

Министерство образования Республики Беларусь
Белорусский государственный университет
Биологический факультет
Кафедра микробиологии

СОГЛАСОВАНО

Заведующий кафедрой

Прокулевич В.А.

«20» марта 2020 г.

СОГЛАСОВАНО

Декан факультета

Демидчик В.В.

«29» апреля 2020 г.

СОГЛАСОВАНО

Председатель

учебно-методической комиссии факультета

Поликсенова В.Д.

«29» апреля 2020 г.

Векторные системы

Электронный учебно-методический комплекс
для специальностей:

1-31 01 01-03 «Биология (Биотехнология)»;

1-31 01 03 «Микробиология»

Регистрационный 2.4.2-12/113

Автор:

Титок Марина Алексеевна, доктор биологических наук, профессор

Рассмотрено и утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ
07.12.2020 г., протокол № 2.

Минск 2020

УДК 579.25(075.8)
Т 454

Утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ.
Протокол № 2 от 07.12.2020 г.

Решение о депонировании вынес:
Совет биологического факультета
Протокол № 12 от 29.04.2020 г.

А в т о р:

Титок Марина Алексеевна, доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры микробиологии биологического факультета

Рецензенты:

Валентович Л. Н., кандидат биологических наук, доцент, ГНУ «Институт
микробиологии НАН Беларуси»;

Леонтьев В. Н., кандидат химических наук, доцент, Учреждение
образования «Белорусский государственный технологический университет».

Титок, М. А. Векторные системы : электронный учебно-методический
комплекс для специальностей: 1-31 01 01-03 «Биология (Биотехнология)», 1-31
01 03 «Микробиология» / М. А. Титок ; БГУ, Биологический фак., Каф.
микробиологии. – Минск : БГУ, 2020. – 45 с. – Библиогр.: с. 44–45.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для
студентов специальностей 1-31 01 01-03 «Биология (Биотехнология)», 1-31 01
03 «Микробиология». Содержание ЭУМК предполагает изучение особенностей
организации и функционирования генетического материала про- и
эукариотических организмов, основных методов работы с молекулами ДНК,
принципов создания векторных молекул на основе природных плазмид и
вирусов и их использование в геномной инженерии для изучения тонких
механизмов экспрессии генов и создания генно-модифицированных клеток и
организмов.

СОДЕРЖАНИЕ

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА	4
1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	8
1.1. Генетическая инженерия в природе. Принципы создания рекомбинантной ДНК.	8
1.2. Особенности экспрессии генов в клетках про- и эукариот.....	8
1.2. Методы генетической инженерии.....	8
1.3. Векторные системы бактерий.....	9
1.4. Векторы для клонирования в эукариотических клетках	10
2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ.....	13
2.1. Перечень тем и вопросов для подготовки к лабораторным занятиям:	13
Тема 1. Ферменты рестрикции.	13
Тема 2. Ферменты генетической инженерии.	14
Тема 3. Полимеразная цепная реакция. Секвенирование ДНК. Химический синтез ДНК.	15
Тема 4. Векторные системы для молекулярного клонирования в клетках прокариот.	15
Тема 5. Векторные системы для молекулярного клонирования в клетках эукариот.	16
3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ.....	19
3.1. Тесты для самоконтроля	19
3.2. Темы рефератов.....	40
Тема 1. Ферменты генетической инженерии.	40
Тема 2. Методы изоляции и анализа генов.	40
Тема 3. Векторные системы для молекулярного клонирования в клетках прокариот.	40
Тема 4. Векторные системы для молекулярного клонирования в клетках эукариот.	41
3.3. Вопросы для подготовки к экзамену	42
4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ	44
4.1. Рекомендуемая литература	44
4.2. Электронные ресурсы.....	44
4.3. Учебная программа.....	45

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) по учебной дисциплине «Векторные системы» создан в соответствии с требованиями Положения об учебно-методическом комплексе на уровне высшего образования и предназначен для студентов специальности 1-31 01 01-03 Биология (Биотехнология) и 1-31 01 03 Микробиология. Содержание разделов ЭУМК соответствует образовательному стандарту высшего образования данной специальности. Главная цель ЭУМК – оказание методической помощи студентам в систематизации учебного материала в процессе подготовки к итоговой аттестации по курсу «Векторные системы».

Структура ЭУМК включает:

Учебно-методическое обеспечение дисциплины.

1.1. Теоретический раздел (учебные пособия для теоретического изучения дисциплины в объеме, установленном учебным планом по специальности, а также материалы к лекциям, схемы и рисунки).

1.2. Практический раздел (материалы для проведения лабораторных занятий по дисциплине в соответствии с учебным планом).

2. Контроль самостоятельной работы студентов (материалы текущей и итоговой аттестации, позволяющие определить соответствие учебной деятельности обучающихся требованиям образовательного стандарта высшего образования и учебно-программной документации, в т.ч. вопросы для подготовки к экзамену, вопросы для самоконтроля, тематика рефератов и др.).

3. Вспомогательный раздел.

3.1. Учебно-программные материалы (учебная программа, учебная программа (рабочий вариант) для студентов дневной и заочной форм получения образования).

3.2. Информационно-аналитические материалы (список рекомендуемой литературы, перечень электронных образовательных ресурсов и их адреса и др.).

Работа с ЭУМК должна включать на первом этапе ознакомление с тематическим планом дисциплины, представленным в учебной программе. С помощью рабочего варианта учебной программы по дисциплине можно получить информацию о тематике лекций, перечнях рассматриваемых вопросов и рекомендуемой для их изучения литературы. Для подготовки к лабораторным занятиям и промежуточным зачетам необходимо, в первую очередь, использовать материалы, представленные в разделе учебно-методическое обеспечение дисциплины, а также материалы для текущего контроля самостоятельной работы. В ходе подготовки к экзамену рекомендуется ознакомиться с требованиями к компетенциям по дисциплине, изложенными в учебной программе, и перечнем вопросов к экзамену. Для написания рефератов могут быть использованы информационно-аналитические материалы, указанные в соответствующем разделе ЭУМК.

Современные биотехнологии, проникающие во все сферы практической деятельности человека (биофармацевтические препараты и биомедицина; биоматериалы промышленного назначения; агропищевая продукция; экологически безопасные технологии защиты окружающей среды от загрязнений природного и антропогенного происхождения; эффективное использование ресурсов Мирового океана) невозможны без использования методов генетической инженерии, которые позволяют изучить особенности организации генетического материала и тонкие механизмы, обеспечивающие его экспрессию в клетках организмов любого уровня организации. В то же время одинаковая химическая природа материала наследственности и одинаковые процессы, обеспечивающие его реализации и наследования в клетках про- и эукариот, лежат в основе переноса генов в природной среде обитания и в лабораторных условиях. Генетическая инженерия, изучая происходящие в естественной среде обитания процессы, использует их для создания клеток и организмов, способных качественно изменить уровень благосостояния человеческого общества. Достижения «красной», «белой», «зеленой», «серой» и «синей» биотехнологий призваны обеспечить человечество всем необходимым для его здоровья и благополучной жизни. При этом необходимо учитывать, что, несмотря на кажущуюся искусственность генно-модифицированных организмов, в основе их создания лежат естественные процессы, происходящие в природной среде. По мере развития наших знаний, генная инженерия все больше приближается к природным процессам, которые происходили на протяжении длительного времени и обеспечили появление абсолютно новых признаков и организмов разного уровня организации. В настоящее время манипуляции с отдельными генами требуют всесторонних знаний геномов, транскриптомов и метаболомов. Только такой подход позволит получить желаемый результат и использовать его в практической деятельности человека. В генетической инженерии для работы с отдельными генами необходимы системы их переноса в микробные, растительные и животные клетки. В природе такую функцию выполняют, мобильные генетические элементы, внехромосомные генетические элементы и вирусы. Знание механизмов их горизонтального и вертикального переноса абсолютно необходимо для понимания природных процессов, а также безопасного использования их в качестве векторов для молекулярного клонирования. В связи с вышесказанным, данный курс является основополагающим для студентов специальностей 1-31 01 01-03 Биология (Биотехнология) и 1-31 01 03 Микробиология, поскольку призван на основе знаний естественных процессов выработать научно-обоснованные подходы для развития биотехнологий в нашей стране. Целью настоящего курса является рассмотрение принципов организации векторных систем, использующихся для молекулярного клонирования чужеродного генетического материала в клетках про- и эукариотических организмов. Основная задача курса – получение студентами знаний об особенностях организации регуляторных и структурных участков генов про- и эукариотических организмов; особенностях генетической

организации внехромосомных генетических элементов (плазмид, бактериофагов и вирусов), использующихся для создания векторных систем; основных методических подходах, использующихся при создании рекомбинантных молекул ДНК; принципах создания векторных систем для молекулярного клонирования; методах введения векторных молекул в клетки про- и эукариотических организмов; достижениях генетической инженерии.

