетического аппарата кишечной палочки составляет бактериальная хромосома, входящая в состав нуклеоида – ядерноподобной структуры. Нуклеоид по морфологии напоминает соцветие цветной капусты и занимает примерно 30% объема цитоплазмы. Бактериальная хромосома представляет собой кольцевую двуспиральную правозакрученную молекулу ДНК, которая свернута во вторичную спираль. Длина бактериальной хромосомы составляет примерно 4,7 млн. нуклеотидных пар или ~ 1,6 мм. Вторичная структура хромосомы поддерживается с помощью гистоноподобных (основных) белков и РНК. Точка прикрепления бактериальной хромосомы к мезосоме (складке плазмалеммы) является точкой начала репликации ДНК (эта точка носит название OriC). Бактериальная хромосома удваивается перед делением клетки, и сестринские копии распределяются по дочерним клеткам с помощью мезосомы. Репликация ДНК идет в две стороны от точки OriC и завершается в точке TerC. Молекулы ДНК, способные себя воспроизводить путем репликации, называются репликоны. Одна бактериальная хромосома содержит до 1000 известных генов. Обычно это гены «домашнего хозяйства», то есть необходимые для поддержания жизнедеятельности клетки. Все множество известных генов делится на 10 групп, контролирующих</p>

	процессы.
71	<p>Структурная организация генома эукариот. Плаزمиды.</p> <p>Ответ: Для клеток эукариот характерно наличие оформленного ядра. Информационной макромолекулой их генома является ДНК, которая неравномерно распределена по нескольким хромосомам в виде комплексов с многочисленными белками. Однако генетическую информацию в клетках содержат не только хромосомы ядра. Жизненно важная генетическая информация заключена и во внехромосомных молекулах ДНК. У эукариот — это ДНК хлоропластов, митохондрий и других пластид. Под геномом эукариотического организма в настоящее время понимают суммарную ДНК гаплоидного набора хромосом и каждого из внехромосомных генетических элементов, содержащуюся в отдельной клетке зародышевой линии многоклеточного организма. Геном эукариот существенно отличается от генома прокариот по ряду признаков, среди которых необходимо отметить его избыточность. Эукариотическая клетка содержит во много раз больше генов, чем прокариотическая. Повышенное содержание ДНК в геноме эукариот нельзя объяснить лишь увеличением потребности этих организмов в дополнительной генетической информации в связи с усложнением организации, поскольку большая часть их геномной ДНК, как правило, представлена некодирующими последовательностями нуклеотидов. Феномен значительной избыточности генома эукариот в отношении некодирующих последовательностей нуклеотидов известен под названием «парадокса С». Эукариотический ген можно рассматривать как совокупность сегментов ДНК, которые вместе составляют экспрессируемую единицу, ответственную за образование специфического функционального продукта — либо молекулы РНК, либо полипептида. К сегментам ДНК, составляющим ген, относятся следующие элементы: Единица транскрипции — это участок ДНК, кодирующий первичный транскрипт. Он включает: а) последовательность, которая обнаруживается в зрелых функциональных молекулах РНК; б) интроны (для мРНК); в) промежуточные последовательности - спейсеры (для рРНК). Интроны и спейсеры удаляются в ходе процессинга первичных транскриптов; г) 5'- и 3'-нетранслируемые последовательности (5'-НТП и 3'-НТП). Минимальные последовательности, необходимые для начала транскрипции (промотор) и конца транскрипции (терминатор). Последовательности, регулирующие частоту инициации транскрипции, ответственные за индуцибельность и репрессию транскрипции, а также клеточную, тканевую и временную специфичность транскрипции. Они разнообразны по строению, положению и функциям. К их числу относятся энхансеры и сайленсеры - это последовательности ДНК, расположенные в тысячах пар нуклеотидов от промотора эукариотического гена и оказывающие дистанционное влияние на его транскрипцию. Плазмиды - это небольшая молекула внехромосомной ДНК внутри клетки, которая физически отделена от хромосомной ДНК и может реплицироваться независимо. Чаще всего они встречаются в виде небольших круглых двухцепочечных молекул ДНК у бактерий; однако плазмиды иногда присутствуют у архей и эукариотических организмов.</p>
72	<p>Экзон-интронная структура гена. Мобильные генетические элементы.</p> <p>Ответ: Характерная черта генов эукариотов — мозаичное экзон-интронное строение. Интроны, не несущие генетической информации, вырезаются (сплайсинг). Число и размер интронов у разных видов варьируется. Присутствие их в гене приводит к значительному увеличению размеров гена. Интроны стабилизируют экзоны, однако существует представление, что интрон — это так называемая «эгоистическая» ДНК, не дающая организму никаких эволюционных преимуществ. Экзоны контролируют синтез белков: 1 экзон — 1 домен. Мобильные (мигрирующие) генетические элементы (прыгающие гены) — участки ДНК, способные к транспозиции (случайному переносу) внутри одной клетки как внутри одного генома, так и между геномами (плазмидным и хромосомным, плазмидным и фаговым), не способны к самостоятельной репликации, размножаются в составе бактериальной хромосомы или плазмид. Транспозиция обеспечивается ферментом рекомбинации транспозазой. Преимущество мобильной организации генов заключается в возможности быстрой адаптации бактерий к условиям окружающей среды. Такой механизм изменчивости объясняет формирование новых типов возбудителей инфекционных заболеваний. Ген, детерминирующий синтез фактора патогенности, при попадании в другую бактерию может по-иному взаимодействовать с уже имеющимися факторами патогенности, обуславливая различную степень вирулентности и изменение картины инфекционного процесса. Транспозоны (Тп-элементы) — более сложно организованные транспозирующиеся и</p>

	<p>самоинтегрирующиеся фрагменты ДНК длиной 2 до 25 тысяч пар нуклеотидов. Способны менять место своей локализации в молекуле ДНК, а также мигрировать из одной молекулы ДНК в другую. Транспозоны распространяются среди различных видов бактерий, встраиваясь и перемещаясь среди хромосом, плазмид, умеренных фагов. Транспозоны имеют особые концевые структуры нескольких типов, позволяющие отличать их от других фрагментов ДНК. Это позволило обнаружить транспозоны не только у бактерий и дрожжей, но и в клетках растений, насекомых, позвоночных животных и человека. При интеграции транспозонов в хромосому клеток животных или человека они приобретают сходство с провирусами. Состояние транспозонов в бактериальной клетке: интегрированное в репликон (реплицируется вместе с ним); при включении в бактериальную ДНК транспозоны вызывают в ней дупликацию, а при перемещении — делеции и инверсии, свободное автономное (замыкается в кольцо и не реплицируется).</p>
73	<p>Бинарное деление. Результаты бинарного деления. Ответ: Бинарное деление можно охарактеризовать как своего рода половое размножение, при котором живущий ячейка, или органелла увеличивается в два раза, а затем разделяется на две идентичные клетки, а это означает, что можно ожидать, что каждая из дочерних клеток вырастет до того же размера, что и органелла или клетка. Бинарное деление отличается от других форм деления тем, что из одного объекта создаются только два компонента. Этот вид размножения известен как бесполое, поскольку этот процесс не связан с созданием или слиянием гамет. Поскольку бинарное деление является одним из типов бесполого размножения, образующиеся дочерние клетки имеют генетическое содержание, сходное с родительской клеткой. Бинарное деление - это метод размножения, обнаруженный у многих прокариот, таких как археи, семейство цианобактерий, эубактерий, а также у некоторых эукариот, таких как амёбы и парамеции. Некоторые клеточные органеллы, такие как митохондрии также подвержены клеточному делению в процессе бинарного деления. Чтобы функционировать и конкурировать, бактерия должна делиться в нужное время и в нужном месте и снабжать каждое потомство полной копией своего жизненно важного генетического материала. Хотя концепция бинарного деления имеет много общего с митозом, между ними есть несколько существенных различий. В то время как бинарное деление — это метод размножения, используемый бактериями и археями, митоз — это процесс, который происходит в эукариотической клетке. Кроме того, оба происходят по разным причинам внутри клеток. Оба процесса характеризуются серией стадий, которые включают деление ДНК, а затем расщепление клеток на две дочерние клетки. Некоторые эукариоты, такие как парамеции или амёбы, могут использовать бинарное деление как способ размножения. Бинарное деление можно разделить на четыре класса на основе плана деления в цитоплазме. Нерегулярное бинарное деление. В этом случае деление клеток (цитокinesis) возможно в любом направлении, но обычно оно перпендикулярно плоскости деления хромосом (кариокinesis). Это обычное явление для живых организмов, таких как амёбы. Поперечное бинарное деление. Поперечное бинарное деление — это цитокinesis, происходящий на поперечной оси клетки. Этот тип деления можно наблюдать у простейших с ресничками, таких как <i>Paramecium</i>. Продольное бинарное деление. Деление цитоплазмы происходит в продольном направлении, проходящем через клетки. Этот тип деления происходит у жгутиконосцев, таких как Эвглена. Наклонное бинарное деление. Деление клеток в этом случае происходит косым путем (т.е. влево и вправо, влево и вправо). Этот тип деления можно найти у представителей <i>Ceratium</i>.</p>
74	<p>Вертикальный и горизонтальный перенос генов. Ответ: Вертикальный перенос генов — это передача генов от материнского организма дочернему при размножении; горизонтальный, в противоположность ему, связан с передачей ДНК между неродственными организмами. В частности, это происходит при участии вирусов, встраивающихся в геном, или путём трансформации — захвата фрагментов ДНК из внешней среды (это весьма характерно для бактерий). Горизонтальный перенос генов — процесс, в котором организм передаёт генетический материал другому организму, не являющемуся его потомком. В отличие от горизонтального, о вертикальном переносе генов говорят, если организм получает генетический материал от своего предка. В области интересов генетики основное место занимает вертикальный перенос генов. Однако в настоящее время горизонтальному переносу уделяется всё больше внимания. Искусственный</p>

	<p>горизонтальный перенос генов используется в генной инженерии. Горизонтальный перенос генов можно выявить по ряду показателей. Во-первых, по нуклеотидному составу ДНК. Отличие в нуклеотидном составе отдельного сегмента от остальной части генома является указанием на присутствие "чужих" генов. Во-вторых, по частоте встречаемости в гене определенных кодонов. Третий важный критерий – существенное отличие в положении анализируемого гена на филогенетическом (эволюционном) дереве от большинства других генов. О "чужеродном" происхождении гена может говорить высокая степень его сходства с гомологичным (т.е. соответствующим) геном из отдаленного таксона при отсутствии подобного гена у близких "родственников".</p>
75	<p>Типы горизонтального переноса генов у прокариот. Ответ: К общим закономерностям горизонтального переноса генов у прокариот относят: а) Доля латерально полученных генов варьирует у разных видов и может достигать 10-15%. По последним данным, может быть и больше. б) Наибольшее количество переносов характерно для свободноживущих бактерий с широкими экологическими ареалами. в) Наименьшее число переносов обнаружено у патогенных бактерий, живущих в узких эконисах. г) Реже всего в горизонтальные переносы вовлечены гены информационных систем (транскрипции, трансляции, репликации), составляющие базовый геном. Продукты этих генов входят в сложные белковые комплексы, где "чужие" белки не встраиваются или не функционируют. д) Чаще всего в горизонтальном переносе участвуют гены, связанные с метаболизмом, транспортными путями и передачей сигналов. е) В составе приобретенных сегментов ДНК часто обнаруживаются профаги, плазмиды, гены белков, участвующих в процессах рекомбинации. ж) Горизонтальная передача генов реализуется через различные каналы генетической коммуникации.</p>
76	<p>Рекомбинантная ДНК. Молекулярное клонирование. Ответ: Технология рекомбинантных ДНК (также молекулярное клонирование, или генная инженерия) - это совокупность экспериментальных процедур, позволяющих осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой. В настоящее время можно вырезать отдельные участки ДНК, получать нуклеотиды на ДНК-синтезаторах (приборах для автоматического химического синтеза ДНК) практически в неограниченном количестве, определять последовательность нуклеотидов (разделяя, секвенируя их) сотнями в сутки, изменять выделенный ген, вводить его вновь в геном культивируемых клеток или эмбриона животного, где этот измененный ген начинает функционировать. Эксперименты с рекомбинантными ДНК используют крупномасштабно в промышленном производстве БАВ. Эксперименты по клонированию включают следующие этапы: 1. Рестриктазное расщепление из организма-донора нужных генов нативной ДНК (клонированная ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК). 2. Быстрая расшифровка всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, позволяющая определить точные границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую геном. 3. Обработка рестриктазными эндонуклеазами вектора для клонирования, который может реплицироваться в клетке-хозяине. 4. Сшивание ДНК-лигазой двух фрагментов ДНК с образованием новой рекомбинантной молекулы - конструкция «клонированный вектор - встроенная ДНК». 5. Введение этой конструкции в клетку хозяина (реципиента), где она реплицируется и передается потомкам. Этот процесс называется трансформацией. После трансформации бактериальная клетка воспроизводит фрагмент клонируемой ДНК миллионами идентичных клеток. 6. Идентификация и отбор клеток, несущих рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки). 7. Получение специфического белкового продукта, синтезированного клетками-хозяевами Бактериальные плазмиды обладают свойствами, позволяющими использовать их в качестве вектора для переноса клонируемой ДНК. Все системы клонирования должны отвечать двум основным требованиям: Во-первых, наличие нескольких сайтов для клонирования; Во-вторых, возможностью достаточно простой идентификации клеток с рекомбинантными ДНК. Молекулярное клонирование - это набор экспериментальных методов в молекулярной биологии, которые используются для сборки рекомбинантных молекул ДНК и направления их репликации внутри организмов-хозяев. Молекулярное клонирование обычно использует последовательности ДНК от двух разных организмов: виды, которые являются источником ДНК для клонирования, и виды, которые будут служить в качестве живого хозяина для репликации рекомбинантной ДНК. Методы молекулярного клонирования занимают центральное место во многих современных областях современной биологии и медицины.</p>

77	<p>«Рабочие лошадки» геной инженерии.</p> <p>Ответ: Живые организмы могут служить источниками полезных ферментов для биоинженерии — например, в ПЦР используют полимеразу, кодируемую геном термофильной бактерии <i>Thermus aquaticus</i>.</p> <p>Кишечная палочка (<i>E. coli</i>) — граммотрицательная палочковидная γ-протеобактерия, исторически первый объект для тестирования почти всех типов векторов, большая часть которых была получена на основе плазмид и фагов этих же бактерий. Для удобства и соблюдения техники безопасности работы с рекомбинантными ДНК созданы разнообразные мутанты кишечной палочки, например, кишечная палочка с измененной мишенью какого-то антибиотика (мутанты <i>yrpA96</i>, <i>gplL</i>), что полезно, например, для отбора этих штаммов среди всякой «грязи» на чашках Петри; кишечная палочка с устойчивостью к бактериофагам и др.</p> <p>Особенность пекарские дрожжей (<i>S. cerevisiae</i>) заключается в способности к гомологичной рекомбинации. Благодаря ей гены сахаромицетов можно легко заменять чужими и изучать их функции, если эти гены вводить в клетку в тесном соседстве с участком ДНК, идентичным какому-то участку дрожжевой хромосомы.</p> <p>Известны сотни клеточных линий насекомых, полученных из разных бабочек, дрозофилы и других организмов. Для них разработаны бакуловирусные системы доставки генов, позволяющие производить более 500 белков млекопитающих и вирусов, 95% из которых имеют правильные посттрансляционные модификации. Паттерн гликозилирования у этой биосистемы слегка, но всё же отличается от человеческого, и если это считается недостатком при производстве терапевтических препаратов для людей, то при наработке вакцинных антигенов даже предпочтительно.</p> <p>Культуры клеток млекопитающих. Они лишены несовершенств, связанных с посттрансляционной модификацией, но культивировать их сложнее и дороже, чем клетки насекомых и тем более микроорганизмов: контактное торможение роста, горы пластика, дорогие компоненты среды и оборудование. Однако контактное торможение мешает не всем культурам. Клеточные линии, полученные из опухолей, типа знаменитой HeLa, с ним не знакомы — они бессмертны. Растения как биофабрики довольно дешевы, при этом получаемые с их помощью продукты не содержат токсинов и пирогенов. Самое неприятное при работе с ними — толстые клеточные стенки, требующие для введения ДНК всяческих изощрений.</p> <p>Человек и другие животные. Рекомбинантные ДНК в организме человека призваны выполнять терапевтические, диагностические или профилактические функции, а вот в прочих организмах спектр их задач очень широк — от исследований и защиты до лечения и производства ценных веществ или даже органов.</p>
78	<p>Векторы для генетического клонирования – особенности их молекулярной организации.</p> <p>Ответ: Вектором в генетической инженерии называют молекулу ДНК, способную самостоятельно реплицироваться, включать в свой состав чужеродную ДНК, переносить ее в реципиентные клетки и стабильно там поддерживать. Векторы используют для создания <i>in vitro</i> рекомбинантных молекул ДНК, чтобы впоследствии ввести их в клетки, для последующего клонирования там, то есть умножения их количества. Репликация векторов зависит от клеточных белков, поэтому для каждого вида реципиентных клеток необходимо конструировать свои векторы. Обычно в качестве векторных молекул используют ДНК плазмиды и вирусы, в том числе фаги, предварительно их модифицируя. По области использования различают: 1) векторы общего назначения – для клонирования геномных генов, кДНК и любых фрагментов ДНК; 2) векторы для экспрессии клонированных генов – для синтеза мРНК и белков; 3) специализированные векторы – для секвенирования генов и мутационного анализа, для изучения особенностей регуляции клонированных генов, для идентификации в клонируемой ДНК промоторов и других регуляторных сайтов. По происхождению векторы делят на: 1) плазмидные, которые существуют в клетке и вне ее только в виде молекул ДНК; 2) фаговые, которые существуют в виде молекул ДНК и вирионов; 3) гибридные, которые сочетают отдельные свойства плазмид и фагов. К гибридным векторам, в свою очередь, относят: а) фагмиды, представляющие собой плазмидные векторы, содержащие <i>ori</i>-сайт нитевидных фагов; б) космиды, представляющие собой автономные <i>cos</i> сайты, по которым происходит упаковка фага λ; в) фазмиды, представляющие собой вектора, в которых сочетаются положительные свойства фаговых и плазмидных векторов. По структуре ДНК различают кольцевые и линейные векторы. По способу поддержания в клетке выделяют: 1) автономные векторы, которые реплицируются самостоятельно; 2)</p>