В результате изучения данной дисциплины студент должен знать особенности организации структурных и регуляторных элементов генетического материала про- и эукариотических организмов; особенности организации природных мобильных генетических элементов (транспозоны, плазмиды, вирусы, интегроны), а также процессы, обеспечивающие их копирование и перенос в клетки микроорганизмов, растений и животных; принципы и методы технологии рекомбинантных молекул ДНК (базовые репликоны, ферменты генетической инженерии, методы изоляции и анализа отдельных генов); основные достижения, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК. В результате освоения материала курса студент должен уметь использовать принципы и подходы для создания рекомбинантных молекул ДНК, правильно осуществлять выбор векторной системы для молекулярного клонирования; конструировать векторные молекулы ДНК, учитывая особенности организации структурных и регуляторных детерминант про- и эукариотических организмов. Помимо теоретических знаний студент должен освоить и овладеть методическими приемами для создания рекомбинантных молекул ДНК; принципиальными подходами для создания генно-модифицированных организмов. Для получения необходимых навыков студент должен освоить ряд компьютерных программ, позволяющих разрабатывать схемы экспериментальной работы.

Содержание курса базируется на знаниях, полученных в результате изучения смежных дисциплин биологического профиля («Генетика», «Микробиология», «Вирусология», «Биотехнология» и др.). Курс построен по блочно-модульному типу. Основные блоки (модули) выделены в соответствии с основными разделами курса. Содержание и объем учебного материала по каждому блоку позволяет студентам свободно ориентироваться в изучаемых вопросах. В качестве базовой учебной литературы предлагается учебник одного из ведущих мировых специалистов в области генетической инженерии профессора В.Н. Рыбчина «Основы генетической инженерии» (2-ое издание, переработанное и дополненное), монография профессора М.А. Титок «Плазмиды грамположительных бактерий» и изданные ею Методические указания к курсу «Векторные системы». Освоение данной учебной литературы, позволит студенту получить знания по всем разделам курса «Векторные системы» (размещена на образовательном портале БГУ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://edubio.bsu.by/course/view.php?id=7> – Дата доступа: 23.03.2020. Помимо вышеуказанных, студенты могут использовать ряд других учебников, написанных высококвалифицированными специалистами в области

генетической инженерии, приведенных в списке литературы к курсу «Векторные системы».

Особое внимание уделено самостоятельной работе студентов. Для этого, автором разработаны контрольные вопросы, позволяющие подготовиться к лабораторным занятиям. Составлен терминологический словарь по каждой теме, предполагающий изложение материала с использованием научной терминологии. Для быстрой проверки знаний составлены тесты по всем разделам курса. Приведен перечень рефератов, а также вопросы для подготовки к экзамену по курсу «Векторные системы».

1. На образовательном портале биологического факультета БГУ размещены программа и презентации к курсу «Векторные системы». [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://bio.bsu.by/microbio/kursy_vektornye_sistemy.html – Дата доступа: 23.03.2020.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Теоретический раздел включает нижеприведенные темы, раскрывающие содержание курса.

1.1. Генетическая инженерия в природе. Принципы создания рекомбинантной ДНК.

Горизонтальный перенос генов в природе как способ образования организмов с новыми свойствами. Достижения молекулярной биологии, лежащие в основе создания генно-инженерных конструкций. Основные свойства молекулы ДНК, обеспечивающие ее стабильное поддержание и реализацию наследственной информации в ряду поколений. Молекулярное клонирование как способ изучения структурной и функциональной организации генетической информации. Понятие вектора. Отличительные особенности векторных систем, пригодных для молекулярного клонирования. Принципы конструирования генно-модифицированных организмов.

1.2. Особенности экспрессии генов в клетках про- и эукариот

Сравнительный анализ геномов и отдельных генов вирусов, про- и эукариот. Особенности организации регуляторных последовательностей генов вирусов, про и эукариот (промоторы, терминаторы, операторы, энхансеры и сайленсеры). Характеристика РНК-полимераз. Регуляция транскрипции. Котранскрипционные и посттранскрипционные модификации РНК. Трансляция. Регуляция трансляции. Котрансляционные и посттрансляционные модификации белков. Системы секреции белков. Использование генной инженерии при создании искусственных генетических систем для экспрессии генов.

1.2. Методы генетической инженерии.

Методы выделения и очистки нуклеиновых кислот. Основные характеристики ферментов, используемых для создания рекомбинантных ДНК. Типы и характеристики систем рестрикции-модификации. Ферменты рестрикции (классификация, условия действия). Рестриктазы II типа как основные инструменты для создания рекомбинантных ДНК. Изо- и гетерошизомеры. Изменение специфичности действия рестриктаз. Изменение концов рестрикционных фрагментов ДНК. Другие ферменты генетической инженерии (лигазы, полимеразы, обратные транскриптазы, нуклеазы, фосфотазы и некоторые другие). Стратегия выделения генов. Полимеразная цепная реакция. Принципы и условия проведения. Проблемы, возникающие при проведении ПЦР (появление неспецифических продуктов ПЦР, низкий выход или полное отсутствие продуктов ПЦР). Разновидности полимеразной цепной реакции (стандартная, множественная, асимметричная, сопряженная с обратной транскрипцией, больших участков ДНК с высокой точностью, *in situ*,

аллель-специфическая, чувствительная к метилированию матрицы, ПЦР в реальном времени). Амплификация последовательностей с неизвестной первичной структурой. новых кислот, основанные на транскрипции, амплификация по типу катящегося кольца). Химический синтез гена.

Основные характеристики векторных систем. Понятие минимального репликона. Селективные маркеры, полилинкеры. Типы векторных систем (уни- и бирепликонные, мало и многокопийные). Специализированные векторные системы (для клонирования промоторов, экспрессии чужеродного генетического материала и др.) и вектора общего назначения. Копийность, емкость, структурная и сегрегационная стабильность.

1.3. Векторные системы бактерий

Внехромосомные генетические элементы грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Характерные особенности организации и плазмидных репликонов (системы инициации репликации, системы распределения плазмид между дочерними клетками в процессе деления). Репликация плазмид в соответствии с механизмом тета-типа, «разматывающегося рулона» и D-петли. Природные репликоны как основа для создания векторных молекул. Организация, преимущества и недостатки плазмиды лекарственной устойчивости pSC101 и фактора колициногенности -ColE при использовании в качестве векторов *E.coli*. Критерии, используемые при конструировании плазмидных векторов. Конструирование и структура «искусственных» векторов. Плазмиды pRSF2124 и pMB9 – первые искусственные векторы. Создание плазмиды pBR322. Характеристики pBR322, ее преимущества и недостатки. Вектора серии pUC, pET, pGMT, особенности организации сферы применения. Интегративные вектора, предназначенные для введения чужеродного генетического материала в состав бактериальной хромосомы (на примере pMUTIN).

Вирулентные фаги. Особенности организации и репликации нитевидных фагов (M13, fd, fl). Векторные системы на основе нитевидных фагов. Особенности организации фагмид (например, pBluescript). Сфера использования векторов, содержащих структурные элементы нитевидных фагов.