	<p>интегративные векторы, которые реплицируются в составе клеточной хромосомы. По числу молекул в клетке векторы могут быть малокопийными и мультикопийными. По числу репликаторов, имеющих в векторном геноме, векторы делят на моно и бирепликоновые. Бирепликоновые векторы также называют челночными, если они могут реплицироваться в клетках различных видов.</p>
79	<p>Инструменты для молекулярного клонирования. Ответ: Делятся на несколько функциональных групп: полимеразы, нуклеазы, лигазы и др. Нуклеазы (молекулярные ножницы) расщепляют, или деградируют, ДНК/РНК. Ферменты, вырезающие нуклеотиды с концов, называют экзонуклеазами, а нуклеазы, которые отщепляют нуклеотиды во внутренние части молекулы, — эндонуклеазами. В природе нуклеазы защищают бактерии от вторжения паразитических ДНК, расщепляя молекулы с нетипичным для этих бактерий паттерном метилирования. Полимеразы встраивают нуклеотиды в цепочку по правилу комплементарности напротив нуклеотидов матрицы (шаблона). РНК-полимеразы строят цепи из рибонуклеотидов (НТР) по матрице ДНК или РНК, то есть бывают ДНК- или РНК-зависимыми. Точно такими же бывают и ДНК-полимеразы, но цепи они строят из дезоксирибонуклеотидов (dНТР) и их в генной инженерии используют чаще. РНК-зависимые ДНК-полимеразы называют ревертазами или обратными транскриптазами, потому что действуют они противно логике реализации наследственной информации в клетке. Лигаза (молекулярные иголки) «сшивают» концы ДНК, то есть образуют фосфодиэфирную связь между сблизившимися нуклеотидами (две связи на две цепи ДНК). Именно они объединяют вектор со вставкой и фрагменты ДНК друг с другом, а также замыкают разрезанный вектор в кольцо. Обычно используют ДНК-лигазу фага Т4. Она охотно соединяет «липкие» концы, а вот для лигирования тупых нужно добавлять ее гораздо больше и проводить реакцию дольше. Чтобы повысить активность Т4-лигазы в отношении тупых концов, необходимо конструировать химерные ферменты, сочетающие лигазу с другими ДНК-связывающими белками.</p>
80	<p>Редактирование генома путем восстановления двухцепочечных разрывов. Ответ: Редактирование генома – это намеренное внесение конкретных изменений в последовательность ДНК живых клеток или организма. В более широком смысле под этим термином понимают любые направленные манипуляции с геномами живых объектов. CRISPR (от англ. «Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats») – это локусы повторяющихся коротких повторов (18-50 н.п.), разделённых уникальными спейсерными последовательностями (17-84 н.п.), встречающиеся в геномах бактерий и архей. В непосредственной близости от локусов CRISPR располагаются гены так называемых Cas-белков и последовательность, кодирующая tracrPHK. Установлено, что основная функция CRISPR/Cas систем в организмах прокариот – адаптивный иммунный ответ на вторжение ДНК плазмид и бактериофагов. Последовательность уникальных спейсеров в локусах CRISPR) совпадают с фрагментами чужеродной ДНК, с которой клетка (или её предшественники) когда-либо сталкивалась. Иммунный ответ запускается в тот момент, когда в бактерию или архею проникает ДНК фага или плазмиды. В случае CRISPR/Cas9 системы происходят следующие события: Транскрипция локуса CRISPR с образованием pre-crPHK (pre-CRISPR PHK). Транскрипция гена Cas9 и синтез соответствующего белка. Транскрипция участка, кодирующего tracrPHK. tracrPHK взаимодействует с повторами в pre-crPHK за счёт частичной комплементарности. Белки Cas9 стабилизируют образовавшиеся двухцепочечные РНК-структуры, а РНКаза III их расщепляет. При этом pre-crPHK превращается несколько crPHK, которые гибридизованы с tracrPHK. И на своем 5'-конце crPHK несут последовательности спейсеров длиной 20 н.п. из CRISPR-локуса. Гибриды tracrPHK/crPHK направляют белки Cas9 к чужеродной ДНК. Нуклеаза Cas9 связывается с так называемым PAM-мотивом (от англ. «protospacer adjacent motif»), являющимся для нее сайтом узнавания в дцДНК. После связывания Cas9 расплетает цепи ДНК в направлении 3'-5' от PAM-мотива. И если оказывается, что минус цепь комплементарна спейсерной последовательности на 5'-конце crPHK, то нуклеаза вносит в ДНК двухцепочечный разрыв на расстоянии 3 н.п. от мотива PAM. Если же клетка никогда не сталкивалась с данным бактериофагом или плазмидой, то подобного расщепления не происходит. Но при этом другие белки Cas встраивают фрагменты чужеродной ДНК в локусы CRISPR2. И при повторной встрече с патогеном, активируется иммунный ответ. Что же происходит после того, как нуклеаза Cas9 вносит двухцепочечный разрыв в</p>

	<p>геном живой клетки? Основным механизмом репарации такого разрыва - негомологичное соединение концов (NHEJ). Он очень неточен и в подавляющем числе случаев сопровождается образованием инсерций и/или делеций в месте стыковки. Репарация NHEJ внутри экзона может привести к сдвигу рамки считывания, образованию преждевременного стоп-кодона и, в конечном итоге, к нокауту гена. Если же у клетки есть образец для восстановления последовательности (например, сестринская хроматида в поздней S- и G2-фазах клеточного цикла), то репарация пойдет также по пути гомологичной рекомбинации (HDR). Кроме того, можно предоставить клетке и свой образец ДНК (донорную ДНК). Его концы должны быть гомологичны свободным концам ДНК, образовавшимся в результате разрыва. Таким образом можно заменить отдельные нуклеотиды в целевой последовательности или внести необходимую инсерцию.</p>
81	<p>Задачи геномного редактирования.</p> <p>Ответ: К важнейшим задачам современной биотехнологии и биомедицины, нуждающихся в развитии технологий редактирования геномов, относятся:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) создание растений и животных, обладающих новыми, ценными свойствами и признаками (урожайность, устойчивость к неблагоприятным условиям среды, вредителям и патогенам); 2) получение мутантных модельных животных для исследования заболеваний человека; 3) разработка методов генотерапии, исправления генетических мутаций в культивируемых стволовых клетках человека; 4) создание клеточных моделей для поиска и доклинического исследования новых лекарств.
82	<p>Задачи геномного редактирования.</p> <p>Ответ: К задачам современной биотехнологии и биомедицины, нуждающихся в развитии технологий редактирования геномов, относятся: создание растений и животных, обладающих новыми, ценными свойствами и признаками (урожайность, устойчивость к неблагоприятным условиям среды, вредителям и патогенам); получение мутантных модельных животных для исследования заболеваний человека; разработка методов генотерапии, исправления генетических мутаций в культивируемых стволовых клетках человека; создание клеточных моделей для поиска и доклинического исследования новых лекарств.</p>
83	<p>Биотехнология и этапы её развития. Область применения.</p> <p>Ответ: Человек использовал биотехнологию на протяжении многих тысяч лет: люди занимались пивоварением, пекли хлеб и т.д. Биотехнология как самостоятельная прикладная наука сформировалась в середине 50-х годов XX века. Возникновение, становление и развитие биотехнологии условно можно подразделить на четыре периода: эмпирический, этиологический, биотехнический и генотехнический. Эмпирический (доисторический) - самый длительный период, охватывающий примерно 8000 лет (более 6000 лет до н.э., около 2000 н.э.). Древние народы использовали приемы и способы изготовления хлеба, пива и некоторых других продуктов. В течение нескольких тысячелетий известен уксус, издревле приготавливавшийся в домашних условиях; первая дистилляция вина осуществлена в XII в., водку из хлебных злаков получили в XVI в., шампанское известно с XVII в. + получение кисло-молочных продуктов, квашеной капусты, медовых алкогольных напитков. Таким образом, народы пользовались на практике микробиологическими процессами, ничего не зная о микробах. Этиологический период (2-ая п. XIX в. и 1-ая треть XX в.: 1856 - 1933 г.г.). Он связан с исследованиями французского ученого Луи Пастера. Пастер вскрыл микробную природу брожения, доказал возможность жизни в бескислородных условиях, экспериментально опроверг представление о самопроизвольном зарождении живых существ, создал научные основы вакцинопрофилактики, предложил метод стерилизации, называемый по его имени пастеризацией и т.д. 1859 г – первая жидкая питательная среда 1892 г – обнаружение вируса мозаичной болезни табака (Д.И.Ивановский). Биотехнический (начался в 1933 году, тогда была опубликована работа Ключивера и Перкина "Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов", в которой изложены основные технические приемы, а также подходы к оценке получаемых результатов при глубинном культивировании грибов). После этого началось внедрение в биотехнологию крупномасштабного герметизированного оборудования, обеспечивающего проведение процессов в стерильных условиях. Особенно мощный толчок в развитии промышленного биотехнологического оборудования был отмечен в период становления и развития производства антибиотиков (1939 - 1945).</p>

	<p>Работами многих ученых была показана возможность механизации процессов брожения, культивирования различных клеток и различных клеточных продуктов для нужд человека и, прежде всего, в качестве или в составе лечебных и профилактических средств: антибиотики (пенициллин, стрептомицин, тетрациклин), декстран, ряд аминокислот и другие. Генотехнический (начался с 1972 года). В этом году П. Берг со своими сотрудниками (США) создали первую рекомбинантную молекулу ДНК. Однако, без фундаментальных работ Ф. Крика и Дж. Уотсона (1953) по установлению структуры ДНК было невозможно достичь современных результатов в области биотехнологии. Выяснение механизмов функционирования и регуляции ДНК, выделение и изучение специфических ферментов привело к формированию строго научного подхода к разработке биотехнологических процессов на основе генно-инженерных работ. В этом суть генотехнического периода. В течение последних 10 - 15 лет происходит бурное развитие биотехнологии, определились сферы приоритетного внедрения конкретных результатов биотехнологических разработок и, как следствие, были выделены основные направления и разделы биотехнологии. К ним относятся: медицинская биотехнология, иммунобиотехнология, биогеотехнология, инженерная энзимология, биоэнерготехнология, космическая биотехнология и др.</p>
84	<p>Объекты биотехнологии. Ответ: Объектами биотехнологии являются вирусы, бактерии, грибы, клетки растений, животных и человека, биогенные вещества. Диапазоны распространяются от вирусов до человека. Для реализации биотехнологических процессов важными параметрами биообъектов являются: чистка, скорость размножения клеток и репродукции вирусных частиц, активность и стабильность биомолекул. Следует учитывать, что при создании благоприятных условий для избранного биообъекта биотехнологии эти же условия могут оказаться благоприятными и для микробов-контаминантов или загрязнений. Представителями контаминирующей микрофлоры оказываются вирусы, бактерии, грибы, которые находятся в культурах растительных и животных клеток. Здесь микробы-контаминанты выступают вредителями производств в биотехнологии. Так при использовании ферментов в качестве биокатализаторов возникает необходимость предохранения их в изолированном состоянии от сапрофитной микрофлоры, которая может проникнуть в сферу биотехнологического процесса извне, следствие негерметичности. Независимо от систематического положения биообъекта, на практике используют либо природные организованные частицы (фаги, вирусы) и клетки с естественной генетической информацией, либо клетки с искусственно заданной генетической информацией.</p>
85	<p>Современная биотехнология, её области и успехи. Ответ: Биотехнология - это технологические процессы, реализуемые с использованием биологических систем - живых организмов и компонентов живой клетки. Биотехнологии основаны на достижениях отраслей современной науки: биохимии и биофизики, вирусологии, физикохимии ферментов, микробиологии, молекулярной биологии, генетической инженерии, селекционной генетики, химии антибиотиков, иммунологии и др. Современные биотехнологии основаны на культивировании микроорганизмов (бактерий и микроскопических грибов), животных и растительных клеток, методах генной инженерии. Основными направлениями развития современных биотехнологий являются медицинские биотехнологии, агробиотехнологии и экологические биотехнологии. Новейшим и важнейшим ответвлением биотехнологии является генная инженерия. Биотехнологии широко используются в фармакологии. В древности для лечения больных применяли животные, растительные и минеральные вещества. Начиная с XIX в. в фармакологии получают распространение синтетические химические препараты, а с середины XX в. и антибиотики — особые химические вещества, которые образуются микроорганизмами и способны оказывать избирательно токсическое воздействие на другие микроорганизмы. В конце XX в. фармакологи обратились к индивидуальным биологически активным соединениям и стали составлять их оптимальные композиции, а также использовать специфические активаторы и ингибиторы определенных ферментов, суть действия которых — в вытеснении патогенной микрофлоры неврежденной для здоровья людей микрофлорой (использование микробного антагонизма). Биотехнологии помогают в борьбе с сердечно-сосудистыми заболеваниями (прежде всего атеросклерозом), с онкологическими заболеваниями, с аллергиями (способность организма защищать свою целостность и биологическую индивидуальность), старением и вирусными инфекциями (в том числе со СПИДом). Человек пока не умеет лечить СПИД и плохо лечит вирусные инфекции.</p>

	<p>Химиотерапия и антибиотики, эффективные в борьбе с бактериальной инфекцией, неэффективны в отношении вирусов (например, возбудителей атипичной пневмонии). Предполагается, что здесь прогресс будет, достигнут благодаря развитию иммунологии, молекулярной биологии вирусов, в частности изучению взаимодействия вирусов со специфическими для них клеточными рецепторами. Биотехнологически производят витамины, диагностические средства для клинических исследований (тест-системы на наркотики, лекарства, гормоны и т.п.), биоразлагаемые пластмассы, антибиотики, биосовместимые материалы.</p>
86	<p>Технологии целевого редактирования генома.</p> <p>Ответ: Простейшими инструментами были ферменты рестрикции, которые способны разрезать ДНК, в области строго специфичных последовательностей. Подобное ограничение сделало невозможным широкое распространение данного подхода в геномном редактировании, однако рестриктазы продолжают активно использоваться в геномной инженерии в качестве инструмента молекулярного клонирования, а также для картирования ДНК. Для формирования направленного редактирования были получены химерные конструкции «Цинковые пальцы» и TALEN (от англ. Transcription activator-like effector nucleases). С помощью данных систем уже были получены результаты в работах по направленному изменению структуры генома. Однако процесс создания таких конструкций с белковыми доменами связывания является трудоемким и делает весь процесс подготовки к редактированию. Поэтому появление системы CRISPR/Cas9 способствовало резкому всплеску интереса среди исследователей к данной тематике. Наиболее эффективным и простым методом геномного редактирования является использование системы CRISPR/Cas9, которая состоит из двух компонентов направляющей РНК и белка нуклеазы. Направляющая РНК имеет область узнавания длиной 18-20 п.о., которая связывается с комплементарной последовательностью ДНК, называемой «протоспейсером». Как оказалось, направляющая РНК способна взаимодействовать с ДНК только в тех случаях, когда там присутствует специальная последовательность – PAM (protospacer adjacent motif). PAM представляет собой короткую последовательность (длиной обычно 2–6 пар оснований), которая следует за участком ДНК, предназначенным для расщепления системой CRISPR.</p>
87	<p>Нуклеазы с цинковыми пальцами (<i>zinc fingers</i>). Нуклеазы TALEN.</p> <p>Ответ: Простейшими инструментами были ферменты рестрикции, которые способны разрезать ДНК, в области строго специфичных последовательностей. Подобное ограничение сделало невозможным широкое распространение данного подхода в геномном редактировании, однако рестриктазы продолжают активно использоваться в геномной инженерии в качестве инструмента молекулярного клонирования, а также для картирования ДНК. Для формирования направленного редактирования были получены химерные конструкции «Цинковые пальцы» и TALEN (от англ. Transcription activator-like effector nucleases). С помощью данных систем уже были получены результаты в работах по направленному изменению структуры генома. Однако процесс создания таких конструкций с белковыми доменами связывания является трудоемким и делает весь процесс подготовки к редактированию.</p>
88	<p>Система CRISPR-Cas9</p> <p>Ответ: Наиболее эффективным и простым методом геномного редактирования является использование системы CRISPR/Cas9, которая состоит из двух компонентов направляющей РНК и белка нуклеазы. CRISPR-Cas9 – это система, используемая бактериями для защиты от нападения вирусов, но недавно её удалось приспособить для редактирования генома в определённых позициях. Система состоит из двух компонентов: CRISPR и Cas9. CRISPR – аббревиатура, обозначающая «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами» – это набор позиций в геноме, где находятся повторяющиеся участки ДНК. Рядом с этими повторами расположены гены Cas, кодирующие важные ферменты, один из которых – Cas9 – способен разрезать нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК). Направляющая РНК имеет область узнавания длиной 18-20 п.о., которая связывается с комплементарной последовательностью ДНК, называемой «протоспейсером». Направляющая РНК способна взаимодействовать с ДНК только в тех случаях, когда там присутствует специальная последовательность – PAM (protospacer adjacent motif). PAM представляет собой короткую последовательность (длиной обычно 2–6 пар оснований), которая следует за участком ДНК, предназначенным для расщепления системой CRISPR. Канонический PAM представляет собой последовательность 5'-NGG-3', где «N» представляет собой любое азотистое основание, за которым следуют два основания гуанина («G»). Существует несколько подходов для</p>