Свойства бактериофага лямбда как универсальной системы для клонирования *in vivo* и *in vitro*. Структурно-генетическая организация и биология фага лямбда. Репликация ДНК бактериофага лямбда. Молекулярные векторы на основе генома бактериофага лямбда. Векторы внедрения и векторы замещения. Клонирование емкости вектора. Космиды. Фазмиды. Конструирование библиотек и клонотек.

Отличительные особенности плазмид грамположительных бактерий, использующихся в качестве основы для создания векторных систем. Недостатки векторов, созданных на основе плазмид реплицирующихся в соответствии с механизмом «разматывающегося рулона».

Способы введения векторных молекул в клетки грамотрицательных и грамположительных бактерий (мобилизация, трансформация, трансфекция, электропорация).

1.4. Векторы для клонирования в эукариотических клетках

Генетическая организация внехромосомных генетических элементов дрожжей. Особенности организации векторных систем для молекулярного клонирования в клетках дрожжей (минимальные репликоны, селективные маркеры). Типы уни- и бирепликонных векторов. Введение ДНК в дрожжевые клетки.

Векторы для клонирования в растениях. Особенности молекулярной организации Ti-плазмид *Agrobacterium tumefaciens*. Структура T-ДНК. Принцип создания векторов на основе Ti-плазмид (уни- и бирепликонные вектора). Особенности организации регуляторных элементов, обеспечивающих экспрессию чужеродного материала в клетках растений. Методы введения векторов в клетки растений. Трансгенные растения, проблемы, достижения и перспективы.

Особенности организации вирусов и ретровирусов. Организация вируса SV40, векторные системы, созданные на его основе. Вектора на основе ретровирусов, особенности организации, сферы использования. Эспрессионные вектора, особенности организации регуляторных последовательностей. Селективные маркеры. Введение молекул ДНК в клетки млекопитающих.

Для освоения курса в качестве источников литературы рекомендуется:

1. Учебник В.Н. Рыбчин «Основы генетической инженерии» (2-ое издание, переработанное и дополненное), Изд-во СПбГТУ, 2002. – 522с.

1. Монография М.А. Титок «Плазмиды грамположительных бактерий», Изд-во БГУ, 2004. – 120 с.

1. Методические указания к курсу «Векторные системы» М.А. Титок «Введение в методологию рекомбинантной ДНК», Минск: БГУ, 2013. – 56 с.

В учебнике В.Н. Рыбчин «Основы генетической инженерии» детально рассмотрены вопросы, касающиеся организации генетического аппарата про- и эукариотических организмов (опероны, цистроны, мобильные генетические элементы); описаны особенности организации регуляторных систем, обеспечивающих экспрессию генетического материала в том числе, в чужеродном генетическом окружении (конститутивные, индуцибельные, гибридные промоторы, терминаторы, сайты связывания с рибосомой, интроны, сайты полиаденилирования, системы секреции белков) и системы экспрессии генетического материала в клетках про- и эукариот (системы транскрипции и трансляции); обсуждаются проблемы экспрессии чужеродного генетического материала на уровне молекул ДНК, РНК, посттрансляционной модификации белков и их транспорта за пределы клетки; приводится генетическая организация природных векторных молекул (плазмиды, бактериофаги, вирусы) и рассмотрены механизмы их наследования в клетках про- и эукариот; подробно описаны методы изоляции генов (принципы создания клонотек,

полимеразной цепной реакции, химического синтеза) и их анализа (секвенирование, рестрикционный анализ); приведена классификация векторных систем и принципы их конструирования (автономные и интегративные вектора, вектора общего и специального назначения, монорепликонные и бирепликонные вектора, плазмидные, вирусные и гибридные вектора), рассмотрены основные функциональные единицы, входящие в состав векторов для молекулярного клонирования в клетках про- и эукариот (репликоны, селективные маркеры, полилинкеры, репортерные гены); приведены принципы создания векторных молекул; рассмотрены принципы генно-инженерных подходов для решения фундаментальных проблем молекулярной биологии и генетики в создании продуцентов биологически активных препаратов для биотехнологии. В конце каждой главы приведены вопросы для повторения и обсуждения. В конце учебника приводится список литературы, а также словарь терминов.

В монографии М.А. Титок «Плазмиды грамположительных бактерий» рассматриваются молекулярные механизмы репликации природных плазмид тета-типа и «разматывающегося рулона», а также системы, обеспечивающие поддержания их в бактериальной клетке в определенном числе копий. Изложенный материал позволяет судить о структуре базовых репликонов, являющихся основой для создания векторных систем. Особое внимание уделяется внехромосомным генетическим элементам *Bacillus subtilis*, циркулирующих на территории Беларуси. Описана новая плаزمид тета-типа, и принцип создания на ее основе векторов для молекулярного клонирования. Приведенная информация представляет особую ценность, поскольку в биотехнологии и молекулярной генетике большое внимание уделяется грамположительным бактериям, способным продуцировать биологически активные соединения (используются при создании препаратов для стимуляции роста и развития растений и животных), деградировать ксенобиотики (используются в качестве основы препаратов для очистки окружающей среды), а также вызывать заболевания растений и животных (являются модельными объектами для изучения механизмов распространения генов антибиотикорезистентности).

В методических указаниях М.А. Титок «Введение в методологию рекомбинантной ДНК» рассматриваются основные методы работы с молекулами ДНК (выделение, очистка, электрофорез, ферменты рестрикции, полимеразная цепная реакция). Помимо описания методов, особое внимание уделяется основным принципам работы с молекулами ДНК. Каждый раздел содержит теоретическую часть, позволяющую студенту осмысленно планировать эксперименты, а также ориентироваться в потоке информации, представляемой фирмами-производителями реактивов для молекулярной биологии. Приведенные методы и подходы основаны на опыте автора, который указывает на ключевые моменты, знание которых необходимы для успешной экспериментальной работы.

2. Рекомендуемая литература размещена на образовательном портале БГУ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://edubio.bsu.by/course/view.php?id=7> – Дата доступа: 23.03.2020.

2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

2.1. Перечень тем и вопросов для подготовки к лабораторным занятиям:

Тема 1. Ферменты рестрикции.

1. Особенности организации и роль систем рестрикции-модификации в жизнедеятельности бактериальной клетки. Характеристика и отличительные особенности систем рестрикции-модификации I-IV типов.

2. Принцип классификации и основные свойства рестриктаз, используемых в генетической инженерии (сайты узнавания, сайты расщепления с образованием липких и тупых концов). Прототипы и изошизомеры и гетерошизомеры (неошизомеры).

3. Условия реакции рестрикции (буферная система, температура, концентрация фермента). Определение единицы активности фермента (коммерческие концентрации). Принципы двойной порезки с учетом буферной системы и температурного режима.

4. Осложнения, возникающие при реакции рестрикции («звездочная» активность). Нуклеотидное окружение сайта рестрикции. Форма скрученности ДНК. Метилирование сайтов рестрикции.

5. Методы определения концентрации ДНК (с использованием электрофореза и компьютерных программ, спектрофотометрический). Расчет концентрации ДНК.

6. Примеры сокращенных и графических обозначений для рестриктаз, используемых фирмами-производителями.

7. Принципы работы с сайтами фирм-производителей рестриктаз на примере Thermo Scientific (<https://www.thermofisher.com>). Освоение навыков работы с сайтом (в частности, использование программы DoubleDigest Calculator).

8. Составление реакционной смеси для рестрикции, исходя из исходной концентрации ДНК, буфера и рестриктазы с указанием времени и температуры реакции.

9. Освоение навыков записи последовательностей ДНК, образующихся в результате рестрикции, при указании знаком "↓" на положение гидролизуемых связей (тупой или выступающий 5'-, 3'-конец, количество выступающих нуклеотидов).