	<p>проведения экспериментов с использованием системы CRISPR/Cas9 – это трансфекция плазмидного вектора, конститутивно экспрессирующего sgРНК и белок Cas9, доставка компонентов геномного редактирования в составе вирусного вектора и трансфекция рибонуклеопротеидного комплекса (РНП). В случае использовании вектора, который непрерывно нарабатывает большое количество нуклеазы, в модифицированной клетке значительно повышается риск появления неспецифических мутаций, поэтому в настоящий момент наиболее целесообразным методом является доставка систем редактирования именно в виде РНП, где количество нуклеазы строго лимитировано.</p>
89	<p>ГМО. Цель получения и методы получения ГМО. Ответ: Под термином ГМО определяются организмы, генетический материал которых (ДНК) изменён способом, недостижимым естественным путём в ходе внутривидовых скрещиваний. Для получения ГМО используется технология рекомбинантных молекул. Генная инженерия позволяет переносить отдельные гены из любого живого организма в любой другой живой организм в составе кольцевых молекул ДНК (плазмид). Встраивание в геном организма — хозяина новых конструкций имеет целью получить новый признак, недостижимый для данного организма путём селекции или требующий многолетней работы селекционеров. Применение биотехнологий позволяет значительно ускорить процесс получения нового сорта, существенно снизить его себестоимость и получить хорошо прогнозируемый эффект по признаку, определяемому встроенной конструкцией. Разработка ГМО некоторыми учеными рассматривается как естественное развитие работ по селекции животных и растений. Другие же, напротив, считают генную инженерию полным отходом от классической селекции, так как ГМО — это не продукт искусственного отбора, то есть постепенного выведения нового сорта (породы) организмов путем естественного размножения, а, фактически, искусственно синтезированный в лаборатории новый вид. Во многих случаях использование трансгенных растений сильно повышает урожайность. Есть мнение, что при нынешнем размере населения планеты только ГМО могут избавить мир от угрозы голода, так как при помощи генной модификации можно увеличивать урожайность и качество пищи. Противники этого мнения считают, что при современном уровне агротехники и механизации сельскохозяйственного производства уже существующие сейчас, полученные классическим путем, сорта растений и породы животных способны сполна обеспечить население планеты высококачественным продовольствием.</p>
90	<p>Современные представления о ГМО. Ответ: ГМО (генетически модифицированный организм) — организм, генотип которого был искусственно изменен при помощи методов генной инженерии. Это определение может применяться для растений, животных и микроорганизмов. Генетические изменения, как правило, производятся в научных или хозяйственных целях. Генетическая модификация отличается целенаправленным изменением генотипа организма в отличие от случайного, характерного для естественного и искусственного мутационного процесса. В 1987 году японские ученые обнаружили в геномах бактерий участки с регулярной структурой — короткие одинаковые последовательности чередовались с уникальными фрагментами, которые у разных бактерий даже одного вида не имели ничего общего. Такие участки назвали CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Оказалось, что система CRISPR, как это ни удивительно, играет у бактерий роль приобретенного иммунитета. Если в бактерию проникает вирус (фаг), она вырезает фрагмент вирусной ДНК и встраивает его в собственный геном, а именно — в CRISPR-локус. Так формируются спейсер, а заодно — и очередной повтор, отделяющий новый спейсер от предыдущего. По спейсеру бактерия затем строит РНК-зонд (по-научному — РНК-гид), соединяющийся с Cas-белком и плавающий в клетке в поисках комплементарных нуклеиновых кислот (протоспейсеров). В том случае, если таковые найдены, то есть снова вторгся тот же фаг, начинает работать белок-ножницы Cas — эндонуклеаза, которая разрезает распознанные последовательности, а следовательно, блокирует размножение вируса. Иными словами — если бактерия повторно встретится с вирусом, фрагмент которого встроен в ее геном, она будет устойчива к этой инфекции. Наиболее просто из систем CRISPR/Cas устроены системы II типа, где эффекторным (уничтожающим мишень) белком служит Cas9. Такой механизм характерен, например, для бактерии <i>Streptococcus pyogenes</i>. В бактериальном иммунном контроле обычно помимо Cas-эффекторов задействованы «патрульные» белки Cas1 и Cas2, которые в комплексе распознают нарушителя клеточных границ и интегрируют его фрагмент в самое начало (ближе к промотору)</p>

	CRISPR-локуса — «на память». В системах II типа Cas9, видимо, участвует и в процессе приобретения спейсеров, помогая Cas1/Cas2 выбрать наиболее подходящие фрагменты.
91	<p>Опыт исследования ГМО.</p> <p>Ответ: 1973 год можно считать годом рождения генной инженерии. Тогда в лаборатории С.Н. Коэна научились «комбинировать и трансплантировать» гены: в клетки <i>E. coli</i> начали вводить рекомбинантные кольцевые ДНК (плазмиды). Эти эксперименты показали, что определенные гены, включенные в плазмиду, можно запросто доставить в другой организм, где они будут работать. Но использовать эту технологию в медицине и сельском хозяйстве стали далеко не сразу: первый рекомбинантный препарат появился в 1982 году, а первая сельскохозяйственная культура — в 1992. В 1975 году в Калифорнии прошла Асиломарская конференция, на которой ученые совместно с представителями общественности обсуждали возможные риски, связанные с рекомбинантными ДНК и их хозяевами. В итоге был принят свод правил, регламентирующих работу с генетическими конструкциями разного происхождения. В частности, генным инженерам предписывалось по максимуму использовать биологические барьеры, предотвращающие распространение рекомбинантных ДНК за пределами популяций их лабораторных хозяев, а заодно и соблюдать меры предосторожности, утвержденные для работы с патогенами. Эти предписания и вообще вынос дискуссии за пределы научной среды в определенной мере создали преграды на пути развития генной инженерии. Все сорта растений и породы животных, используемые в сельском хозяйстве — продукт вмешательства человека в геном. Многие межвидовые гибриды используются человечеством столетиями (например, мулы). До XX века селекционерам приходилось ждать того момента, когда случайное изменение того или иного гена, либо случайное сочетание генов даст полезное в сельском хозяйстве свойство. В начале XX века появились методы, благодаря которым этот процесс стало возможно ускорить (искусственное получение большого количества случайных мутаций, например, с помощью облучения радиацией или действием химических мутагенов). Современные методы получения генетически модифицированных организмов отличаются лишь тем, что изменения генома целенаправлены. Соответственно, использование генетически модифицированных организмов не опаснее, чем использование немодифицированных сортов растений и пород животных.</p>
92	<p>Законодательная база по использованию ГМО в России. Этические проблемы применения ГМО.</p> <p>Ответ: Для производства генетически модифицированных организмов (ГМО) используются современные биотехнологические методы, которые обладают настолько мощным и не до конца изученным потенциалом, что их широкое - применение возможно только при строгом соблюдении этических норм. К сожалению, существуют определенные потенциальные риски неконтролируемого использования трансгенной продукции, такие как угроза переопыления и неконтролируемого распространения трансгенных сортов среди пищевых растений и заражения диких растений, риск неконтролируемого распространения вакцин в составе пищевых продуктов, распространение вакцин и биоактивных веществ, выделяющихся из гниющих растительных остатков, через почвенные и поверхностные воды. Массовое внедрение в медицинскую практику и коммерциализация принципиально новых технологий в области генной инженерии и клонирования привели к необходимости создания соответствующей правовой базы, регулирующей все юридические аспекты деятельности в этих направлениях. Необходимость в международном масштабе регулировать деятельность, связанную с современной биотехнологией и её потенциальным воздействием на окружающую среду и здоровье человека, государства-члены ООН признали на конференции в Рио-де-Жанейро (1992), когда была подписана Конвенция по биоразнообразию, основной целью которой является сохранение биологического разнообразия, устойчивое использование его составляющих и справедливый раздел прибыли, полученной в результате использования генетических ресурсов нашей планеты. Особо было отмечено, что биотехнология может содействовать достижению целей Конвенции в случае, если она будет развиваться и применяться при наличии соответствующих мер безопасности в интересах сохранения окружающей среды и здоровья человека. Стороны-участницы договорились о разработке международного соглашения о мерах и процедурах, необходимых для безопасного перемещения, переработки и применения продуктов современной биотехнологии. Этим соглашением стал Картахенский Протокол по биобезопасности (Колумбия, Картахена-де-Индиас, 1999),</p>

	<p>окончательный вариант которого был принят в 2000 г. в Монреале. В настоящее время действует Конвенция о защите прав и достоинства человека в связи с применением достижений биологии и медицины: Конвенция о правах человека и биомедицине (Овьедо, Испания, 1997). Конвенция намерена защищать достоинство и личности людей и гарантировать каждому, без какой-либо дискриминации, признание неприкосновенности и других прав и фундаментальных свобод в сферах биологии и медицины. В ней утверждается, что интересы и благосостояние человека будут превалировать над интересами общества или науки и будет обеспечено высокое качество заботы о здоровье всех людей. Основная этическая и правовая проблема - вопрос информированности и сознательного выбора потребителя услуг (в том числе и медицинских). В РФ нет специальных нормативных актов, регулирующих этот вопрос. Прописано только применение ГМО в пищевых продуктах в подзаконных актах ФЗ "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения" и "О защите прав потребителей". Самостоятельный ФЗ, регулирующий производство и использование ГМО, до сих пор не принят. Создание "комитетов (комиссий) по вопросам этики в области охраны здоровья граждан" в России определяется статьей 16 "Основ законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан", принятых в 1993 г.</p>
93	<p>Нормативная база, обеспечивающая беспрепятственный научный поиск и внедрение полученных результатов.</p> <p>Ответ: Основу нормативно-правой базы в научно-технической сфере составляют следующие нормативные правовые акты Российской Федерации и Министерства образования Российской Федерации: Конституция Российской Федерации от 25 декабря 1993 года. Гражданский кодекс Российской Федерации. Доктрина развития российской науки, утверждённая указом Президента РФ от 13 июня 1996 г. № 884. ФЗ «О науке и государственной научно-технической политике», от 23.08.1996 г., № 127-ФЗ. Основы политики РФ в области развития науки и технологий на период до 2010 года и дальнейшую перспективу, утверждённые Президентом Российской Федерации 30 марта 2002 г. (№ ПР-576). Типовое положение об образовательном учреждении высшего профессионального образования РФ (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 5 апреля 2001 г. № 264) с дополнением, внесённым постановлением Правительства Российской Федерации от 17.09.2001 г., № 76. Концепция научной, научно-технической и инновационной политики в системе образования Российской Федерации на 2001 - 2005 годы (Приказ Минобразования России от 6.06.2000 г., № 1705). «Об утверждении перечня показателей государственной аккредитации и критериальных значениях показателей, используемых при установлении вида высшего учебного заведения» (Приказ Минобразования России от 22.10.2001 г., № 3414). Положение об организации научных исследований, проводимых подведомственными учреждениями в рамках тематических планов по заданиям Министерства образования РФ и финансируемых из средств федерального бюджета (Приказ Министерства образования Российской Федерации от 17 июля 2000 г., № 2219). Приказ ГоскомВУЗа РФ от 22 июня 1994 г. № 614 «Об утверждении Положения о научной деятельности высших учебных заведений Государственного комитета РФ по высшему образованию». Закон Российской Федерации «Об образовании» от 13 января 1996 г. № 12-ФЗ.</p>
94	<p>Регулирование генной инженерии. Нормативная база в России.</p> <p>Ответ: Правовой базой данного направления экологического законодательства служит Федеральный закон «О правовом регулировании генно-инженерной деятельности» и постановление Правительства РФ «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов», а также акты, регулирующие создание и оборот биологических коллекций и т. д. Объекты правового регулирования: неживые продукты, полученные с помощью генно-инженерной деятельности; живые генно-инженерно-модифицированные организмы, выпускаемые в окружающую среду или используемые для пищевой, фармацевтической и иной промышленности; клонирование животных, в том числе для медицинских целей; порядок обращения с особыми категориями генно-инженерно-модифицированных организмов, которые могут использоваться для создания биологического оружия.</p> <p>Объектом правового регулирования являются деятельность по созданию, использованию и выпуску в окружающую среду генно-инженерно-модифицированных организмов, обеспечение экологической безопасности населения и территорий в ходе данной деятельности, соблюдение экологического правопорядка и правил безопасности при обращении с этими биологическими (бактериологическими) организмами. Для установления правил в области генно-инженерных работ,</p>

	<p>определения условий лицензирования такой деятельности, регистрационных систем, формирования особых требований к лицам, профессионально занятым в данной области, систем сертификации, оценки экологического риска, запретов и ограничений этой относящейся к потенциально опасной для человека и окружающей среды деятельности используется значительный набор инструментов и средств. Одним из основных инструментов правового регулирования наряду с запретами и регулированием мер безопасности является лицензирование, которое осуществляется с учетом степени потенциальной опасности осуществляемых видов генно-инженерной деятельности.</p> <p>Генно-инженерные работы ведутся в закрытых и открытых системах. В обоих случаях право жестко формулирует экологические требования к перечисленным процессам вплоть до установления уголовной ответственности за их нарушения (ст. 248 УК РФ). Административная ответственность за нарушение законодательства о генно-инженерной деятельности может наступить по ст. 8.2, содержащей общий состав несоблюдения экологических и санитарно-эпидемиологических требования при обращении с отходами производства и потребления или иными опасными веществами. Частично предмет правонарушения, если речь идет об использовании генно-инженерно-модифицированных продуктов при производстве продукции, перекрывается ст. 19.19, устанавливающей ответственность за нарушение требований госстандартов, правил обязательной сертификации.</p>
95	<p>Экологическая безопасность.</p> <p>Ответ: Экологическая безопасность – состояние защищенности окружающей среды и жизненно важных интересов человека и гражданина от возможного негативного воздействия хозяйственной и иной деятельности и угроз возникновения чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера, их последствий. Угрозы экологической безопасности – вероятность создания необходимых и достаточных условий возникновения явлений, процессов и эффектов, реализация которых может привести к негативным воздействиям на окружающую среду и здоровье населения; Угрозу экологической безопасности может представлять деятельность физических и юридических лиц, а также других государств, связанная с преднамеренным и непреднамеренным воздействием на окружающую среду, а также стихийные природные процессы и явления. Экологическая безопасность касается промышленности, сельского и коммунального хозяйства, сферы услуг, области международных отношений. Иными словами, экологическая безопасность прочно входит в нашу жизнь, и ее важность и актуальность возрастает год от года. Таким образом, экологическая безопасность – состояние защищенности личности, общества и Государства от последствий антропогенного воздействия на окружающую среду, а также стихийных бедствий и катастроф. Мониторинг экологической безопасности – специальная система оценки экологических рисков в реальном времени в природных, антропогенных, природно-антропогенных объектах, в которых находятся или могут находиться источники негативных воздействий на окружающую среду и здоровье населения; Обеспечение экологической безопасности государства – деятельность органов государственной власти, юридических и физических лиц национальных и международных общественных организаций, объединений, движений, политических партий и иных некоммерческих организаций, направленная на создание условий устойчивого экологически безопасного социально-экономического развития государства и предотвращение внешних и внутренних угроз его экологической безопасности; Основными объектами экологической безопасности являются: личность с ее правом на здоровую и благоприятную для жизни окружающую природную среду; общество с его материальными и духовными ценностями, зависящими от экологического состояния страны; природные ресурсы и природная среда как основа устойчивого развития общества и благополучия будущих поколений.</p>
96	<p>Основные молекулярно-генетические методы, применяемые для генетического редактирования.</p> <p>Ответ: Молекулярно-генетические методы изучения наследственности человека – это большая группа методов, позволяющих выявлять варианты структуры исследуемого участка ДНК. В основе методов лежат различные манипуляции с ДНК и РНК. Первым этапом любого молекулярно-генетического исследования является выделение нуклеиновых кислот из образца ткани. Для выделения ДНК пригодны любые ядродержащие клетки организма. Выделенная из клеток ДНК представляет собой весь геном организма (геномная ДНК). Молекулярное клонирование (генная инженерия, технология рекомбинантных ДНК) – это совокупность методов,</p>

	<p>позволяющих осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой. Метод ПЦР заключается в увеличении копияности молекул ДНК в геометрической прогрессии за счет оптимально подобранных праймеров и изменяющихся температурных циклов. Стадии ПЦР: денатурация, отжиг и элонгация. Молекулярное клонирование состоит из следующих этапов: Выделение ДНК из организма – донора; Расщепление ДНК ферментами рестриктазами с образованием фрагментов ДНК с «липкими концами»; Расщепление векторной молекулы (плазмида, фаг, космида и др.) той же рестриктазой, что и исследуемый образец ДНК; Лигирование (сшивание) векторной молекулы и фрагмента исследуемой ДНК с образованием гибридной (рекомбинантной) молекулы; Введение рекомбинантной молекулы в клетку-хозяина (реципиента). Этот процесс называется трансформацией. Отбор клеток, несущих рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки); Получение специфического белкового продукта, синтезируемого клетками-хозяевами. Для молекулярного клонирования необходимо: Ферменты рестриктазы, Клонировующий вектор, Встраиваемая ДНК (ген, фрагмент гена).</p> <p>Рестриктазы – ферменты, разрезающие ДНК в строго определенном месте (сайте). Рестриктазы выделяют из клеток бактерий разных видов. Каждая рестриктаза узнает только свой сайт рестрикции. В настоящее время выделено более 500 рестриктаз. Значительное число нуклеотидных замен приводит к появлению в последовательности ДНК новых сайтов для различных рестриктаз. В результате нормальный фрагмент ДНК и фрагмент с заменой нуклеотида будут разрезаться одной рестриктазой на разное число фрагментов, отличающихся по длине. Различной длины фрагменты легко выявляются при помощи электрофореза. Секвенирование – определение нуклеотидной последовательности ДНК. Метод применяется для изучения генома человека как в норме так и в патологии. При помощи секвенирования определяют аллельные варианты генов, а также различные типы генных мутаций (чаще по замене оснований). Программа «Геном человека», результатом которой явилась расшифровка нуклеотидной последовательности генома человека (основная часть программы закончена в 2003г.) была осуществлена с применением методов секвенирования ДНК. Существует несколько различных способов секвенирования ДНК. Первым был предложен химический метод Максама-Гилберта, затем ферментативный метод Сенгера. В настоящее время в основном применяется дидезоксинуклеотидный метод секвенирования ДНК (метод обрыва цепи).</p>
97	<p>Нуклеазы. Химерные нуклеазы.</p> <p>Нуклеазы — большая группа ферментов, гидролизующих фосфодиэфирную связь между субъединицами нуклеиновых кислот. Различают несколько типов нуклеаз в зависимости от их специфичности: экзонуклеазы и эндонуклеазы, рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы, рестриктазы и некоторые другие. Рестриктазы занимают важное положение в прикладной молекулярной биологии. Исследование нуклеаз началось в конце 1960-х годов, когда Стюарт Линн и Вернер Арбер выделили из кишечной палочки (<i>Escherichia coli</i>) фермент, ограничивающих рост бактериофага или другими словами рестриктазу. В 1968 году американскими учёными Хамилтоном Смитом, K.W.Wilcox и T.J.Kelley (Университет Джонса Хопкинса) из бактерии <i>Haemophilus influenzae</i> была впервые выделена специфическая рестриктаза HindII. Оказалось, что этот фермент специфически распознавал и гидролизировал фосфодиэфирную связь точно в центре следующей нуклеотидной последовательности: 5' G T (пиримидин: T or C) (пурин: A or G) A C 3' и 3' C A (пурин: A or G) (пиримидин: T or C) T G 5'. Химерные нуклеазы являются примером сконструированных белков, которые должны содержать ДНК-связывающий домен для придания специфичности последовательности и нуклеазный домен для расщепления ДНК.</p>
98	<p>Ферменты, используемые в генной инженерии: рестриктазы второго типа, ДНК-лигазы, ДНК-полимеразы.</p> <p>Ответ: Генетическая инженерия - потомок молекулярной генетики, но своим рождением обязана успехам генетической энзимологии и химии нуклеиновых кислот, так как инструментами молекулярного манипулирования являются ферменты. Следует отметить, что ферменты, применяемые в генной инженерии, лишены видовой специфичности, поэтому экспериментатор может сочетать в единое целое фрагменты ДНК любого происхождения в избранной им последовательности. Это позволяет генной инженерии преодолевать установленные природой видовые барьеры и осуществлять межвидовое скрещивание. Ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК, можно разделить на несколько групп:</p>

	<p>ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (рестриктазы); ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (обратные транскриптазы); ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (лигазы); ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК. Все рестриктазы узнают на двуспиральной ДНК строго определенные последовательности, но рестриктазы 1-го класса осуществляют разрывы в произвольных точках молекулы ДНК, а рестриктазы 2-го и 3-го классов узнают и расщепляют ДНК в строго определенных точках внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии. Ферменты второго класса состоят из 2 отдельных белков: рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы, поэтому в генной инженерии используются исключительно ферменты 2-го класса. Они нуждаются в ионах магния в качестве кофакторов. Большинство рестриктаз класса 2 узнают последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупнощеплящие. ДНК-лигазы — ферменты, катализирующие ковалентное сшивание цепей ДНК в дуплексе при репликации, репарации и рекомбинации. Они образуют фосфодиэфирные мостики между 5'-фосфорильной и 3'-гидроксильной группами соседних дезоксирибонуклеотидов в местах разрыва ДНК или между двумя молекулами ДНК. Для образования этих мостиков лигазы используют энергию гидролиза пироглутаматной связи АТФ. ДНК-полимераза — фермент, участвующий в репликации ДНК. Ферменты этого класса катализируют полимеризацию дезоксирибонуклеотидов вдоль цепочки нуклеотидов ДНК, которую фермент «читает» и использует в качестве шаблона. Тип нового нуклеотида определяется по принципу комплементарности с шаблоном, с которого ведётся считывание. Собираемая молекула комплементарна шаблонной моноспиральной и идентична второму компоненту двойной спирали.</p>
99	<p>Методы конструирования гибридных молекул ДНК <i>in vitro</i> – рестриктазно-лигазный. Ответ: Под рекомбинантными понимают ДНК, образованные объединением <i>in vitro</i> (в пробирке) двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников. Ключевыми в этом определении являются слова "фрагмент ДНК" и "объединение <i>in vitro</i>", что указывает на сущность генетической инженерии и ее отличие от всех остальных методов получения гибридных (или химерных) организмов, таких как генетическая селекция, эмбриональная инженерия и т.д. Фрагменты ДНК, в том числе и фрагменты, содержащие гены, получают с использованием ферментов рестриктаз. Рестриктазы могут образовывать фрагменты как с тупыми, так и с липкими концами. Сшивка фрагментов ДНК производится тремя основными методами, зависящими от того, какие концы имеют фрагменты сшиваемых ДНК. Сшивка по одноименным "липким" концам (рестриктазно лигазный метод). Этот метод является самым распространенным и популярным. Впервые этим способом гибридная ДНК была получена С. Коэном с сотрудниками в 1973 году. Некоторые рестриктазы, например, Pst I, внося в цепи ДНК симметричные, расположенные наискось друг от друга разрывы на равных расстояниях от центра сайта узнавания и образующие "ступеньку" (рис. 36). Эти комплементарные друг другу участки имеют тенденцию к ассоциации за счет спаривания оснований, и поэтому их называют комплементарными или липкими концами. Спаривание оснований происходит только между комплементарными последовательностями, поэтому ААТТ-концы, образуемые Eco RI, не будут спариваться, например, с АГЦТ-концами, образуемыми Hind III. Но любые два фрагмента (независимо от их происхождения), образовавшиеся под действием одной и той же рестриктазы, могут слипаться за счет образования водородных связей между однонитиевыми участками комплементарных нуклеотидов. Однако после такого спаривания полной целостности двойной спирали не восстановится, поскольку останется два разрыва в фосфодиэфирном остове. Для его восстановления, то есть сшивания, или лигирования нитей используют фермент ДНК-лигазу. Этот фермент в живой клетке выполняет ту же функцию - сшивание фрагментов ДНК, синтезирующихся при репликации.</p>
100	<p>Принцип работы системы CRISPR-Cas9. Ответ: Наиболее эффективным и простым методом геномного редактирования является использование системы CRISPR/Cas9, которая состоит из двух компонентов направляющей РНК и белка нуклеазы. CRISPR-Cas9 – это система, используемая бактериями для защиты от нападения вирусов, но недавно её удалось приспособить для редактирования генома в определённых позициях. Система состоит из двух компонентов: CRISPR и Cas9. CRISPR – аббревиатура, обозначающая «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами» – это набор позиций в</p>

	<p>геноме, где находятся повторяющиеся участки ДНК. Рядом с этими повторами расположены гены Cas, кодирующие важные ферменты, один из которых – Cas9 – способен разрезать нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК). Направляющая РНК имеет область узнавания длиной 18-20 п.о., которая связывается с комплементарной последовательностью ДНК, называемой «протоспейсером». Направляющая РНК способна взаимодействовать с ДНК только в тех случаях, когда там присутствует специальная последовательность – PAM (protospacer adjacent motif). PAM представляет собой короткую последовательность (длиной обычно 2–6 пар оснований), которая следует за участком ДНК, предназначенным для расщепления системой CRISPR. Канонический PAM представляет собой последовательность 5'-NGG-3', где «N» представляет собой любое азотистое основание, за которым следуют два основания гуанина («G»). Существует несколько подходов для проведения экспериментов с использованием системы CRISPR/Cas9 – это трансфекция плазмидного вектора, конститутивно экспрессирующего sgРНК и белок Cas9, доставка компонентов геномного редактирования в составе вирусного вектора и трансфекция рибонуклеопротеидного комплекса (РНП). В случае использовании вектора, который непрерывно нарабатывает большое количество нуклеазы, в модифицированной клетке значительно повышается риск появления неспецифических мутаций, поэтому в настоящий момент наиболее целесообразным методом является доставка систем редактирования именно в виде РНП, где количество нуклеазы строго лимитировано.</p>
101	<p>Технологически стратегия геномной инженерии с помощью системы CRISPR/Cas9. Ответ: С помощью системы CRISPR/Cas можно осуществлять все виды модификаций генома: вносить точечные мутации, встраивать в определенные места новые гены либо, наоборот, удалять крупные участки нуклеотидных последовательностей, исправлять или заменять отдельные генетические элементы и фрагменты генов. Технологически стратегия геномной инженерии с помощью системы CRISPR/Cas включает в себя следующие этапы: выбор целевой последовательности и определение вида необходимого воздействия; создание ген-направленной конструкции и доставка ее в клеточное ядро; анализ участка генома, подвергнутого воздействию. Система CRISPR может быть использована для получения как генетически модифицированных клеток, выращиваемых в культуре, так и живых организмов. В первом случае в клетки вводят плазмиды или вирусные векторы, которые обеспечивают высокий и устойчивый синтез элементов системы CRISPR/Cas. Во втором случае в одноклеточные эмбрионы животных путем микроинъекции вводят уже «готовые» crRNA и мРНК, с которой происходит синтез белка Cas9. Для получения генетически модифицированных растений, клетки которых имеют прочную оболочку, используют выращиваемые в культуре протопласты (растительные клетки без внешней оболочки) и плазмиды, кодирующие элементы CRISPR/Cas. Другой подход, применяемый для растений, – использование агробактерий, природных «генных инженеров», несущих специальную плазмиду.</p>
102	<p>Применение Zinc fingers, TALEN и CRISPR/Cas9 систем в России. Ответ: Простейшими инструментами были ферменты рестрикции, которые способны разрезать ДНК, в области строго специфичных последовательностей. Подобное ограничение сделало невозможным широкое распространение данного подхода в геномном редактировании, однако рестриктазы продолжают активно использоваться в геномной инженерии в качестве инструмента молекулярного клонирования, а также для картирования ДНК. Для формирования направленного редактирования были получены химерные конструкции «Цинковые пальцы» и TALEN (от англ. Transcription activator-like effector nucleases). С помощью данных систем уже были получены результаты в работах по направленному изменению структуры генома. Однако процесс создания таких конструкций с белковыми доменами связывания является трудоемким и делает весь процесс подготовки к редактированию. Активная работа над CRISPR-Cas9 в России ведется с 2018 года. Тогда премьер-министр Д. Медведев утвердил федеральную программу развития генетических технологий до 2027 года. В 2019-м появился Центр редактирования генома, но только для теоретического изучения вопроса — по мнению директора «Медико-генетического научного центра» Сергея Куцева, технология не самая перспективная, просто «выглядит красиво». С позиции реальной применимости Куцев более высоко оценил эктопическую экспрессию гена. В том же 2019 году Госдума начала исследовать правовое регулирование этой темы в разрезе репродуктивных технологий. В конце 2019-го российский ученый Д. Ребриков планировал отредактировать ДНК яйцеклетки для лечения наследственной глухоты. Имплантировать их матери он смог</p>

	бы только после разрешения Минздрава, но в ведомстве были против..
103	<p>Клонирующий вектор. Химерные плазмиды.</p> <p>Ответ: Конструирование клонирующих векторов подразумевает встраивание или удаление удобных для идентификации клонов генетических элементов (специфических сайтов рестрикции, инициации и регуляции транскрипции). Например, при создании плазмидных клонирующих векторов ослабляют систему контроля репликации и добавляют или вырезают гены антибиотикоустойчивости. При формировании фаговой векторной конструкции экзогенную ДНК встраивают в район локализации маркерного гена, позволяющего вести селекцию химерных фагов по экспрессии химерного белка (часть полипептидной цепи соответствует маркерному белку, а часть - информации, заключенной во встроеном фрагменте ДНК). Определение химерного белка возможно при использовании антител к фрагменту маркерного белка или участку, кодируемому чужеродной ДНК, а также путем выявления функционально активного белка после протеолитического расщепления химерного полипептида. При конструировании искусственных дрожжевых хромосом YAC используют плазмидные векторы, содержащие в своем составе известные центромерные и теломерные последовательности хромосом дрожжей, необходимые для поддержания репликации векторов в клетках хозяина. Для введения в клетки бактерий чужеродных ДНК необходимо наличие так называемого клонирующего вектора, т.е. автономно реплицирующегося в клетках фрагмента ДНК. Большая часть известных векторов сконструирована на основе имеющихся в клетках бактерий внехромосомальных элементов типа плазмид или бактериофагов. При их создании и использовании придерживаются следующих критериев: вектор должен быть небольшим в связи с тем, что эффективность трансформации клеток-хозяев снижается по мере увеличения размера плазмиды до 15 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.) и выше; вектор должен быть хорошо охарактеризован относительно числа генов и их расположения, а также сайтов рестрикции и нуклеотидной последовательности; вектор должен легко реплицироваться в клетке-хозяине; вектор должен иметь один или несколько селективных маркеров (генов), позволяющих легко отличать клетки, несущие вектор, от нетрансформированных клеток; идеальный вектор должен дополнительно содержать маркер, который может быть активирован или инактивирован путем встраивания фрагментов гетерологичной ДНК; вектор должен содержать максимальное число уникальных сайтов рестрикции, в которые может быть осуществлена вставка гетерологичной ДНК.</p>
104	<p>Вирусные векторы.</p> <p>Ответ: Один из наиболее широко используемых классов векторов — производные от ретровирусов, простых РНК-вирусов всего с тремя структурными генами, которые могут быть удалены и заменены нужным геном. Текущее поколение ретровирусных векторов создано так, чтобы лишить их способности к репликации. Другие их достоинства: нетоксичны в клетке; в геном хозяина внедряется (с передаваемым геном) только небольшое количество копий вирусной ДНК; встроена ДНК стабильна; ретровирусные векторы могут встраивать вплоть до 8 килобаз дополнительной ДНК, что достаточно для многих передаваемых генов. Основное ограничение большинства ретровирусных векторов в том, что для интеграции вируса в ДНК хозяина целевая клетка должна делиться, а это ограничивает использование таких векторов для неделящихся клеток, например нейронов. Тем не менее ретровирусы одного класса — лентивирусы, включающие ВИЧ, способны встраивать свою ДНК во множество медленно делящихся и даже неделящихся клеток, включая нейроны. Эти векторы могут оказаться пригодными для лечения неврологических заболеваний. Адено-ассоциированные вирусы имеют большое преимущество — они не имеют никаких неблагоприятных эффектов у больных и широко распространены в популяциях человека. Кроме того, они заражают как делящиеся, так и неделящиеся клетки и могут существовать в виде эписом или стабильно интегрироваться в хромосому хозяина. Их основной недостаток состоит в том, что имеющиеся на настоящий момент адено-ассоциированные вирусные векторы могут встраивать не более 5 килобаз дополнительной ДНК. Аденовирусные векторы имеют свои преимущества — их можно получать в высоком титре; они заражают множество типов клеток, как делящихся, так и неделящихся; они могут встраивать в себя от 30 до 35 килобаз ДНК. Тем не менее, помимо других ограничений, их применение недавно было связано по крайней мере с одной смертью при испытании генотерапии вследствие развития сильной иммунной реакции. Следовательно, возможность их использования в целях генотерапии в настоящее время тщательно проверяется.</p>
105	Использование непатогенных вирусов для доставки генетического материала внутрь