Терминологический словарь: Ферменты рестрикции и модификации, сайт узнавания, сайт расщепления, сайт рестрикции, тупые концы, выступающие 5'-концы, выступающие 3'-концы, прототип, изошизомер, гетерошизомер, неошизомер, «звездочная» активность, метилирование сайтов рестрикции, S-аденозилметионин, АТФ, ионы Mg^{2+} , обращенные палиндромы, вырожденные палиндромы, прерванные палиндромы, непалиндромы, альтернативные нуклеотиды, вырожденные нуклеотиды, штамм *E. coli* Dam⁻ и

Dcm⁻, штамм *E. coli* hsdR⁻, Pu – пурин, Py – пиримидин, номенклатура Смита и Натанса.

Тема 2. Ферменты генетической инженерии.

1. Функциональные особенности ДНК-лигаз бактерий *E. coli* и фага T4. Особенности протекания реакции лигирования (температура, время, концентрация фермента, состав буфера). Особенности хранения буфера для лигазы.

2. Особенности организации и функциональной активности ДНК-полимераза I *E. coli*, фрагмента Кленова и сферы их использования (никотиниация, заполнение нуклеотидами выступающих односторонних 5'-концов, введение радиоактивной или флуоресцирующей меток).

3. Функциональные особенности ДНК-полимеразы фага T4 и сферы ее использования (деградация выступающих односторонних 3'-концов, введение радиоактивной или флуоресцирующей меток).

4. Функциональные особенности ДНК-полимеразы фага T7 и сферы ее использования (секвеназы).

5. Функциональные особенности и сферы использования щелочных фосфатаз из клеток *E. coli* и кишечника телят для дефосфорилирования 5'P- и 3'P-концов в одно- и двусторонних молекулах ДНК или РНК.

6. Функциональные особенности и использование терминальной трансферазы из тимуса телят для создания на соединяемых фрагментах ДНК искусственных липких концов. Особенности реакции, протекающие с молекулами ДНК с тупыми или выступающими 3'- и 5'-концами.

7. Функциональные особенности и использование Taq-полимеразы, Vent и Deep Vent в полимеразной цепной реакции.

8. Функциональные особенности и использование РНК-зависимой ДНК-полимеразы в реакции обратной транскрипции. Особенности протекания реакции, праймеры для работы фермента.

9. Освоение навыков работы с инструкциями, прилагающимися к коммерческим ферментам для составления реакционных смесей с учетом концентрации компонентов реакции (ДНК-матрица, нуклеотиды, олигонуклеотиды, буферная система, фермент, хелатирующие, стабилизирующие и активирующие соединения и др.) с указанием условий проведения реакции (время, температура).

Терминологический словарь: ДНК-лигаза бактерий *E. coli*, ДНК-лигаза фага T4, ДНК-полимераза I *E. coli*, фрагмент Кленова, ДНК-полимераза фага T4, ДНК-полимераза фага T7, секвенаса, терминальная трансфераза, Taq-полимераза, Vent-полимераза, Deep Vent-полимераза, РНК-зависимая ДНК-полимераза.

Тема 3. Полимеразная цепная реакция. Секвенирование ДНК. Химический синтез ДНК.

1. Принцип и условия проведения ПЦР. Характеристика праймеров для ПЦР (размер, состав, наличие комплементарных последовательностей), типы последовательностей ДНК, добавляемых к 5'-концам праймера (сайты рестрикции, сайты связывания с рибосомой, промоторы, терминаторы и др). Возможности ПЦР (заякоренная ПЦР, инвертированная ПЦР, Alu-ПЦР, «перекрывающаяся» ПЦР для мутагенеза и синтеза генов и др). Ингибиторы ПЦР, реагенты, повышающие специфичность ПЦР.

2. Освоение программ для поиска и анализа праймеров. В частности, программы SnapGene, Primer-BLAST (сайт: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), олигокалькулятора (сайт: <http://bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>). Принцип подготовки праймеров для реакции (разведение до оптимальных концентраций).

3. Освоение навыков в составлении реакционных смесей с учетом концентрации компонентов реакции (ДНК-матрица, нуклеотиды, олигонуклеотиды, буферная система, фермент) и количеством используемых матриц ДНК.

4. Освоение навыков в составлении режимов ПЦР в зависимости от размера матрицы, температуры отжига праймера, скорости полимеразной реакции. Знакомство с работой амплификатора (программирование режима ПЦР).

5. Одномоментное и поэтапное секвенирование. Методы секвенирования ДНК с использованием полимеразной реакции (Сенгера, Illumina). Характеристика методов, сферы использования.

6. Химический синтез ДНК. Фосфорамидитный метод, суть метода, сферы использования.

Терминологический словарь: праймер, олигонуклеотид, матрица, заякоренная ПЦР, инвертированная ПЦР, Alu-ПЦР, «перекрывающаяся» ПЦР, температуры отжига праймера, термостойкая полимеразы, режим амплификации, амплификатор, дидезоксинуклеотид, адаптер, мостиковая амплификация, фосфорамидит, диметокситритильная группа (ДМТ), диизопропиламинная группа, 3'-фосфитная группа, бензольная группа, изобутирильная группа, тетразол, детритилирование, кэппирование, фосфиттриэфирная связь.

Тема 4. Векторные системы для молекулярного клонирования в клетках прокариот.

1. Принципы создания генно-модифицированных бактерий. Выбор вектора (плазмидный, вирусный, гибридный; автономно реплицирующийся, интегративный; мало и многокопийный). Анализ изолируемого гена (выбор промотора, терминатора, сайта связывания с рибосомой, анализ состава

кодонов). Способы изоляции гена (с помощью ферментов рестрикции, с использованием ПЦР, путем химического синтеза).

2. Характеристика векторов (общего назначения, для секвенирования, для мутагенеза, для клонирования регуляторных последовательностей и продуктов ПЦР, для экспрессии чужеродного генетического материала).

3. Механизм репликации ColE1-репликона. Базовый репликон. Типы экспрессионных кассет. Способы отбора рекомбинантной ДНК (прямой, косвенный). Генетическая организация векторов pBR322, pACYC177, pUC18/pUC19, pTZ57R/T, pJET1.2/blunt, pMUTIN, pET-28a(+). Освоение программы SnapGene для встраивания рестрикционных фрагментов и продуктов ПЦР в состав векторов с последующим рестрикционным и электрофоретическим анализом гибридных конструкций. Получение навыков работы с реперными молекулами. Знакомство с типами реперов, способов их приготовления, внесением в гель для электрофореза и последующего электрофоретического анализа (линейные и кольцевые реперы).

4. Принципы выделения и очистки ДНК из клеток бактерий (щелочной метод, метод кипячения).

5. Механизм репликации фага M13 и фага λ . Вектора на основе фага M13, преимущества и недостатки. Вектора на основе фага λ (вектора внедрения, хароны, вектора замещения). Минимальная и максимальная емкость вектора на основе фага λ . Сферы использования векторов на основе фага λ .

6. Принцип организации гибридных векторов (фазмиды, космиды, фагмиды). Примеры, сферы использования.

7. Способы введения векторов в клетки бактерий (конъюгация, трансфекция, трансформация, электропорация).

Терминологический словарь: промотор, терминатор, сайта связывания с рибосомой, последовательность Шайн-Дальгарно, RBS-сайт, открытая рамка считывания, кодоновый состав, оптимизация кодонового состава, конъюгация, трансфекция, трансформация, электропорация репер, минимальная емкость вектора, максимальная емкость вектора, фазмиды, космиды, фагмиды, полилинкер, репликон, экспрессионная кассета, «бело-голубой» тест, непрямой отбор вставок ДНК, «красная» биотехнология, «белая» биотехнология, «зеленая» биотехнология, «серая» биотехнология, «синяя» биотехнология.

Тема 5. Векторные системы для молекулярного клонирования в клетках эукариот.

1. Принципы создания генно-модифицированных растительных и животных клеток, генно-модифицированных растений и животных (половые и соматические клетки). Выбор вектора (вирусный, гибридный; автономно реплицирующийся, интегративный). Анализ изолируемого гена (выбор промотора, интрона, энхансера, сайта окружающего старт-кодон, сайт полиаденилирования, анализ состава кодонов). Способы изоляции гена (с

использованием ПЦР, реакции обратной транскрипции, путем химического синтеза).