	<p>клеток.</p> <p>Ответ: Воссоздать вирус в лаборатории долгое время было непростой задачей для ученых. Впервые это произошло еще 18 лет назад, в 2002 году, а творцами первого «рукотворного вируса» стали ученые из Университета штата Нью-Йорк в Стоуни-Брук под руководством Экарда Виммера. Им удалось сконструировать вирус полиомиелита. Сначала исследователи из небольших олигонуклеотидов (коротких фрагментов РНК) собрали полный геном полиовируса, состоящую из 7500 нуклеотидов. На тот момент это было мощным достижением, хотя в масштабе вирусов — не так уж и много. Например, у ВИЧ около 10 тысяч нуклеотидов, у возбудителя лихорадки Эбола — 19 тысяч, а у коронавируса SARS-CoV-2 (того самого, который вызвал пандемию инфекции COVID-19) — 30 тысяч. Например, создание оружия против бактерий с заданными свойствами — тех самых бактериофагов. Способность вирусов проникать в клетку и встраивать свой геном в ДНК хозяина используют для генетической модификации: для этого из вирусной ДНК или РНК удаляют гены, ответственные за репликацию вирусного генома, и вставляют целевой ген. В результате получается так называемый вирусный вектор: он способен проникать в клетку, и внедряться в ее гены, но дальше жизненный цикл такого дефектного вируса прерывается. Клетка при этом получает новые гены, которые может использовать для собственных нужд. Например, так называемые аденоассоциированные вирусы используются для лечения болезни Альцгеймера: в основе такой терапии также используются векторные технологии. Наконец, гибридные вирусы со сниженной патогенностью можно использовать для вакцинации. Клетки, зараженные модифицированными в лаборатории патогенами, экспрессируют на своей поверхности белки. А уже на них реагируют иммунные клетки — при этом вызывать полноценную инфекцию такой полувирол-полувакцина не способен.</p>
106	<p>Ретровирусы в современных подходах в генной терапии.</p> <p>Ответ: Перенос генов, опосредованный ретровирусным вектором, занимает центральное место в развитии генной терапии. Ретровирусы имеют несколько явных преимуществ перед другими векторами, особенно когда предпочтительным результатом является постоянный перенос генов. Наиболее важным преимуществом ретровирусных векторов является их способность трансформировать свой одноцепочечный РНК-геном в двухцепочечную молекулу ДНК, которая стабильно интегрируется в геном клетки-мишени. Это означает, что ретровирусные векторы могут быть использованы для постоянной модификации ядерного генома клетки-хозяина. В последнее время перенос генов, опосредованный ретровирусными векторами, а также более широкая область генной терапии получили новый импульс благодаря разработке нового класса ретровирусных векторов, полученных из лентивирусов. Они обладают уникальной среди ретровирусов способностью поражать нециклирующие клетки. Векторы, полученные из лентивирусов, обеспечили качественный скачок в технологии и, по-видимому, предлагают средства для достижения значительных уровней переноса генов <i>in vivo</i>. Способность ретровирусов интегрироваться в хромосому клетки-хозяина также повышает возможность инсерционного мутагенеза и активации онкогена. Оба эти явления хорошо известны при взаимодействии определенных типов ретровирусов дикого типа со своими хозяевами. Однако до недавнего времени они не наблюдались при передаче генов с дефектом репликации, опосредованном ретровирусным вектором, ни на животных моделях, ни в клинических испытаниях. Это означало, что потенциальные недостатки ретровирусной генной терапии до недавнего времени рассматривались в значительной степени, если не полностью, гипотетически. Недавнее клиническое исследование ус-опосредованной генной терапии X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита (X-SCID) доказало потенциал ретровирусно-опосредованного переноса генов для лечения наследственных метаболических заболеваний. Однако он также проиллюстрировал связанные с этим потенциальные опасности: у 2 из 10 пациентов в результате лечения развивается Т-клеточный лейкоз.</p>
107	<p>Лентивирусы в современных подходах в генной терапии.</p> <p>Ответ: Возникшая в конце XX века пандемия ВИЧ-инфекции и сопутствующее распространение синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИДа) послужили толчком к масштабным исследованиям вызывающего эти патологии вируса. В этих исследованиях раскрыли детали организации генома, репликации и жизненного цикла вируса иммунодефицита человека 1, проложив тем самым путь для создания на его основе лентивирусных векторных систем. Такие системы использовались в создании самой первой одобренной CAR-T-терапии — лечения, подарившего</p>

	<p>надежду безнадежным больным, и ставшего одним из самых громких прорывов в онкогематологии за последние годы. Lentивирuсы имеют высокую частоту рекомбинации (обмена частями генома между двумя вирусами) и быстро мутируют. Отсюда естественные опасения, что векторы на их основе смогут самопроизвольно воспроизводиться в организме человека и благодаря дальнейшей «перетасовке генов» приводить к появлению суперинфекций. Чтобы снизить подобные риски при разработке векторных систем, основные гены исходных вирусов стали распределять в отдельные плазмиды. При этом полученные векторы (уже неспособные к репликации) — далее еще и последовательно улучшали: на сегодняшний день сменилось уже три поколения таких частиц. Помимо образования репликационно компетентного вируса, вторым основным риском при применении ретровирусных векторов является онкогенез, возникающий за счет так называемого инсерционного мутагенеза. Критически важно оценивать такие риски, ведь γ-ретровирусы имеют тенденцию встраиваться вблизи генных регуляторных последовательностей, что представляет большую опасность. В частности, в клинических исследованиях с использованием таких частиц фиксировались случаи смерти от развившегося лейкоза. Первые лентивирусные векторные системы содержали три плазмиды: трансферную (transfer), оболочечную (envelope), и упаковочную (packaging). Упаковочная плазида содержала большую часть генома исходного вируса: структурные, ферментативные, регуляторные и вспомогательные последовательности, — и не включала гены, кодирующие поверхностные белки вириона. А ведь именно они нужны для связи с клеткой и проникновения в нее, что является ключевым этапом репликативного цикла. За это отвечает оболочечная плазида, несущая последовательность вирусного гликопротеина (такого как оболочечный гликопротеин G вируса везикулярного стоматита VSV-G) для помощи векторной частице в связывании с рецепторным белком на поверхности клетки. Наконец, последний компонент векторной системы первого поколения — трансферная плазида — несет целевой трансген, а также так называемую последовательность пси-петли (ψ-петли), — и все это в обрамлении длинных терминальных повторов (long terminal repeats, LTRs). Последние два элемента необходимы для упаковки вирусной РНК в вирион. После заражения клеток тремя вышеназванными плазмидами в них происходит сборка вирусных частиц, а затем уже их выход наружу. Высвобождаемые векторы содержат VSV-G (он помогает им впоследствии проникать в клетки), но внутри них нет гена, кодирующего этот белок. Так происходит потому, что в кодирующей VSV-G плазмиде отсутствуют генетические последовательности, необходимые для сборки белковой вирусной оболочки, а значит, все ее содержимое запаковаться в вирион уже не сможет. Поэтому такие частицы умеют доставлять гены в клетку, но не способны размножаться. Чтобы они вдруг снова научились этому, необходима рекомбинация между нашими векторами и, например, природными лентивирусами. Г</p>
108	<p>Принцип выбора вирусного вектора для доставки генетического материала. Ответ: Принцип выбора вирусного вектора в первую очередь зависит от цели эксперимента и возможностей его реализации, а также особенностей организма хозяина и факторов окружающей среды. Вирусные векторы адаптированы к своему конкретному применению, но обычно имеют несколько ключевых свойств. Безопасность: хотя вирусные векторы иногда создаются из патогенных вирусов, они модифицируются таким образом, чтобы минимизировать риск обращения с ними. Обычно это включает удаление части вирусного генома, критического для репликации вируса. Такой вирус может эффективно инфицировать клетки, но после того, как инфекция произошла, требуется вспомогательный вирус, чтобы обеспечить недостающие белки для производства новых вирионов. Низкая токсичность: вирусный вектор должен оказывать минимальное влияние на физиологию клетки, которую он заражает. Стабильность: некоторые вирусы генетически нестабильны и могут быстро перестраивать свои геномы. Это наносит ущерб предсказуемости и воспроизводимости работы, проводимой с использованием вирусного вектора, и избегается при их разработке. Специфичность типа клеток. Большинство вирусных векторов спроектировано так, чтобы поражать как можно более широкий спектр типов клеток. Однако иногда наоборот, предпочтительно, чтобы вектор поражал определенные виды клеток. Вирусный рецептор может быть модифицирован для нацеливания вируса на определенный тип клеток. Вирусы, модифицированные таким образом, называются псевдотипированными. Идентификация: вирусным векторам часто дают определенные гены, которые помогают идентифицировать, какие клетки приняли вирусные гены. Эти гены называются маркерами. Распространенным</p>

	<p>маркером является устойчивость к определенному антибиотику. Затем клетки можно легко выделить, так как клетки, которые не поглощают гены вирусного вектора, не обладают устойчивостью к антибиотикам и поэтому не могут расти в культуре с соответствующим антибиотиком.</p>
109	<p>Основные направления клеточной инженерии растений. Направления дифференцировки клеток в культуре.</p> <p>Ответ: Одним из наиболее важных направлений биотехнологии является клеточная инженерия растений или клеточная биотехнология, которая заключается в получении растений из одной клетки, а также в генетических манипуляциях с изолированными клетками, направленными на преобразование их генотипов. Клеточная биотехнология базируется на способности клеток к существованию и размножению в условиях <i>in vitro</i>, их тотипотентности и регенерации. Тотипотентность растительных клеток. Растительные клетки в отличие от клеток животных обладают свойством тотипотентности, на основании которого из одной клетки могут быть регенерированы фертильные растения. Идея о тотипотентности любой растительной клетки была выдвинута Г. Хаберландом (1902). Любая растительная клетка, а не только оплодотворенная яйцеклетка, обладает одинаковыми потенциальными возможностями, так как содержит весь набор генов и, следовательно, клетки сохраняют свойственную зиготе программу развития, поэтому могут регенерировать в целое растение. Однако свойство тотипотентности не всегда реализуется, так как потенциальные возможности клеток разных типов проявляются неодинаково. В некоторых из них гены в сильной степени репрессированы, в связи с чем проявление тотипотентности становится ограниченным. Используя системы <i>in vitro</i>, можно реализовать тотипотентность клетки высшего растения одним из двух путей: 1) индукцией в каллусных тканях или культивируемых клетках цепи событий, связанных с образованием меристематических очагов, развитием на их основе зачатков стеблевых апексов, появлением побегов, которые после укоренения развиваются в целое растение; 2) индукцией развития клетки по пути зародышевой структуры, образующей проросток и растение. Дедифференцировка как основа каллусогенеза. Через некоторое время при культивировании на питательной среде в условиях <i>in vitro</i> эксплантированных клеток и тканей наблюдается процесс их дедифференцировки и образуется первичный каллус (каллусная ткань). Дедифференцировка – это потеря клеточных структур, выполняющих специфические функции, и возвращение дифференцированных клеток в меристематическое состояние, в котором они сохраняют способность к делению. Клетка начинает делиться и образуется каллус. Каллус (каллусная ткань) – это ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений. Сам процесс образования каллуса называется каллусогенезом. Пролиферация – новообразование клеток путем размножения.</p>
110	<p>Метагеномика. Сравнительная метагеномика.</p> <p>Ответ: Метагеномика — раздел молекулярной генетики, в котором изучается генетический материал, полученный из образцов окружающей среды. Метагеномика изучает набор генов всех микроорганизмов, находящихся в образце среды, — метагеном. Метагеномный анализ позволяет определить видовое разнообразие исследуемого образца без необходимости выделения и культивирования микроорганизмов. Основным преимуществом использования метагеномного подхода является учёт не только культивируемых микроорганизмов, но и некультивируемых. Оказалось, что такие организмы вносят основной вклад в видовое разнообразие сообществ. Метагеномика позволяет детально изучить разнообразие сообществ, а значит и выяснить механизмы их функционирования, определить метаболические взаимосвязи. Широкое развитие метагеномики обусловлено распространением методов секвенирования нового поколения. Они позволяют получить последовательности практически всех генов каждого микроорганизма сообщества. Так как цена на секвенирование ДНК падает с каждым днём, такой анализ становится всё более доступным. Сравнительный анализ метагеномов может дать дополнительное представление о функционировании сложных микробных сообществ и их роли в здоровье хозяина. Парные или множественные сравнения между метагеномами могут проводиться на уровне состава последовательностей (сравнение GC-содержания или размера генома), таксономического разнообразия или функциональной комплементарности. Сравнения структуры популяции и филогенетического разнообразия могут быть сделаны на основе 16S рРНК и других филогенетических маркерных генов или — в случае сообществ с низким разнообразием - путем реконструкции генома на основе метагеномного набора</p>

	<p>данных. Функциональные сравнения между метагеномами могут быть сделаны путем сравнения последовательностей со справочными базами данных, такими как COG или KEGG, и составления таблиц численности по категориям и оценки любых различий на предмет статистической значимости. Этот геноцентрический подход подчеркивает функциональное дополнение сообщества в целом, а не таксономических групп, и показывает, что функциональные дополнения аналогичны в сходных условиях окружающей среды. Следовательно, метаданные об экологическом контексте метагеномной выборки особенно важны при сравнительном анализе, поскольку они дают исследователям возможность изучать влияние среды обитания на структуру и функционирование сообщества.</p>
111	<p>Метагеномика - генетический потенциал микроорганизмов.</p> <p>Ответ: Метагеномика - это молекулярный инструмент, используемый для анализа ДНК, полученной из образцов окружающей среды, с целью изучения сообщества присутствующих микроорганизмов без необходимости получения чистых культур. Функциональная метагеномика позволяет проводить геномный анализ микробов, не поддающихся культивированию, с высоким разрешением и соотносить геномы с конкретными функциями в окружающей среде. Биологические объекты метагеномики: бактерии, археи, вирусы, эукариоты (грибы, вирусы), хозяева (если изучать метагеном кишечника коровы, то можно ожидать что несколько процентов информации получатся коровьими), лабораторные загрязнения. Основные задачи метагеномики: определить какие бактерии есть, чем они занимаются (то есть нахождение таксономического (филогенетического) и функционального состава) и как они друг с другом взаимодействуют в плане тотального метаболизма. Метагеномика обладает основным преимуществом функциональной, а не просто таксономической характеристики возможностей данного сообщества. Это связано с тем, что в метагеномике секвенируется вся коллекция геномов, раскрывая весь геномный репертуар сообщества. В отличие от этого, секвенирование 16S присваивает таксономию на основе области одного консервативного гена. Метагеномика используется для изучения сравнительного профиля микробного сообщества на отдельном участке. Возможность полногеномного секвенирования различных микробов, подходящих для процесса биоремедиации, оказалась полезной для оценки экспрессии генов и соответствующего пула ферментов, участвующих в деградации антропогенных загрязняющих веществ микроорганизмам в окружающей среде демонстрируют ценное представление о распределении и популяции микроорганизмов в окружающей среде с экологической точки зрения.</p>
112	<p>Транскриптомика. Транскриптомные исследования микроорганизмов.</p> <p>Ответ: Транскриптомные технологии (англ. transcriptomics technologies) — методы, разработанные для изучения транскриптома (то есть совокупности всех РНК-транскриптов) организма. В состав транскриптома входят все транскрипты, которые присутствовали в клетке на момент выделения РНК. Исследуя транскриптом, можно установить, какие клеточные процессы были активны в тот или иной момент времени. Первые попытки изучения транскриптома были предприняты в начале 1990-х годов. Благодаря развитию новых технологий в конце 1990-х транскриптомика стала важной биологической наукой. В настоящий момент в транскриптомике есть два основополагающих метода: микрочипы, позволяющие выявить наличие и количество определённых транскриптов, и секвенирование РНК (РНК-Seq), в котором используются методы секвенирования нового поколения для получения последовательностей всех транскриптов. С улучшением методик количество данных, получаемых в ходе одного транскриптомного эксперимента, увеличивалось. В связи с этим методы анализа данных также совершенствовались, чтобы обеспечить точный и эффективный анализ возрастающего объёма данных. Транскриптомные базы данных постоянно растут и становятся всё более полезными для исследователей. Это связано с тем, что правильная интерпретация данных, полученных в ходе транскриптомного эксперимента, практически невозможна без опоры на предшествующие исследования. Измерение уровня экспрессии определённых генов в клетках разных тканей и при разных условиях или же в разные моменты времени даёт информацию о регуляторных механизмах, связанных с экспрессией генов. С помощью этих данных могут быть определены функции ранее не аннотированных генов. Анализ транскриптомов позволяет выявить различия в экспрессии определённых генов у разных организмов, что может быть особенно полезно для понимания молекулярных основ заболеваний человека. Транскриптом является лишь одним из показателей клеточного статуса. Другие инвентаризации клеточного содержимого также важны; они включают измерения конечных продуктов пути, таких</p>