2. Особенности организации T-ДНК и *vir*-локуса. Ti-плазмид *A. tumefaciens*. Механизм переноса T-ДНК в клетки растений. Принцип создания векторов на основе Ti-плазмид *A. tumefaciens* (коинтегративные, бирепликонные). Промоторы и селективные маркеры, используемые в векторах для клонирования в клетках растений. Методы введения векторов в клетки растений (бактериальная трансформация, трансформация протопластов, баллистический, агробаллистический).

3. Направления в генетической инженерии животных (трансгенные животные, генная терапия, продуценты биологически активных соединений). Генетическая организация вируса SV40 и принцип векторов на его основе (вирусные и гибридные вектора, пакующие клетки). Организация экспрессионных кассет в векторных системах для животных и способы достижения высокого уровня экспрессии чужеродных генов в животных клетках. Селективные и репортерные маркеры, используемые в векторах животных.

4. Генетическая организация вируса осповакцины и цикл его развития в клетках животных. Принцип создания векторов на его основе. Встраивание чужеродного материала в локус, кодирующий синтез тимидинкиназы (усовершенствованные вектора с добавлением репортерных генов *lacZ* и *lux*, кодирующих β-галактозидазу и люциферазу соответственно), в локус *vp37*, определяющий образование бляшек при его росте в культуре животных клеток. Использование в качестве селективного маркера гена *gpt* (определяет синтез ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы), позволяющего вводить несколько чужеродных генов в состав вируса осповакцины. Подходы для создания «ослабленных» вакцин.

5. Стадии развития ретровирусов в животной клетке (спектр хозяев гамма- и лентивирусов). Организация гамма- и лентивирусов с указанием функционально значимых детерминант. Принцип создания векторов на основе ретровирусов. «Пакующие» клеточные линии для отбора гибридных конструкций на основе гамма- и лентивирусных векторов. Принцип создания векторов для экспрессии чужеродного гена в определенном типе клеток (псевдотипирование ретровируса, тканеспецифичные промоторы). Вектора на основе ретровирусов для встраивания в определенные участки генома, либо поддержания вне хромосомы. Особенности генной терапии *ex vivo* и *in vivo*. «Идеальный» вектор на основе ретровируса. Способы введения векторов в клетки животных (микроинъекция, инфицирование, кальций-фосфатный метод, ДЕАЕ-декстрановый метод, электропорация, слияние протопластов).

Терминологический словарь: интрон, энхансер, окружение старт-кодона, сайт полиаденилирования, Ti-плазида, T-ДНК, *vir*-локус, аденин фосфорибозилтрансфераза (APRT), гипоксантин гуанин фосфорибозилтрансфераза (HGPRT), тимидинкиназа (ТК), ксантин гуанин

фосфорибозилтрансфераза (XGPRT), дегидрофолатредуктаза (протопласты, баллистический метод, агробаллистический метод, пакующие клетки, гамма-ретровирус, лентивирус, псевдотипирование ретровируса, генной терапии *ex vivo*, генной терапии *in vivo*, микроинъекция, активатор трансляции клеточной РНК (ген *tat*), транспорт мРНК вируса в цитоплазму (ген *rev*), ген для репликации вируса в культуре лимфоцитов (ген *nef*), фактор инфекционности (ген *vif*), созревание вирусных гликопротеинов (ген *vpr*), активатор транскрипции (ген *vpr*), репликация в Т-лимфоцитах и макрофагах (ген *vpx*).

3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

3.1. Тесты для самоконтроля

1. Для функциональной активности какой системы рестрикции-модификации не требуется присутствие АТФ?

- A. I типа
- B. II типа
- C. III типа
- D. IV типа

2. В какой из систем рестрикции-модификации для связывания рестриктазы с сайтом узнавания не требуется функционально активной метилазы?

- A. I типа
- B. II типа
- C. III типа
- D. IV типа

3. Для функциональной активности какой системы рестрикции-модификации требуется присутствие S-аденозилметионина?

- A. I типа
- B. II типа
- C. III типа
- D. IV типа

4. Способность к специфическому связыванию с ДНК присуща только метилазе для системы рестрикции-модификации

- A. I типа
- B. II типа
- C. III типа
- D. IV типа

5. Сайт узнавания 5'-TGGCCA-3' для рестриктазы *BalI* является:

- A. Палиндромом
- B. Прерванным палиндромом
- C. Вырожденным палиндромом
- D. Непалиндромом

6. Сайт узнавания 5'-CMGCKG-3' для рестриктазы *MspA* является:

- A. Палиндромом
- B. Прерванным палиндромом
- C. Вырожденным палиндромом
- D. Непалиндромом

7. Сайт узнавания 5'-GGCCN₅GGCC-3' для рестриктазы *Sfi*I является:

- A. Палиндромом
- B. Прерванным палиндромом
- C. Вырожденным палиндромом
- D. Непалиндромом

8. Сайт узнавания 5'-CAGCCGGTCCG-3' для рестриктазы *Sgr*AI является:

- A. Палиндромом
- B. Прерванным палиндромом
- C. Вырожденным палиндромом
- D. Непалиндромом

9. При разрезании сайта узнавания G↓AATTC (знак "↓" указывает на положение гидролизуемых связей) образуется:

- A. Выступающий 5'-конец
- B. Выступающий 3'-конец
- C. Тупой конец
- D. Липкий конец

10. При разрезании сайта узнавания CTGCA↓G (знак "↓" указывает на положение гидролизуемых связей) образуется:

- A. Выступающий 5'-конец
- B. Выступающий 3'-конец
- C. Тупой конец
- D. Липкий конец

11. При разрезании сайта узнавания CCC↓GGG (знак "↓" указывает на положение гидролизуемых связей) образуется:

- A. Выступающий 5'-конец
- B. Выступающий 3'-конец
- C. Тупой конец
- D. Липкий конец

12. При разрезании сайта узнавания CCC↓GGG (знак "↓" указывает на положение гидролизуемых связей) образуется:

- A. Выступающий 5'-конец
- B. Выступающий 3'-конец
- C. Тупой конец
- D. Липкий конец

13. При разрезании сайта узнавания GACGC(5/10) образуется:

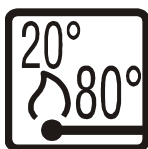
- A. Выступающий 5'-конец
- B. Выступающий 3'-конец
- C. Тупой конец
- D. Липкий конец

14. Рестриктазы *Asp7181* (5'-G↓GTACC-3') и *KpnI* (5'-GGTAC↓C-3') (знак "↓" указывает на положение гидролизуемых связей) являются:

- A. Изошизомеры;
- B. Прототипы;
- C. Гетерошизомеры;
- D. Неошизомеры.

15. За единицу активности (1 ед.) принимается количество рестриктазы, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч при рекомендуемых условиях. Типичную реакцию рестрикции (ферментативный гидролиз ДНК) ведут в объеме 20 мкл, используя 0,1-1 мкг ДНК и 1 ед. фермента. Сколько рестриктазы (в мкл) необходимо добавить на одну реакцию при ее исходной концентрации 10 ед/мкл:

- A. 1 мкл;
- B. 0,1 мкл;
- C. 0,2 мкл;
- D. 10 мкл.



16. Что означает знак , приведенный при описании рестриктазы:

- A. Рестриктазу можно инактивировать при 80 °С в течение 20 минут
- B. Рестриктазу можно инактивировать при 20 °С в течение 80 минут
- C. Температурный режим для рестрикции
- D. Для работы рестриктазы требуется присутствие в реакционной среде S-аденозилметионина.

17. При каких условиях наблюдается «звездочная» активность рестриктазы:

- A. При избытке рестриктазы;
- B. При изменении рН буфера;
- C. При замене ионов магния на ионы марганца;
- D. В присутствии 12—20 % глицерина.