	<p>как нуклеотиды, аминокислоты - это лишь один показатель клеточного статуса. Другие инвентаризации клеточного содержимого также имеют решающее значение; они включают измерения конечных продуктов пути, таких как нуклеотиды, аминокислоты, жирные кислоты и кофакторы, а также строительных блоков, из которых возникают анаболические пути.</p>
113	<p>Культивирование отдельных клеток. Ответ: Культивирование клеток представляет собой процесс, посредством которого <i>in vitro</i> отдельные клетки (или единственная клетка) прокариот и эукариот выращиваются в контролируемых условиях. Культивирование отдельных клеток позволяет получать клоны и исследовать генетическую и физиологическую стабильность или изменчивость при выращивании клонированного материала. Для создания технологий важно изучать условия, определяющие возникновение стимулов к делению у отдельных клеток, изолированных от влияния других клеток популяции и тканей. Изолированные из тканей растения или протопласты культивируемых клеток после образования клеточной стенки являются идеальными отдельными клетками. Отдельные клетки могут быть изолированы из суспензий с использованием микроманипулятора, проточного цитофлюориметра с сортером или путем последовательных разбавлений. Для использования последнего метода суспензия готовится разными способами: 1). 1-2 мл суспензии отбирают из супернатанта после оседания основной массы клеток. 2). Суспензию фильтруют через фильтры с уменьшающимся размером пор (нейлоновые сетки или металлические фильтры). Для последовательных разбавлений используют платы для микротитрований. Это позволяет микроскопически контролировать клеточный состав при последовательных разбавлениях. Индукция делений отдельных клеток из суспензии, изолированных протопластов, отдельных или высеванных при очень низкой плотности клеток, полученных методом последовательных разбавлений, возможна при использовании очень богатой питательной среды, например, среды Као и Михайлюка. При этом объем среды, в которую помещаются клетки, должен быть минимальным (микрокапли в чашке Купрака объемом 20 мкл). Даже и при соблюдении всех этих условий процент разделившихся клеток остается низким. Более эффективны методы использования ткани-«няньки» или «кормящего слоя».</p>
114	<p>Протеомные исследования микроорганизмов. Ответ: Протеомные исследования позволяют определять род и виды патогенных и других микроорганизмов. Для этого интактные бактериальные клетки помещают на металлическую мишень специального аппарата (масс-спектрометра), затем покрывают матрицей и воздействуют на них лазерным излучением, в результате чего получают специфичные профили, которые по характерным массам идентифицирует обученный алгоритм. Методы протеомики: 1. Изоэлектрофокусированием (ИЭФ) называют метод разделения белков под действием электрического поля в среде с градиентом pH, который создается специальными амфотерными веществами – «амфолитами», способными переносить ток (хорошая проводимость), а также создавать локально и поддерживать pH (хорошая буферная емкость). Появление наборов полиамино- поликарбонновых кислот обеспечило высокую эффективность фракционирования белков с помощью ИЭФ, при этом разделение осуществлялось за счет различий в pI. 2. Один из электрофоретических методов – особая модификация метода Лэммли, использующего ионный детергент – додецилсульфат Na (SDS). За счет гидрофобных взаимодействий, используемый детергент практически одинаково связывается с подавляющим большинством белков в соотношении 1.4 мг SDS на 1 мг белка. Огромный избыток полностью диссоциированных остатков сульфокислоты делает несущественной роль заряда самого белка. Электрофоретическая подвижность комплекса белок-SDS в градиентном геле оказывается линейно связана с десятичным логарифмом его молекулярной массы (Mm). Таким образом, эта система обеспечивает разделение белков по различиям в Mm. 3. Идентификация микросеквенированием основана на определении (расшифровке) части аминокислотной последовательности белка. Разработанные методы микросеквенирования позволяют работать с очень малыми количествами пептидов - вплоть до нанограммовых. Это важно, так как определение даже короткого фрагмента аминокислотной последовательности часто оказывается решающим для идентификации целого белка. В настоящее время возможно как проведение прямого N-концевого секвенирования белка, перенесенного на инертную мембрану, так и секвенирование отдельных пептидов, полученных из изучаемого белка после его ферментативного расщепления высокоэффективной жидкостной хроматографией.</p>

	<p>Микросеквенирование позволяет выявлять одиночные аминокислотные замены в анализируемых белках. 4. Масс-спектрометрия устанавливает какие атомы входят в состав молекулы, какова структура их расположения и изотопный состав, а также какова масса молекулы. Существенное отличие масс-спектрометрии от других аналитических физико-химических методов состоит в том, что оптические, рентгеновские и другие методы детектируют излучение или поглощение энергии молекулами или атомами, а масс-спектрометрия имеет дело с самими частицами вещества. Масс-спектрометрия измеряет соотношение массы частицы к заряду. Для этого используются законы движения заряженных частиц материи в магнитном или электрическом поле.</p>
115	<p>Биоинформатика. Цели и задачи биоинформатики. Ответ: Биоинформатика (bioinformatics) - быстро развивающаяся отрасль информатики (теории информации), занимающаяся теоретическими вопросами хранения и передачи информации в биологических системах. Целью биоинформатики является, как накопление биологических знаний в форме, обеспечивающей их наиболее эффективное использование, так и построение и анализ математических моделей биологических систем и их элементов. Задачи: Разработка алгоритмов для анализа биологических данных большого объема: Алгоритм поиска генов в геноме; Анализ и интерпретация различных типов биологических данных таких, как нуклеотидные и аминокислотные последовательности, домены белков, структура белков и т.д.: Изучение структуры активного центра белка; Разработка программного обеспечения для управления и быстрого доступа к биологическим данным: Создание банка данных аминокислотных последовательностей. Таким образом, основными задачами биоинформатики являются: распознавание белок-кодирующих участков в первичной структуре биополимеров, сравнительный анализ первичных структур биополимеров, расшифровка пространственной структуры биополимеров и их комплексов, пространственное сворачивание белков, моделирование структуры и динамики биомолекул, а также создание и сопровождение специализированных баз данных. Основные направления биоинформатики в зависимости от исследуемых объектов: 1) Биоинформатика последовательностей; 2) Структурная биоинформатика; 3) Компьютерная геномика. С другой стороны, биоинформатику можно условно разделить на несколько направлений в зависимости от типа решаемых задач: Применение известных методов анализа для получения новых биологических знаний; Разработка новых методов анализа биологических данных; Разработка новых баз данных. Наиболее известной и наиболее эффективной областью применения биоинформатики в настоящее время является анализ геномов, тесно связанный с анализом последовательностей.</p>
116	<p>Основные области исследований в биоинформатике. Ответ: Основные исследовательские работы в этой области включают в себя выравнивание последовательностей, поиск генов, сборку генома, разработку лекарств, открытие новых лекарств, выравнивание структуры белка, предсказание структуры белка, предсказание экспрессии генов и белок-белковых взаимодействий, общегеномные исследования ассоциаций, моделирование эволюции и клеточного деления / митоза. Биоинформатика предполагает создание и совершенствование баз данных, алгоритмов, вычислительных и статистических методов, а также теории для решения формальных и практических проблем, возникающих при управлении и анализе биологических данных. За последние несколько десятилетий быстрое развитие технологий геномных и других молекулярных исследований, а также развитие информационных технологий позволили получить огромное количество информации, относящейся к молекулярной биологии. Биоинформатика - это название, данное этим математическим и вычислительным подходам, используемым для углубления понимания биологических процессов. Общие виды деятельности в биоинформатике включают картирование и анализ последовательностей ДНК и белков, выравнивание последовательностей ДНК и белков для их сравнения, а также создание и просмотр трехмерных моделей структур белков.</p>
117	<p>Современные методы биоинформатики для анализа последовательностей. Ответ: Компьютерные методы анализа генов – это набор инструментов и алгоритмов, которые используются для изучения и интерпретации генетической информации. Эти методы позволяют исследователям анализировать гены, их структуру, функцию и взаимодействие с другими генами. Секвенирование генома. Одним из основных компьютерных методов анализа генов является секвенирование генома. Это процесс определения последовательности нуклеотидов в ДНК или РНК молекуле.</p>

	<p>Секвенирование генома позволяет исследователям узнать, какие гены присутствуют в организме и как они устроены. Аннотация генома. Аннотация генома – это процесс определения функции и свойств генов в геноме. Компьютерные методы анализа генов позволяют исследователям аннотировать геном, идентифицировать гены и предсказывать их функцию на основе сходства с уже известными генами. Поиск генных последовательностей. Компьютерные методы анализа генов также позволяют исследователям искать конкретные генные последовательности в геноме. Это может быть полезно, например, при поиске генов, связанных с определенными заболеваниями или при исследовании генетической основы определенных фенотипических характеристик. Анализ экспрессии генов. Анализ экспрессии генов – это процесс изучения уровня активности генов в определенных условиях или тканях. Компьютерные методы анализа генов позволяют исследователям анализировать данные экспрессии генов и выявлять гены, которые изменяют свою активность в ответ на различные факторы. Предсказание структуры белка. Компьютерные методы анализа генов также используются для предсказания структуры белков на основе их аминокислотной последовательности. Это важно для понимания функции белков и их взаимодействия с другими молекулами. Все эти методы и инструменты позволяют исследователям получать более глубокое понимание генетической информации и использовать ее для различных биологических и медицинских исследований.</p>
118	<p>Глобальное и локальное выравнивание. Ответ: Алгоритмы и программы для анализа генов являются важным инструментом в биоинформатике. Они позволяют исследователям обрабатывать и анализировать генетическую информацию, выявлять закономерности и понимать функцию генов. Выравнивание последовательностей. Один из основных алгоритмов для анализа генов – это алгоритмы выравнивания последовательностей. Они позволяют сравнивать две или более последовательности ДНК или белка и определять степень их сходства или различия. Это важно для понимания эволюционных связей между организмами и исследования функции генов. Поиск генов и промоторных областей. Алгоритмы для поиска генов и промоторных областей позволяют исследователям находить гены в геноме и определять их границы. Это важно для понимания структуры генома и идентификации генов, связанных с определенными биологическими процессами или заболеваниями. Анализ экспрессии генов. Алгоритмы и программы для анализа экспрессии генов позволяют исследователям определить, какие гены активны в определенных условиях или тканях. Они позволяют выявлять гены, которые изменяют свою активность в ответ на различные факторы. Предсказание структуры белка. Компьютерные методы анализа генов также используются для предсказания структуры белков на основе их аминокислотной последовательности. Это важно для понимания функции белков и их взаимодействия с другими молекулами. Все эти методы и инструменты позволяют исследователям получать более глубокое понимание генетической информации и использовать ее для различных биологических и медицинских исследований. Локальное выравнивание - поиск подобия только в пределах некоторой части последовательности (с использованием алгоритма Smith-Waterman). Показывает локальные совпадения с наивысшим счетом между двумя последовательностями, дает более значимые совпадения, чем таковые при глобальном выравнивании. Подходит для последовательностей, которые существенно отличаются по длине или составу и имеют общую консервативную область. Глобальное выравнивание предполагает, что последовательности гомологичны по всей длине. В глобальное выравнивание включаются обе входные последовательности целиком. Локальное выравнивание применяется, если последовательности содержат как родственные (гомологичные), так и неродственные участки.</p>
118	<p>Получаемая информация, решаемые задачи. Алгоритмы и программы для анализа генов являются важным инструментом в биоинформатике. Они позволяют исследователям обрабатывать и анализировать генетическую информацию, выявлять закономерности и понимать функцию генов. Выравнивание последовательностей. Один из основных алгоритмов для анализа генов – это алгоритмы выравнивания последовательностей. К решаемым задачам дисциплины биоинформатики можно отнести: Разработка алгоритмов для анализа биологических данных большого объема; Алгоритм поиска генов в геноме; Анализ и интерпретация различных типов биологических данных таких, как нуклеотидные и аминокислотные последовательности, домены белков, структура белков и т.д.; Изучение структуры активного центра белка; Разработка программного обеспечения для управления и быстрого доступа к биологическим данным; Создание банка</p>

	<p>данных аминокислотных последовательностей. Таким образом, основными задачами биоинформатики являются: распознавание белок-кодирующих участков в первичной структуре биополимеров, сравнительный анализ первичных структур биополимеров, расшифровка пространственной структуры биополимеров и их комплексов, пространственное сворачивание белков, моделирование структуры и динамики биомакромолекул, а также создание и сопровождение специализированных баз данных.</p>
120	<p>Базы данных. Примеры баз данных. Ответ: Биолог в биоинформатике обычно имеет дело с базами данных и инструментами их анализа. Теперь разберемся, какие базы данных бывают в зависимости от того, что в них помещают. Первый тип – архивные базы данных, это большая свалка, куда любой может поместить все, что захочет. К таким базам относятся: GeneBank & EMBL – здесь хранятся первичные последовательности; PDB – пространственные структуры белков, и многое другое. Например, в архивной базе данных указано, что в геноме археи (архебактерии) есть ген, кодирующий белок главного комплекса гистосовместимости, что является полной чепухой. Второй тип – курируемые базы данных, за достоверность которых отвечает хозяева базы данных. Туда информацию никто не присылает, ее из архивных баз данных отбирают эксперты, проверяя достоверность информации – что записано в этих последовательностях, какие есть экспериментальные основания для того, чтобы считать, что эти последовательности выполняют ту или иную функцию. К базам данных такого типа относятся: Swiss-Prot – наиболее качественная база данных, содержащая аминокислотные последовательности белков; KEGG – информация о метаболизме; FlyBase – информация о Drosophila; COG – информация об ортологичных генах. Поддержание базы требует работы кураторов или аннотаторов. Третий тип – производные базы данных. Такие базы получаются в результате обработки данных из архивных и курируемых баз данных. Сюда входит: SCOP – База данных структурной классификации белков (описывается структура белков); PFAM – База данных по семействам белков; GO (Gene Ontology) – Классификация генов (попытка создания набора терминов, упорядочивания терминологии, чтобы один ген не назывался по-разному, и чтобы разным генам не давали одинаковые названия); ProDom – белковые домены; AsMamDB – альтернативный сплайсинг у млекопитающих. Таким образом, существует три типа базы данных: архивные базы данных, курируемые и производные базы данных.</p>
121	<p>Деление баз данных. Ответ: Первый тип – архивные базы данных, это большая свалка, куда любой может поместить все, что захочет. К таким базам относятся: GeneBank & EMBL – здесь хранятся первичные последовательности; PDB – пространственные структуры белков, и многое другое. Например, в архивной базе данных указано, что в геноме археи (архебактерии) есть ген, кодирующий белок главного комплекса гистосовместимости, что является полной чепухой. Второй тип – курируемые базы данных, за достоверность которых отвечает хозяева базы данных. Туда информацию никто не присылает, ее из архивных баз данных отбирают эксперты, проверяя достоверность информации – что записано в этих последовательностях, какие есть экспериментальные основания для того, чтобы считать, что эти последовательности выполняют ту или иную функцию. К базам данных такого типа относятся: Swiss-Prot – наиболее качественная база данных, содержащая аминокислотные последовательности белков; KEGG – информация о метаболизме; FlyBase – информация о Drosophila; COG – информация об ортологичных генах. Поддержание базы требует работы кураторов или аннотаторов. Третий тип – производные базы данных. Такие базы получаются в результате обработки данных из архивных и курируемых баз данных. Сюда входит: SCOP – База данных структурной классификации белков (описывается структура белков); PFAM – База данных по семействам белков; GO (Gene Ontology) – Классификация генов (попытка создания набора терминов, упорядочивания терминологии, чтобы один ген не назывался по-разному, и чтобы разным генам не давали одинаковые названия); ProDom - белковые домены; AsMamDB - альтернативный сплайсинг у млекопитающих. Таким образом, существует три типа базы данных: архивные базы данных, курируемые и производные базы данных.</p>
122	<p>Синтез кДНК на матрице суммарной РНК (обратная транскрипция). Ответ: Транскрипция - это процесс синтеза РНК с использованием ДНК в качестве матрицы, происходящий во всех живых клетках. Другими словами, это перенос генетической информации с ДНК на РНК. Транскрипция катализируется ферментом</p>

	<p>ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Процесс синтеза РНК протекает в направлении от 5'- к 3'- концу, то есть по матричной цепи ДНК РНК-полимераза движется в направлении 3'→5'. Транскрипция состоит из стадий инициации, элонгации и терминации. Инициация транскрипции происходит в специфических участках ДНК – промоторах (последовательность ДНК, которая связывает РНК-полимеразу и служит отправной точкой транскрипции); - и сама состоит из нескольких стадий. В отличие от ДНК-полимераз, РНКП способна самостоятельно осуществлять инициацию и начинать синтез РНК в отсутствие затравки. Инициация требует наличия субстратов РНК-полимеразы - нуклеозидтрифосфатов - и заключается в образовании первых нескольких звеньев цепи РНК. При синтезе первых 9 рибонуклеотидов этот фрагмент выбрасывается и затем транскрипция начинается вновь и идет до конца. Энхансер – это небольшой участок ДНК, способный связываться с факторами транскрипции, при этом увеличивая уровень транскрипции гена или группы генов. Сайленсер — последовательность ДНК, с которой связываются белки-репрессоры (факторы транскрипции). Связывание белков-репрессоров с сайленсерами приводит к понижению или к полному подавлению синтеза РНК ферментом ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Элонгация - это переход от инициации к элонгации сопровождается разрывом связей между ферментом, промотором, факторами инициации транскрипции. Момент перехода РНК-полимеразы от инициации транскрипции к элонгации точно не определен. Происходит наращивание цепи, в результате которой происходит расплетение ДНК, транскрипция восстановления структуры ДНК с выталкиванием РНК или факторы элонгации повышают активность РНК-полимеразы и облегчают расхождение цепей ДНК. Синтез молекулы РНК идёт от 5'- к 3'-концу комплементарно матричной цепи ДНК. На стадии элонгации, в области транскрипционной вилки, одновременно разделены примерно 18 нуклеотидных пар ДНК. Растущий конец цепи РНК образует временную гибридную спираль, около 12 пар нуклеотидных остатков, с матричной цепью ДНК. По мере продвижения РНК-полимеразы по матрице в направлении от 3'- к 5'-концу впереди неё происходит расхождение, а позади - восстановление двойной спирали ДНК. Терминация - раскручивание двойной спирали ДНК в области сайта терминации делает его доступным для фактора терминации. Завершается синтез РНК в строго определенных участках матрицы - терминаторах (сайты терминации). Сигнал об окончании транскрипции закодирован в мРНК и называется терминатором в самой РНК. Существует два механизма терминации транскрипции: про-зависимый механизм, при котором белок Rho (ρ) дестабилизирует водородные связи между матрицей ДНК и мРНК, высвобождая молекулу РНК. Про-независимый, при котором транскрипция останавливается, когда только что синтезированная молекула РНК формирует стебель-петлю, за которой расположено несколько урацилов (...УУУУ), что приводит к отсоединению молекулы РНК от матрицы ДНК. Терминация транскрипции у эукариот менее изучена. Она завершается разрезанием РНК, после чего к её 3' концу фермент добавляет несколько аденинов (...АААА), от числа которых зависит стабильность данного транскрипта.</p>
123	<p>ПЦР (полимеразно-цепная реакция). Параметры и компоненты реакции. Real-time ПЦР, подходы к детектированию. (Молекулярные маяки, TaqMan, FRET, интеркалирующие красители).</p> <p>Ответ: Полимеразная цепная реакция – метод, позволяющий провести многократное увеличение (амплификацию) количества определенных молекул ДНК в анализируемом образце (в том числе в биологическом материале или чистой культуре). Главные преимущества ПЦР как диагностического метода в микробиологии – очень высокая чувствительность, позволяющая обнаружение крайне малых концентраций возбудителей в образцах, а также регулируемая специфичность, позволяющая обнаруживать или идентифицировать возбудителей на родовом, видовом или субвидовом уровне. Основным недостатком ПЦР вытекает из его крайне высокой чувствительности – образцы очень легко загрязнить ДНК из положительного контроля, другого образца или продукта ПЦР, что приведет к ложноположительной реакции. Это накладывает жесткие ограничения на условия, в которых производится смешивание ПЦР и работа с готовыми продуктами ПЦР.</p> <p>Проведение ПЦР. Готовится реакционная смесь, содержащая следующие компоненты: Выделенную ДНК из исследуемого образца, Буферный раствор, Ионы Mg^{2+} (необходимы для работы фермента), Два праймера – одноцепочечные короткие молекулы ДНК (длина чаще всего от 18 до 24 нуклеотидов), комплементарные концам разных цепей обнаруживаемой последовательности ДНК. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов. Термостойкую ДНК-полимеразу (чаще всего</p>

	<p>используется Таq-полимераза – полимераза, выделенная из <i>T. aquaticus</i>). Затем данная реакционная смесь помещается в амплификатор, который фактически представляет собой программируемый термостат. В амплификаторе проводится 30-40 циклов смены температур. Каждый из этих циклов состоит из трех этапов: Денатурация (температура 94°C) – разрываются водородные цепи, и цепочки ДНК расходятся. Отжиг праймеров (температура обычно в районе 50-60°C) – к концам цепей ДНК присоединяются праймеры. Вообще, при снижении температуры энергетически выгоднее воссоединение исходных цепей ДНК из исследуемого образца (ренатурация), однако концентрация праймеров в реакционной смеси на много порядков больше концентрации ДНК из образца (по крайней мере, на начальных циклах ПЦР), поэтому реакция отжига праймеров протекает быстрее ренатурации ДНК. Температура отжига выбирается в зависимости от температур плавления (денатурации) праймеров. Элонгация (температура обычно 72°C) – ДНК-полимераза достраивает праймеры по матрице длинных цепей ДНК. Температура соответствует оптимальной температуре работы используемой ДНК-полимеразы. Один из видов проведения ПЦР в реальном времени – с использованием интеркалирующего красителя, который добавляется прямо в реакционную смесь (чаще всего используется SYBR Green). Другой вид – с использованием одного из видов флуоресцирующих зондов, связывающихся с участком внутри ПЦР-продукта, что позволяет повысить специфичность обнаружения. Детекция флуоресценции происходит непосредственно в приборе в ходе протекания реакции. Молекулярные маяки - это синтетические олигонуклеотиды, получение которых хорошо документировано. В дополнение к обычному набору нуклеозидфосфорамидитов, для синтеза также требуется твердая подложка, дериватизированная гасителем, и фосфорамидитный строительный блок, предназначенный для нанесения защищенного флуоресцентного красителя. Зонды TaqMan - это гидролизные зонды, предназначенные для повышения специфичности количественной ПЦР. Зонды TaqMan сконструированы таким образом, что они отжигают в области ДНК, амплифицированной определенным набором праймеров. Зонды TaqMan могут быть конъюгированы с фрагментом, связывающим малую бороздку (MGB), дигидроциклопирролоиндольным трипептидом (DPI3), чтобы увеличить его сродство к последовательности-мишени; конъюгированные с MGB зонды имеют более высокую температуру плавления (Tm) из-за повышенной стабилизации ван-дер-ваальсовых сил. Поскольку Taq полимераза удлинит праймер и синтезирует зарождающуюся цепь (из одноцепочечной матрицы), 5'-3'- экзонуклеазная активность Taq-полимеразы разрушает зонд, который сросся с матрицей.</p>
124	<p>Секвенирование по Сенгеру (метод обрыва цепи). Принцип работы автоматического секвенатора.</p> <p>Ответ: Дидезоксинуклеотидный метод, или метод «обрыва цепи», был разработан Ф. Сенгером в 1977 году и в настоящее время широко используется для определения нуклеотидной последовательности ДНК. При секвенировании по Сенгеру происходит гибридизация синтетического олигонуклеотида длиной 17—20 звеньев со специфическим участком одной из цепей секвенируемого участка. Этот олигонуклеотид является праймером, поставляющим 3'-гидроксильную группу для инициации синтеза цепи, комплементарной матрице. Раствор с праймером распределяют по четырём пробиркам, в каждой из которых находятся четыре дезоксинуклеотида, dATP, dCTP, dGTP и dTTP (один из них — меченный радиоактивным изотопом) и один из четырёх 2',3'-дидезоксинуклеотидов (ddATP, ddTTP, ddGTP или ddCTP). Дидезоксинуклеотид включается по всем позициям в смеси растущих цепей, и после его присоединения рост цепи сразу останавливается. В результате этого в каждой из четырёх пробирок при участии ДНК-полимеразы образуется уникальный набор олигонуклеотидов разной длины, включающих праймерную последовательность. Далее в пробирки добавляют формамид для расхождения цепей и проводят электрофорез в полиакриламидном геле на четырёх дорожках. Проводят радиоавтографию, которая позволяет «прочитать» нуклеотидную последовательность секвенируемого сегмента ДНК. В более современном варианте дидезоксинуклеотиды метят четырьмя разными флуоресцентными красителями и проводят ПЦР в одной пробирке. Затем во время электрофореза в полиакриламидном геле луч лазера в определённом месте геля возбуждает флуоресценцию красителей, и детектор определяет, какой нуклеотид в настоящий момент мигрирует через гель. Современные приборы используют для секвенирования ДНК капиллярный электрофорез. основе автоматического секвенирования лежит уже упоминавшийся выше метод ферментативного</p>

	<p>секвенирования с использованием терминирующих ddNTP. Как и классический вариант Сэнгера, автоматическое секвенирование включает две стадии: 1) проведение терминирующих реакций; 2) разделение продуктов реакций с помощью электрофореза. Как правило, автоматизирована лишь вторая стадия, т.е. разделение меченных фрагментов ДНК в ПААГ или капиллярных трубках, получение спектра эмиссии флуорофоров и последующий обсчет собранных данных. Таким образом, автоматическое секвенирование идеологически отличается от современного ему ручного секвенирования только типом используемой метки.</p>
125	<p>Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту (метод химической деградации). Ответ: В ферментативном секвенировании фрагменты получают путем остановки синтеза ДНК-цепи на разных этапах, при проведении же секвенирования по Максаму-Гилберту фрагменты получают путем ограниченного (только в одном месте по одному основанию) химического разрыва меченых молекул ДНК. Сначала проводят четыре реакции модификации оснований: 1) модификацию аденина; 2) модификацию цитозина; 3) модификацию аденина и гуанина; 4) модификацию тимина и цитозина. Проводимая модификация затрагивает в каждой из всего множества присутствующих цепочек ДНК всего лишь один нуклеотид, благодаря подбору концентраций реагентов и использованию стоп-буферов. После чего по модифицированным основаниям проводят разрыв цепи. Таким образом, в результате четырех типов реакций образуется смесь олигонуклеотидных молекул, различающихся по размеру на один нуклеотид и несущих на одном из концов метку.</p>
126	<p>NGS-секвенирование (секвенирование нового поколения): пиросеквенирование, Illumina, SOLiD – чтение посредством лигирования. Ion Torrent™. Ответ: Секвенирование следующего поколения (NGS), также известное как высокопроизводительное секвенирование, произвело революцию в области геномики и молекулярной биологии, позволив одновременно секвенировать от тысяч до миллионов молекул ДНК. Он включает в себя ряд различных технологий секвенирования, каждая из которых направлена на получение больших объемов данных секвенирования при меньших затратах по сравнению с традиционными методами. NGS подразделяется на разные поколения в зависимости от используемых технологий секвенирования: Первое поколение: это включает широко используемое секвенирование по Сэнгеру, которое было первым методом, позволяющим секвенировать ДНК. Несмотря на то, что он дал важные сведения о геномике, он был ограничен с точки зрения масштабируемости и экономической эффективности. Секвенирование второго поколения: это поколение включает в себя несколько технологий, таких как пиросеквенирование, секвенирование с помощью химии обратимых терминаторов и секвенирование с помощью лигирования. Эти методы позволили секвенировать с более высокой пропускной способностью, создавая от тысяч до миллионов последовательностей одновременно. Они ознаменовали значительный скачок вперед с точки зрения скорости и снижения затрат. Секвенирование третьего поколения: Третье поколение NGS представило такие технологии, как одиночный молекула флуоресцентное секвенирование, секвенирование отдельных молекул в реальном времени, полупроводниковое секвенирование и секвенирование нанопор. Эти методы предоставили возможность секвенировать молекулы ДНК напрямую и в режиме реального времени, без необходимости амплификации или мечения. Они обеспечили преимущества с точки зрения секвенирования длинных считываний, обнаружения модификаций ДНК и облегчения изучения сложных участков генома. Секвенирование четвертого поколения: Концепция секвенирования четвертого поколения направлена на проведение геномного анализа непосредственно в ячейке. Это новая область исследований, в которой разрабатываются новые технологии, позволяющие секвенировать <i>in situ</i> и позволяющие лучше понять клеточную геномику и пространственную организацию. Пиросеквенирование: Пиросеквенирование — широко используемая технология NGS, разработанная компанией 454 Life Sciences (Roche). Он включает в себя обнаружение пирофосфата, высвобождаемого во время синтеза ДНК. Контролируя высвобождение пирофосфата, можно определить последовательность матрицы ДНК. Пиросеквенирование обеспечивало большую длину считывания и было ценно для таких приложений, как секвенирование <i>de novo</i>, целевое повторное секвенирование и обнаружение SNP. Illumina (Solexa) Секвенирование: Секвенирование Illumina, первоначально разработанное Solexa, позже приобретенное Illumina, является одной из самых популярных технологий NGS. Он использует обратимую химию красителя-</p>

	<p>терминатора для параллельного секвенирования миллионов фрагментов ДНК. Платформы секвенирования Illumina, такие как системы HiSeq и NovaSeq, обладают высокой масштабируемостью, обеспечивают высокую пропускную способность и малую длину считывания. Они широко используются для различных приложений, включая секвенирование всего генома, секвенирование экзома, транскриптомику и эпигеномику.</p> <p>Твердое секвенирование: Секвенирование SOLiD (секвенирование путем лигирования и обнаружения олигонуклеотидов), разработанное компанией Applied Biosystems (Life Technologies, теперь часть Thermo Fisher Scientific), использует уникальный подход к секвенированию на основе лигирования. Он включает в себя лигирование флуоресцентно меченых олигонуклеотидов с фрагментами ДНК с последующим многократным секвенированием путем лигирования. Секвенирование SOLiD обеспечивало высокую точность и использовалось для таких приложений, как полногеномное секвенирование, повторное секвенирование и анализ метилирования ДНК. Ионное полупроводниковое секвенирование (англ. Ion Semiconductor Sequencing) является методом определения последовательности ДНК, основанным на обнаружении ионов водорода, которые выделяются во время полимеризации ДНК. Это метод «секвенирования при синтезе», в ходе которого комплементарная цепь строится на основе последовательности матричной цепи. Микролунки, содержащие предназначенную для секвенирования молекулу матричной ДНК, наполняют дезоксирибонуклеотидтрифосфатом (dNTP) одного вида. Если введенный dNTP является комплементарным к ведущему нуклеотиду шаблона, он включается в растущую комплементарную цепь. Это вызывает высвобождение ионов водорода, который вызывает срабатывание ионного датчика ISFET, который указывает, что реакция произошла. Если в последовательности матричной цепи присутствует повтор одного нуклеотида, несколько молекул dNTP будут присоединены в одном цикле. Это приводит к увеличению количества образовавшихся ионов водорода и пропорционально более высокому электрическому сигналу.</p>
127	<p>Секвенирование 3 поколения поровое секвенирование, одномолекулярное секвенирование в реальном времени.</p> <p>Ответ: Секвенирование третьего поколения (также известное как секвенирование с длинным чтением) представляет собой класс методов секвенирования ДНК, находящихся в настоящее время в активной разработке. Технологии секвенирования третьего поколения позволяют производить значительно более длительные чтения, чем секвенирование второго поколения, также известное как секвенирование следующего поколения. Такое преимущество имеет решающее значение как для науки о геноме, так и для изучения биологии в целом. Однако данные секвенирования третьего поколения имеют гораздо более высокую частоту ошибок, чем предыдущие технологии, что может усложнить последующую сборку генома и анализ полученных данных. Эти технологии находятся в стадии активного развития, и ожидается, что будут улучшены показатели высокой частоты ошибок. Было обнаружено, что для приложений, более терпимых к частоте ошибок, таких как вызов структурных вариантов, секвенирование третьего поколения превосходит существующие методы даже при низкой глубине охвата секвенированием. По сравнению с текущим поколением технологий секвенирования, секвенирование третьего поколения обладает очевидным преимуществом, заключающимся в гораздо более длительном чтении. Ожидается, что такая большая длина считывания облегчит многочисленные вычислительные задачи, связанные со сборкой генома, реконструкцией транскриптов и метагеномикой, а также с другими важными областями современной биологии и медицины. Другие важные преимущества технологий секвенирования третьего поколения включают переносимость и скорость секвенирования. Поскольку требуется минимальная предварительная обработка образцов по сравнению с секвенированием второго поколения, можно было бы разработать оборудование меньшего размера. Технология Oxford Nanopore Technology недавно вывела на рынок секвенсор MinION. Это устройство для секвенирования примерно размером с обычную USB-флешку, и его можно легко использовать, подключив к ноутбуку. Кроме того, поскольку процесс секвенирования не распараллеливается по областям генома, данные могут собираться и анализироваться в режиме реального времени. Эти преимущества секвенирования третьего поколения могут быть хорошо использованы в условиях больницы, где требуется быстрый сбор и анализ данных на месте.</p>
128	<p>Трансгенные клеточные линии.</p> <p>Ответ: Трансгенный организм — живой организм, в геном которого искусственно</p>

	<p>введен ген, который не может быть приобретен при естественном скрещивании. Первоначально под трансгенными организмами подразумевались любые организмы, в геном которых были при помощи методов генной инженерии введены отсутствующие там гены, однако в настоящее время организмы, в геном которых были введены гены организмов, одного с ними вида или видов, с которыми они скрещиваются в естественных условиях называются цисгенными (введён ген с «собственными» регуляторными участками) либо интрагенными (введён ген с регуляторными участками других генов). Создание трансгенных организмов используют: в научном эксперименте для развития технологии создания трансгенных организмов, для изучения роли определенных генов и белков, для изучения многих биологических процессов; огромное значение в научном эксперименте получили трансгенные организмы с маркерными генами (продукты этих генов с легкостью определяются приборами, например, зелёный флуоресцентный белок визуализируют с помощью микроскопа, так легко можно определить происхождение клеток, их судьбу в организме и т. д.); в сельском хозяйстве для получения новых сортов растений и пород животных; в биотехнологическом производстве плазмид и белков. В настоящее время получено большое количество штаммов трансгенных бактерий, линий трансгенных животных и растений. Близко по смыслу и значению к трансгенным организмам находятся трансгенные клеточные культуры. Ключевым этапом в технологии создания трансгенных организмов является трансфекция — внедрение ДНК в клетки будущего трансгенного организма. В настоящее время разработано большое количество методов трансфекции. В русской научной литературе существовали попытки ввести термины «трансгенез», «трансгеноз» и «трансгенология» для технологии создания трансгенных организмов и соответствующей области знания, но эти термины используются редко. Близко по значению к термину «трансгенный организм» стоит термин «трансфицированный организм» — организм, в клетки которого был осуществлен перенос гена другого организма. Этот термин иногда используют, когда акт трансфекции осуществлен, но экспрессия нового гена отсутствует. Также этот термин используется для описания организма, в часть клеток которого введена генетическая конструкция (например, введение ДНК в один из органов взрослого животного, в этом случае новый ген не будет передан потомству, а его экспрессия зачастую носит временный характер).</p>
129	<p>Методы создания химер.</p> <p>Ответ: Химерами называют организмы или их части, состоящие из генетически разнородных тканей. Впервые этот термин применил немецкий ботаник Г. Винклер (1907) для форм растений, полученных в результате сращивания паслена и томата. В дальнейшем (1909) Э. Баур, изучая пеларгонию пестролистную, выяснил природу химер. Различают несколько типов причудливых организмов: химеры мозаичные (гиперхимеры) - в них генетически разные ткани образуют тонкую мозаику; химеры векториальные - у них разнородные ткани расположены большими участками; химеры периклиналильные - ткани с разными генотипами лежат слоями друг над другом; химеры мериклиналильные - их ткани состоят из смеси секториальных и периклиналильных участков. Химеры могут возникать в результате прививок растений и под влиянием мутаций соматических клеток. Компоненты химер могут отличаться друг от друга генами ядра, числом хромосом или генами пластид или митохондрий. Причудливые организмы часто используются в научных исследованиях. Принцип получения химер сводится главным образом к выделению двух или большего числа ранних зародышей и их слияния. В том случае, когда в генотипе зародышей, использованных для создания химеры, есть отличия по ряду характеристик, удается проследить судьбу клеток обоих видов. С помощью причудливых мышей было, например, решен вопрос о способе возникновения в ходе развития многоядерных клеток поперечнополосатых мышц. Изучение химерных животных позволило решить множество проблем, и в будущем благодаря применению этого метода появится возможность решать сложные вопросы генетики и эмбриологии. Получение таких эмбрионов осуществляется во многих лабораториях. Принцип получения химер сводится главным образом к выделению двух и большего числа ранних зародышей и их слиянию. В том случае, когда в генотипе зародышей, использованных для создания химеры, есть отличия по ряду характеристик, удается проследить судьбу клеток обоих типов. Два метода получения химер: 1) агрегационный - объединение двух и более морул или бластоцист в один эмбрион; 2) инъекционный - микроинъекция клеток внутриклеточной массы бластоцисты доноров в бластоцель эмбриона-реципиента. Имеются внутривидовые и межвидовые химеры лабораторных животных и с/х животных. В потомстве химерных животных не</p>