18. ДНК млекопитающих и высших растений часто содержит остатки 5-метилцитозина в CG-последовательностях. Такая ДНК не расщепляется рестриктазами, которые имеют подобные последовательности в сайтах узнавания и чувствительны к такому характеру метилирования. К ним относятся, например, сайт узнавания для рестриктазы *HhaI* (5'-GCGC-3'). Как разрезать такой сайт:

- A. Использовать изошизомер рестриктазы *HhaI*, если он не чувствителен к такому характеру метилирования;
- B. Использовать клетки *E.coli* Dcm⁻, в которые внести, а затем выделить анализируемую ДНК;
- C. Использовать клетки *E.coli* Dam⁻, в которые внести, а затем выделить анализируемую ДНК;
- D. Добавить рестриктазу *HhaI* в десятикратной концентрации.

19. Какие преимущества имеет лигаза фага T4 относительно лигазы *E.coli*?

- A. Никаких;
- B. Сшивает «тупые» концы;
- C. Используется в меньшей концентрации;
- D. На процесс лигирования не влияет температура.

20. Для ник-трансляции используют:

- A. ДНК-полимеразу I;
- B. Фрагмент Кленова;
- C. ДНК-полимеразу фага T4;
- D. Таq-полимеразу.

21. Для превращения выступающих 5'-концов, образующихся под действием рестриктазы, в «тупые» используют:

- A. ДНК-полимеразу I;
- B. Фрагмент Кленова;
- C. ДНК-полимеразу фага T4;
- D. Таq-полимеразу.

22. Для превращения выступающих 3'-концов, образующихся под действием рестриктазы, в «тупые» используют:

- A. ДНК-полимеразу I;
- B. Фрагмент Кленова;
- C. ДНК-полимеразу фага T4;
- D. Taq-полимеразу.

23. Какие модификации осуществляют с ДНК-полимеразой фага T7 при использовании ее в качестве секвеназы:

- A. Подавляют экзонуклеазную активность;
- B. Увеличивают процессивность;
- C. Увеличивают экзонуклеазную активность;
- D. Увеличивают скорость синтеза ДНК.

24. Taq-полимераза сохраняет половину своей активности при .

- A. При 95 °C в течение 1 часа;
- B. При 95 °C в течение 7 часов;
- C. При 95 °C в течение трех часов;
- D. При 95 °C в течение 23 часов.

25. Vent-полимераза сохраняет половину своей активности при .

- A. При 95 °C в течение 1 часа;
- B. При 95 °C в течение 7 часов;
- C. При 95 °C в течение трех часов;
- D. При 95 °C в течение 23 часов.

26. Deep Vent-полимераза сохраняет половину своей активности при .

- A. При 95 °C в течение 1 часа;
- B. При 95 °C в течение 7 часов;
- C. При 95 °C в течение трех часов;
- D. При 95 °C в течение 23 часов.

27. Какие концы образуются у продуктов амплификации при использовании Taq-полимеразы?

- A. Выступающие липкие 5'-концы;
- B. Выступающие липкие 3'-концы;
- C. «Тупые» концы;
- D. 3'-конец с выступающим остатком аденина.

28. Какие концы образуются у продуктов амплификации при использовании Vent-полимеразы?

- A. Выступающие липкие 5'-концы;
- B. Выступающие липкие 3'-концы;
- C. «Тупые» концы;
- D. 3'-конец с выступающим остатком аденина.

29. Какие концы образуются у продуктов амплификации при использовании Deep Vent -полимеразы?

- A. Выступающие липкие 5'-концы;
- B. Выступающие липкие 3'-концы;
- C. «Тупые» концы;
- D. 3'-конец с выступающим остатком аденина.

30. Для обратной транскриптазы использует в качестве матрицы:

- A. Цитоплазматическую мРНК;
- B. Ядерную мРНК;
- C. Тотальную ДНК;
- D. Продукты амплификации ядерной ДНК.

31. Отличия щелочной фосфатазы из кишечника теленка от щелочной фосфатазы из клеток *E. coli* состоит:

- A. Она термостабильна;
- B. Она инактивируется при 68°C;
- C. Дефосфорилирует 5'P-концы;
- D. Дефосфорилирует 3'P-концы.

32. Щелочную фосфатазу используют после порезки вектора:

- A. По уникальному сайту с выступающими 5'-концами;
- B. По уникальному сайту с выступающими 3'-концами;
- C. По уникальному сайту с «тупыми» концами;
- D. При порезке двумя рестриктазами.

33. Терминальную трансферазу используют:

- A. Для создания на соединяемых фрагментах ДНК искусственных липких концов;
- B. Для образования выступающих 3'-концов;
- C. Для образования выступающих 5'-концов;

D. Для образования «тупых» концов.

34. Дидезоксинуклеотиды в реакции секвенирования используют:

- A. Для остановки полимеразной реакции;
- B. Для образования выступающих 3'-концов;
- C. Для образования выступающих 5'-концов;
- D. Для внесения метки в синтезируемую ДНК.

35. В результате мостиковой амплификации по методу Illumina образуется:

- A. Кластер одинаковых одноцепочечных фрагментов ДНК в одной ориентации;
- B. Кластер одинаковых одноцепочечных фрагментов ДНК в разной ориентации;
- C. Кластер одинаковых двухцепочечных фрагментов ДНК с выступающими 5'-концами;
- D. Кластер одинаковых двухцепочечных фрагментов ДНК с выступающими 3'-концами;

36. Нарастивание цепочки ДНК при химическом синтезе происходит в направлении:

- A. От 5'→3';
- B. От 3'→5';
- C. С образованием свободных 5'-концов;
- D. С образованием свободных 3'-концов.

37. При химическом синтезе с помощью трихлоруксусной кислоты (ТХУ) отщепляют ДМТ от нуклеотида (детритилирование) с целью:

- A. Образования реакционно способного 5'-конца с ОН-группой;
- B. Образования реакционно способного 3'-конца с ОН-группой;
- C. Образования реакционно способного 5'-конца с Р-группой;
- D. Образования реакционно способного 3'-конца с Р-группой.

38. Тетразол добавляют в реакционную смесь при химическом синтезе с целью:

- A. Образования ковалентной связи между 3'-фосфитной группой добавленного нуклеотида и 5'-гидроксильной группой прикрепленного нуклеотида;
- B. Образования ковалентной связи между 3'-фосфатной группой добавленного нуклеотида и 5'-гидроксильной группой прикрепленного нуклеотида;

С. Образования ковалентной связи между 5'-фосфатной группой добавленного нуклеотида и 3'-гидроксильной группой прикрепленного нуклеотида;

Д. Образования ковалентной связи между 5'-фосфитной группой добавленного нуклеотида и 3'-гидроксильной группой прикрепленного нуклеотида.

39. Базовый репликон это:

А. Синоним внехромосомного генетического элемента (плазмиды);

В. Минимальная область плазмиды, обеспечивающая ее поддержание в бактериальной клетке;

С. Область плазмиды, обеспечивающая ее распределение между дочерними клетками в процессе деления;

Д. Область плазмиды, обеспечивающая ее горизонтальный перенос.

40. Для репликации плазмиды ColE1 основной функциональной единицей является:

А. *oriV*;

В. *oriV* и прилегающий фрагмент размером 550 п.н., транскрипция которого обеспечивает образования затравки для копирования;

С. Антисмысловая РНК;

Д. Rom-белок

41. Регуляция репликации плазмиды ColE1 осуществляется:

А. Антисмысловой РНК;

В. Антисмысловой РНК и Rom-белком;

С. За счет определенной структуры 5'-конца РНК затравки;

Д. Путем гибридизации РНК затравки с областью *oriV*.

42. Почему базовый репликон плазмиды ColE1 является оптимальной основой для создания векторных систем?

А. Имеет небольшой размер;

В. Является многокопийным;

С. Не содержит сайтов рестрикции для целого ряда рестриктаз;

Д. Способен передаваться путем мобилизации.

43. Какой тип отбора используют для вектора pBR322, содержащего фрагмент чужеродного генетического материала?

- А. Прямую селекцию при встраивании чужой ДНК в ген ампициллинрезистентности;
- В. Непрямую селекцию при встраивании чужой ДНК в ген тетрациклинрезистентности;
- С. Прямую селекцию при встраивании чужой ДНК в ген тетрациклинрезистентности;
- Д. Непрямую селекцию при встраивании чужой ДНК в ген ампициллинрезистентности.

44. Каким образом можно клонировать и селектировать вставки чужеродных промоторов в векторе pBR322?

- А. При встраивании в ген ампициллинрезистентности;
- В. При встраивании в ген тетрациклинрезистентности;
- С. При встраивании в промоторную область гена тетрациклинрезистентности;
- Д. При встраивании в межгенную область.

45. Назовите отличия вектора pUC18/19 от вектора pBR322.

- А. Наличием одного гена антибиотикорезистентности;
- В. Отсутствует ген, кодирующий Rom-белок;
- С. Наличием полилинкера;
- Д. Способом отбора плазмид, содержащих чужеродную ДНК.

46. Укажите происхождение экспрессионной кассеты в векторе pUC18/19.

- А. Лас-оперон бактерий *E. coli*;
- В. Вектор на основе фага M13 (pUC118/119);
- С. Плазмида pBR322;
- Д. ColE1-репликон.

47. Синтез какого белка определяет ген *eco47IR* в составе вектора pJET1.2/blunt?

- А. Определяет устойчивость к антибиотику;
- В. Определяет синтез токсина;
- С. Определяет синтез гемолизина;
- Д. Определяет синтез белка инициации репликации.

48. Для чего используется вектор pJET1.2/blunt?

- А. Для встраивания фрагментов рестрикции;

В. Для встраивания продуктов ПЦР, полученных с помощью Taq-полимеразы;

С. Для встраивания продуктов ПЦР, полученных с помощью Vent-полимеразы;

Д. Для встраивания фрагментов ДНК с выступающими 3'-концами.

49. Для чего используется вектор pTZ57R/T?

А. Для встраивания фрагментов рестрикции;

В. Для встраивания продуктов ПЦР, полученных с помощью Taq-полимеразы;

С. Для встраивания продуктов ПЦР, полученных с помощью Vent-полимеразы;

Д. Для встраивания фрагментов ДНК с выступающими 3'-концами.

50. Чем отличаются между собой вектора pTZ57R/T и pJET1.2/blunt?

А. Селективным маркером;

В. Эффективностью отбора рекомбинантной ДНК;

С. Копийностью;

Д. Стабильностью поддержания в бактериальной клетке.

51. Для чего используется вектор pMUTIN?

А. Для направленной инактивации генов бактерий *E. coli*;

В. Для направленной инактивации генов бактерий *B. subtilis*;

С. Для изучения активности промоторов хромосомных генов (оперонов) бактерий *B. subtilis*;

Д. Для внесения чужеродных генов в клетки бактерий *B. subtilis*.

52. При введении вектора pET-28a(+) с клонированным геном в клетки *E. coli*, какой белок можно получить,

А. Целевой;

В. Гибридный;

С. Меченный;

Д. Без функциональной активности.

53. Укажите основную функциональную часть T-ДНК, необходимую для встраивания чужих генов в геном растения.

А. Промотор гена, определяющего синтез опина;

В. Инвертированные повторы;

С. Vir-локус;

D. Гены, детерминирующие синтез фитогормонов.

54. Почему для изоляции генов эукариот в большинстве случаев нельзя использовать ПЦР?

- A. Отсутствует RBS-сайт;
- B. Кодоновый состав, не обеспечивает эффективную трансляцию;
- C. В силу мозаичной структуры генов;
- D. Отсутствует терминатор транскрипции.

55. Какие функционально значимые гены в геноме Ti-плазмид индуцируются в присутствии фенольных соединений?

- A. Гены, детерминирующие синтез опинов;
- B. Гены, детерминирующие катаболизм опинов;
- C. Гены, входящие в состав *vir*-локуса;
- D. Гены, детерминирующие конъюгационный перенос.

56. Какие функционально значимые гены в геноме Ti-плазмид индуцируются в присутствии фенольных соединений?

- A. Гены, детерминирующие синтез опинов;
- B. Гены, детерминирующие катаболизм опинов;
- C. Гены, входящие в состав *vir*-локуса;
- D. Гены, детерминирующие конъюгационный перенос Ti-плазмид.

57. Укажите функцию белка VirE2, синтез которого определяется геном *vir*-локуса.

- A. Обеспечивает вырезание T-ДНК;
- B. Определяет синтез фитогормонов;
- C. Покрывает T-ДНК, предотвращая ее деградацию в клетке бактерий;
- D. Обеспечивает транспорт T-ДНК из клетки бактерий в клетку

растения.

58. Когда начинают экспрессироваться гены, детерминирующие синтез фитогормонов?

- A. В клетке бактерий;
- B. В процессе переноса T-ДНК из клетки бактерий в клетки растений;
- C. В цитоплазме растительной клетки;
- D. После встраивания T-ДНК в геном растения.

59. Укажите процесс, лежащий в основе создания коинтегративных векторов на основе Ti-плазмид.

- A. Сайт-специфическая рекомбинация;
- B. Незаконная рекомбинация;
- C. Транспозиция;
- D. Гомологичная рекомбинация.

60. За счет чего бинарные вектора наследуются в клетках *A. tumefaciens*?

- A. Содержат ColE1-репликон;
- B. Содержат репликон широкого круга хозяев;
- C. Содержат репликон Ri-плазмиды;
- D. Встраиваются в состав Ti-плазмиды.

61. Бинарные вектора передаются в клетки растений за счет функциональной активности плазмиды-помощника. Какие функционально значимые локусы в ее составе обеспечивают этот процесс?

- A. Гены, определяющие репликацию плазмиды-помощника;
- B. Гены, определяющие катаболизм опинов в составе плазмиды-помощника;
- C. Гены, определяющие синтез опинов в составе плазмиды-помощника;
- D. Гены *vir*-локуса.

62. Какой метод наиболее часто используется для переноса T-ДНК в клетки двудольных растений?

- A. Баллистический;
- B. Агролистический;
- C. Трансформация;
- D. Электропорация.

63. Назовите тип индуцируемого промотора, который используется для экспрессии чужих генов в клетках растений

- A. 35S-промотор вируса мозаичности цветной капусты (CaMV);
- B. Промотор гена *nos*, кодирующий синтез опинов;
- C. Промотор гена алкогольдегидрогеназы кукурузы (*Adh*);
- D. Промотор гена *hsp70* дрозофилы, кодирующий синтез белка теплового шока.

64. В чем заключается причина замолкания чужеродных генов (*gene silencing*), введенных в геном растения?

- A. Промотор гена не обеспечивает его транскрипцию;

- В. В геном растения встраивается более одной копии гена;
- С. Ген содержит области гомологии с участками генома растений;
- Д. Не происходит трансляции гена.

64. Какую функцию определяют ранние гены вируса SV40?

- А. Синтез белков капсида;
- В. Регуляцию транскрипции;
- С. Репликацию;
- Д. Регуляцию трансляции.

64. Какую функцию определяют поздние гены вируса SV40?

- А. Синтез белков капсида;
- В. Регуляцию транскрипции;
- С. Репликацию;
- Д. Регуляцию трансляции.

65. Геном вируса SV40 представляет собой:

- А. Двунитевую кольцевую ДНК размером около 20 kb;
- В. Двунитевую линейную ДНК размером чуть более 5 kb;
- С. Обнунитевую линейную РНК размером чуть более 5 kb;
- Д. Двунитевую кольцевую ДНК размером чуть более 5 kb.

66. Какое количество молекул мРНК образуется в результате альтернативного сплайсинга раннего первичного транскрипта вируса SV40?

- А. 3 молекулы мРНК;
- В. 2 молекулы мРНК;
- С. 4 молекулы мРНК;
- Д. альтернативный сплайсинг отсутствует.

67. Какое количество молекул мРНК образуется в результате альтернативного сплайсинга позднего первичного транскрипта вируса SV40?

- А. 3 молекулы мРНК;
- В. 2 молекулы мРНК;
- С. 4 молекулы мРНК;
- Д. альтернативный сплайсинг отсутствует.