	сохраняется родительский генотип, происходит расщепление, и нарушаются ценные генетические комбинации. Развитие генной инженерии создало принципиально новую основу для конструирования последовательностей ДНК, необходимых исследователю. Успехи в области экспериментальной эмбриологии позволили создать методы введения таких искусственно созданных генов в ядра сперматозоидов или яйцеклеток. В результате возникла возможность получения трансгенных животных.
130	<p>Методы создания трансгенных животных. Нокаутные животные.</p> <p>Ответ: Трансгенными называют растения и животных, содержащие в своих клетках ген чужого организма, входящий в хромосомы. Их получают, используя методы генной инженерии. Трансгенные организмы могут иметь большое значение для повышения эффективности сельского хозяйства и в исследованиях в области молекулярной биологии. Первые генетически модифицированные организмы, полученные с помощью методов молекулярной биологии, появились на свет только в 80-х годах XX века. Ученые сумели изменить геном растительных клеток, добавляя в них необходимые гены других растений, животных, рыбы и даже человека. Первый трансгенный организм (мышь) был получен Дж. Гордоном с сотрудниками в 1980 г. На начало 90-х годов в Китае было проведено первое коммерческое испытание генетически модифицированных сортов табака и томатов, устойчивых к вирусам. Целью создания трансгенных организмов является получение организма с новыми свойствами. Клетки трансгенного организма производят белок, ген которого был внедрен в геном. Новый белок могут производить все клетки организма (неспецифическая экспрессия нового гена), либо определенные клеточные типы (специфическая экспрессия нового гена). Создание трансгенных организмов используют: в научном эксперименте для развития технологии создания трансгенных организмов, для изучения роли определенных генов и белков и биологических процессов; огромное значение в научном эксперименте получили трансгенные организмы с маркерными генами; в сельском хозяйстве для получения новых сортов растений и пород животных; в биотехнологическом производстве плазмид и белков. Нокаутные животные – это животные, гомозиготные по направленно инактивированному гену. Использование: для изучения детерминированных данным геном свойств на уровне организма. Схема получения: Фрагмент целевого гена, который планируют инактивировать <i>in vivo</i>, извлекают из геномной библиотеки на основе фага λ или космид. Внутрь фрагмента встраивают доминантный селективный маркер, одновременно с этим часть целевого гена делетируется. Такую конструкцию называют нацеленным вектором – это гибридная плазида, в которой к селективному маркеру справа и слева присоединены сегменты целевого гена, называемые фланкирующими последовательностями. Нацеленный вектор расщепляется рестриктазой вне фрагмента встройки для перевода его в линейную форму. Линейные ДНК вводят (чаще всего электропорацией) в культуру эмбриональных стволовых клеток. На селективной среде отбирают клетки трансформантов. Отбираемые клоны гетерозиготны по мутантному гену, так как встройка происходит в одну из гомологичных хромосом. Родившихся химерных мышей скрещивают с мышами исходной линии и получают гетерозиготное потомство по мутантному гену. Гетерозигот скрещивают между собой и отбирают в потомстве гомозиготных по мутантному гену мышей. Нокаутных животных также используют для создания линий, более чувствительных к тому или иному инфекционному агенту, чем исходные животные. Например, трансгенные животные, дефектные по гену интерлейкина 12 являются моделью колонизации слизистой желудка бактериями <i>Helicobacter pylori</i>, способствующими развитию язвенной болезни желудка у человека.</p>

3.3 Задания для практических работ

ПКв-5 способен применять знания и навыки в области разработки и применения генетических технологий, в том числе геномного редактирования

Раздел 1. Основы геномного редактирования

131	Методы выделения ДНК из различных организмов - клеточной культуры, бактерий, растений, крови, тканей
132	Подбор и проверка праймеров на специфичность
133	Принцип ПЦР анализа

134	Принцип работы обратной транскриптазы
-----	---------------------------------------

Раздел 2. Подходы к геномному редактированию в пищевой промышленности

135	Фрагмент рестрикции. Величина фрагмента рестрикции
136	Рестрикционный анализ продуктов ПЦР и геномной ДНК
137	Подготовка ДНК для различных методов секвенирования. Очистка, определение концентрации
138	Выравнивание последовательностей, программа BLAST, Clustal omega, построение филогении, рестрикционной карты, создание контигов после секвенирования

3.4 Домашнее задание

ПКв-5 способен применять знания и навыки в области разработки и применения генетических технологий, в том числе геномного редактирования.

139	<p>Лаборант-исследователь подготовил реакционную смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР), добавил в пробирку следующие компоненты:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Двухкратный буфер для ПЦР (с Mg²⁺) • ДНК-матрица • Прямой праймер <p>Затем лаборант отвлекся, а когда вернулся к протоколу, задумался, каких компонентов не хватает в реакционной смеси.</p> <p>Определите, какие компоненты нужно добавить в реакционную смесь</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. дезоксигуанозинтрифосфат 2. РНК-матрица 3. РНК-зависимая ДНК-полимераза 4. дезокситимидинтрифосфат 5. дезоксиаденозинтрифосфат 6. дезоксицитидинтрифосфат 7. ДНК-зависимая РНК-полимераза 8. ДНК-зависимая ДНК-полимераза 9. обратный праймер 10. дезоксиуридинтрифосфат <p>Ответ:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. дезоксигуанозинтрифосфат 2. дезокситимидинтрифосфат 3. дезоксиаденозинтрифосфат 4. дезоксицитидинтрифосфат 5. ДНК-зависимая ДНК-полимераза 6. обратный праймер
140	<p>Ферменты метаболизма ДНК используют в генетической инженерии для получения двуцепочечных молекул ДНК из одноцепочечных, а также для синтеза ДНК на матрице РНК.</p> <p>Выберите наиболее корректные варианты пропущенных фраз в тексте. В некоторых случаях возможно несколько правильных ответов.</p> <p>К ферментам матричного синтеза нуклеиновых кислот относят ДНК-зависимые ДНК-полимеразы: это ДНК-полимераза I из <i>E. coli</i>, ее фрагмент, так называемый (фрагмент синоним / фрагмент Кленова / фрагмент Оказаки / фрагмент 67 кДа), ДНК-полимеразу фага T4, Taq-полимеразу (из (Taq-зонда /</p>

	<p>Taq-фрагмента / <i>Thermus aquaticus</i> / Thermos / Thermo Scientific Fisher)). Все эти ферменты в присутствии ионов (натрия / калия / кальция / магния / железа) осуществляют синтез ДНК, комплементарной матричной цепи ДНК и для функционирования требуют наличия затравки (праймера) со свободным (2' / 3' / 4' / 5')-ОН-концом, комплементарного (соответствующей / матричной / синтезируемой / участку) ДНК. Фермент, синтезирующий ДНК на матрице РНК, называют РНК-зависимой ДНК-полимеразой, или (интегразой / ревертазой / обратной транскриптазой / ДНКазой / РНКазой / ДНК-РНКазой). Так же, как и обычные ДНК-полимеразы, РНК-зависимые ДНКполимеразы функционируют только при наличии (матричной РНК / праймера / завтрака / затравки / олиго-ДНК), комплементарной РНК-матрице. Эти ферменты находят применение в синтезе двуцепочечных ДНК, комплементарных мРНК, так называемых (кРНК / мДНК / рРНК / қДНК / дРНК). Процесс синтеза ДНК на матрице мРНК играет важную роль в биотехнологии, для экспрессии определенных генов, в частности, в бактериальных клетках.</p> <p>Ответ: фрагмент Кленова; <i>Thermus aquaticus</i>; магния; 3'; матричной; ревертазой, обратной транскриптазой; праймера, завтраки; қДНК</p>
141	<p>В настоящее время активно обсуждается целесообразность получения ГМО. Высказываются диаметрально противоположные точки зрения – от полного неприятия и необходимости запрещения, до признания только положительного значения.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Приведите обоснованные доказательства положительного значения ГМО 2. Приведите примеры эффективного применения генной модификации в медицине 3. Какие существуют реальные факты и обоснованные свидетельства возможного вреда ГМО для человека? 4. Возможно ли дальнейшее развитие и внедрение новых методов получения ГМО нанести вред человеку? <p>Ответ: Увеличение продуктивности пород и сортов в сельском хозяйстве, получение новых штаммов микроорганизмов , позволяющих бороться с загрязнением окружающей среды и т.д. 2. Инсулин и другие препараты, получение модельных животных и линий клеток для изучения различных заболеваний, генотерапия 3. Применение для получения бактериологическ ого оружия, например, примененного США для уничтожения посевов сахарного тростника на Кубе 4. Да</p>
142	<p>Выберите корректные по смыслу варианты из выпадающего списка. В некоторых местах возможно несколько правильных вариантов, выберите любой из них.</p> <p>Метод редактирования генома, использующий систему CRISPR/Cas9, может быть использован для (анализа родословной / выключения заранее выбранных генов / разработки штаммов бактерий, устойчивых к любым антибиотикам / создания новых видов животных / увеличения продуктивности экосистем). Молекулярный процесс редактирования гена включает несколько стадий. На первой происходит связывание комплекса белка-нуклеазы Cas9 и направляющей РНК с (антипараллельной / антисмысловой / идентичной / коллинеарной / комплементарной) целевой областью ДНК. Далее (белок / фермент / нуклеаза / рестриктаза / протеаза) Cas9 осуществляет (разрезание / расщепление / диссоциацию / стабилизацию / сопоставление) нуклеотидной последовательности ДНК в области непосредственного взаимодействия РНК-ДНК с образованием двуцепочечного разрыва. На последнем этапе ферменты (репарации / репликации / ретардации / лигирования / рестрикции) ДНК восстанавливают образующийся разрыв с формированием мутаций в виде делеций или инсерций.</p> <p>Ответ: выключения заранее выбранных генов; комплементарной; белок,</p>

	фермент, нуклеаза; разрезание; расщепление; репарации.
143	<p>В результате разрезания плазмиды pBR322 (длина 4361 п.н.) рестриктазой AccBSII образовались два фрагмента длиной 2560 п.н. и 1801 п.н. Определите массу фрагмента длиной 1801 п.н., если известно, что масса исходной плазмиды составляла 1000 нг. Ответ округлите до целого числа. Пояснения к ответу: Следует соотнести длину фрагмента и массу исходной плазмиды</p> <p>Ответ: 413</p>
144	<p>Полимеразная цепная реакция является исключительно важным современным методом молекулярной биологии. Для амплификации участка ДНК методом ПЦР требуется заказать прямой и обратный праймер. Ген PAX6 относят к семейству генов PAX, которые кодируют тканеспецифичные факторы транскрипции. Мутации в данном гене приводят к нарушениям строения органов зрения. Ортолог (гомолог) данного гена у дрозофилы называется eiless. Последовательность данного гена в базе данных GeneBank имеет идентификатор NG_008679.1 Последовательность праймеров принято записывать от 5'-конца к 3'-концу. Определите последовательность прямого праймера длиной 20 нуклеотидов, если в качестве обратного праймера был использован следующий олигонуклеотид 5'-CCTAGGCCGCCGAGAGGGCT-3', и известно, что длина ПЦРфрагмента равна 210 пар нуклеотидов. Введите последовательность прямого праймера латинскими буквами, без знаков 5'-, 3'-, и пробелов. Пояснения к ответу: Необходимо открыть последовательность гена в базе NCBI, найти последовательность, соответствующую обратному, вычислить последовательность, соответствующую прямому праймеру.</p> <p>Ответ: GAGCTCGGAAGGGCCTAGT</p>
145	<p>Выработайте стратегию редактирования гена CCR5 для выработки устойчивости в ВИЧ-инфекции. Ответьте на вопросы:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Можно ли целенаправленно внести изменения в нужную часть гена? 2. Как называется наиболее эффективная система геномного редактирования? 3. Какая часть этой системы позволяет найти нужный участок генома? 4. Какая часть является молекулярными ножницами, разрезающими ДНК? 5. Реально ли провести редактирование генома и получить генномодифицированных людей в настоящее время? <p>Ответ: 1. Да 2. CRISPR/Cas9 3. Гидовая РНК – CRISPR 4. Фермент Cas9 5. Да</p>

Критерии и шкалы оценки:

- **оценка «зачтено»** выставляется студенту, если домашнее задание является самостоятельным, оригинальным текстом, в котором прослеживается авторская позиция, продуманная система аргументов, а также наличествует обоснованные выводы; используются термины, понятия по дисциплине, в рамках которой выполняется работа; полностью соответствует выбранной теме, цели и задачам; текст домашнего задания логически выстроен, имеет четкую структуру; работа соответствует всем техническим требованиям; домашнее задание выполнено в установленный срок.

- **оценка «не зачтено»**, выставляется студенту, если домашнее задание не является самостоятельным, оригинальным текстом, в котором не прослеживается авторская позиция, не продумана система аргументов, а также отсутствуют обоснованные выводы; не используются термины, понятия по дисциплине, в рамках которой выполняется работа; не соответствует выбранной теме, цели и задачам; текст домашнего задания композиционно не выстроен; работа не соответствует техническим требованиям; домашнее задание не выполнено в установленный срок.

4. Методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности

Процедуры оценивания в ходе изучения дисциплины знаний, умений и навыков, характеризующих этапы формирования компетенций, регламентируются положениями:

- П ВГУИТ 2.4.03 Положение о курсовых экзаменах и зачетах;
- П ВГУИТ 4.1.02 Положение о рейтинговой оценке текущей успеваемости.

Для оценки знаний, умений, навыков обучающихся по дисциплине применяется рейтинговая система. Итоговая оценка по дисциплине определяется на основании определения среднеарифметического значения баллов по каждому заданию.

Зачет по дисциплине выставляется в зачетную ведомость по результатам работы в семестре после выполнения всех видов учебной работы, предусмотренных рабочей программой дисциплины (с отметкой «зачтено») и получении по результатам тестирования по всем разделам дисциплины не менее 60 %.

5. Описание показателей и критериев оценивания компетенций на различных этапах их формирования, описание шкал оценивания для каждого результата обучения по дисциплине

Результаты обучения по этапам формирования компетенций	Предмет оценки (продукт или процесс)	Показатель оценивания	Критерии оценивания сформированности компетенций	Шкала оценивания	
				Академическая оценка или баллы	Уровень освоения компетенции
ПКв-5 способен применять знания и навыки в области разработки и применения генетических технологий, в том числе геномного редактирования					
Знает:	Знать способы использования специальных и постоянно развивающихся новых разделов генетики и генетических технологий, в том числе геномного редактирования, для решения научно-исследовательских и прикладных задач	Знать способы использования специальных и постоянно развивающихся новых разделов генетики и генетических технологий, в том числе геномного редактирования, для решения научно-исследовательских и прикладных задач	Доля правильных ответов при тестировании более 60 %	Зачтено	Освоена (повышенный / базовый)
			Доля правильных ответов при тестировании менее 60 %	Не зачтено	Не освоена (недостаточный)
	Ответ на зачете	Правильность ответов	Обучающийся более или менее полно ответил на вопросы зачета	Зачтено	Освоена на повышенном / базовом уровне
			Обучающийся ответил не на все вопросы, допустил много ошибок	Не зачтено	не освоена (недостаточный уровень)
Умеет:	Защита практической работы	Уметь применять методы геномного, в том числе, метагеномного, транскриптомного, протеомного, метаболомного и биоинформатического анализа, создавать экспериментальные модели профессиональных задач, работать с микроорганизмами; применять современные методы генетических технологий, в том числе геномного редактирования, в практической деятельности; разрабатывать и внедрять в практику новые методы генетических технологий в сфере пищевой индустрии, основанные на современных перспективных	Работа выполнена в полном объеме, вовремя представлена на проверку. Ошибки при выполнении работы отсутствуют	Зачтено	Освоена на повышенном / базовом уровне
			Работа выполнена не полностью. Не представлена на практическом занятии	Не зачтено	не освоена (недостаточный уровень)

		разработках в области генетики и экспериментальной биологии			
Владеет:	Домашнее задание	Демонстрировать знаниями законодательства и нормативной документации РФ об ограничениях и границах применимости моделей и интерпретации полученных результатов	Работа выполнена в полном объеме, вовремя представлена на проверку. Ошибки при выполнении работы отсутствуют	Зачтено	Освоена на повышенном / базовом уровне
			Работа выполнена не полностью. Не представлена на практическом занятии	Не зачтено	не освоена (недостаточный уровень)