68. Почему в составе первых векторов на основе вируса SV40 не происходила экспрессия чужеродных генов, встроенных вместо его поздних генов?

- A. В отсутствие вируса-помощника вектор не копировался;
- B. Встроенный гена не содержал сайта полиаденилирования;
- C. В составе встроенного гена отсутствовал интрон;
- D. Промотор вируса SV40 не обеспечивал транскрипцию чужого гена.

69. Укажите базовые элементы экспрессионной кассеты, обеспечивающей синтез чужеродного белка в клетках животных.

- A. Промотор и терминатор;
- B. Сайт полиаденилирования и энхансер;
- C. Промотор и сайт полиаденилирования;
- D. Энхансер и интрон.

70. Укажите дополнительные элементы экспрессионной кассеты, обеспечивающей синтез чужеродного белка в клетках животных.

- A. Промотор и терминатор;
- B. Сайт полиаденилирования и энхансер;
- C. Промотор и сайт полиаденилирования;
- D. Энхансер и интрон.

71. Какие правила следует учитывать для достижения высокого уровня экспрессии чужеродных генов в животных клетках?

- A. 5'-нетранслируемая область мРНК не должна формировать вторичную структуру;
- B. В 5'-нетранслируемой области мРНК не должен присутствовать триплет AUG;
- C. Перед старт-кодом AUG должна находиться последовательность CC(A/G)CC, следующим нуклеотидом за старт-кодом должен быть гуанин (G);
- D. В 3'-нетранслируемой области мРНК не должно присутствовать AU-богатой области.

72. Что обеспечивает функциональную активность векторов замещения ранней области вируса SV40?

- A. Копирование вектора происходит в COS-клетках (почечные клетки обезьяны CV-1, в хромосоме которых содержится ген А вируса SV40);
- B. В состав экспрессионной кассеты входит ранний промотор, сайт полиаденилирования и малый t-интрон;
- C. Присутствие вируса-помощника;
- D. 3'-нетранслируемая часть мРНК чужеродного гена содержит AU-богатую область.

73. В клетках животных синтез пуринов из готовых азотистых оснований осуществляется аденин фосфорибозилтрансферазой (APRT) из аденина, гипоксантин гуанин фосфорибозилтрансферазой (HGPRT) из гипоксантина и гуанина, а также бактериальной ксантин гуанин фосфорибозилтрансферазой (XGPRT) из ксантина. Кроме того, синтез пуринов осуществляется *de novo* и блокируется азосерином, аминоптерином. Кроме того, синтез пурина (GMP) блокируется метотрексатом или микофеноловой кислотой. Тимидинкиназа (ТК) обеспечивает синтез тимидинмонофосфата из тимидидина. Синтез *de novo* этого пиримидина блокируется аминоптерином.

На среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидидин (HAT-среда) будут расти мутантные клетки, не способные синтезировать пурин и пиримидин, в которые внесли вектора с генами, детерминирующими синтез:

- A. HGPRT и ТК;
- B. ТК;
- C. HGPRT;
- D. APRT.

74. На среде, содержащей азосерин и аденин, будут расти мутантные клетки, не способные синтезировать пурин, в которые внесли вектора с генами, детерминирующими синтез:

- A. HGPRT и ТК;
- B. ТК;
- C. HGPRT;
- D. APRT.

75. Ген *dhfr* кодирует синтез дигидрофолатредуктазы (DHFR). В отсутствие этого фермента не происходит образование dATP и dTTP, в результате чего клетка погибает. Такой же эффект наблюдается на среде с аминоптерином или метотрексатом, если в клетке присутствует одна копия гена *dhfr*. Какие клетки будут расти на среде с аминоптерином?

- A. Содержащие вектор (2-3 копии на клетку) с геном, детерминирующим синтез HGPRT;
- B. Содержащие вектор (2-3 копии на клетку) с геном, детерминирующим синтез ТК;
- C. Содержащие вектор (2-3 копии на клетку) с геном, детерминирующим синтез DHFR;
- D. Содержащие вектор (2-3 копии на клетку) с геном, детерминирующим синтез APRT.

7

6. Почему вирус осповакцины используется в качестве основы для создания ДНК вакцин?

- А. Имеет узкий круг хозяев;
- В. Имеет широкий круг хозяев (от позвоночных до беспозвоночных);
- С. Имеет большой размер (187 т.п.н.), что позволяет встраивать в его состав чужеродную ДНК размером до 25 т.п.н.;
- Д. Безопасен.

77. При наличии функционально активного гена, детерминирующего синтез тимидинкиназы (ТК), в среде с 5-бромдезоксиуридином происходит встраивание этого аналога тимина в ДНК, что приводит к гибели клеток. В геноме ВКО содержится ген, детерминирующий синтез ТК. Какие вирусы будут размножаться в клетках мутантных по гену ТК на среде с 5-бромдезоксиуридином?

- А. Клетки без вируса;
- В. Клетки с вирусом дикого типа;
- С. Клетки со спонтанным мутантом по гену ТК вируса;
- Д. Клетки с вирусом, в котором ген ТК инактивирован вставкой чужеродной ДНК.

78. Почему ген *vr37* ВКО относительно гена ТК является более надежным маркером, позволяющим отбирать гибридные молекулы ВКО, в состав которых встроена чужеродная ДНК?

А. В результате рекомбинации между ВКО с геном *vr37* инактивированным вставкой гена канамицинрезистентности, и плазмидой, содержащей чужеродный ген и интактный ген *vr37*, образуется вирус, способный образовывать крупные бляшки в монослое клеток;

В. В результате рекомбинации ВКО с геном *vr37* инактивированным вставкой гена канамицинрезистентности, и плазмидой, содержащей чужеродный ген и интактный ген *vr37*, образуются вирусы, утратившие ген канамицинрезистентности;

С. Спонтанные мутанты вируса по гену ВКО возникают с высокой частотой (10^{-4}), тогда как нарушенный ген *vr37* не способен ревертировать к дикому типу;

Д. Нет разницы между этими маркерами.

79. Каким образом можно упростить систему селекции рекомбинантных вариантов вируса, у которых в ген ТК встроена чужеродная ДНК?

А. Путем встраивания в ген ТК терапевтического гена одновременно с геном *lacZ*, детерминирующим синтез β -галактозидазы;

В. Путем встраивания в ген ТК терапевтического гена одновременно с геном *lux*, детерминирующим синтез люциферазы светлячка, при условии, что

выявление встройки этого гена в 1000 раз чувствительнее, чем по активности β -галактозидазы;

С. Путем отбора рекомбинантов на среде с 5-бромдезоксисуридином;

Д. Путем встраивания в ген ТК терапевтического гена одновременно с геном нео, детерминирующим устойчивость к неомицину, при условии, что этот антибиотик подавляет репликацию исходного вируса на 98%.

80. Ген *gpt*, определяет синтез бактериальной ксантин гуанин фосфорибозилтрансферазы (ХGPRТ). Животные клетки, растущие на среде с аминоптеринном или микофеноловой кислотой, не способны синтезировать пурин (гуанинмонофосфат) *de novo*. Присутствие в клетках бактериального гена *gpt* на среде с ксантином восстанавливает образование пурина (гуанинмонофосфата) и они способны расти. В то же время в клетках мышинных фибробластов, дефектных по гипоксантин гуанин фосфорибозилтрансферазе, в присутствии нуклеотидного аналога 6-тиогуанина, будут размножаться ВКО, у которых ген *gpt* отсутствует (в присутствии 6-тиогуанина и экспрессирующегося гена *gpt* вирус гибнет). Это позволяет вводит целевые гены совместно с геном *gpt*, а затем его удалять и снова вводить следующий целевой ген в другую область генома ВКО. Для многократного введения целевых генов, укажите локализацию гена *gpt* в плазмиде, которая используется для встраивания в геном вируса за счет гомологичной рекомбинации.

- А. Вместе с целевым геном;
- В. Вне локуса с целевым геном;
- С. В составе ВКО;
- Д. В составе хромосомы животных клеток.

81. В какие клетки могут проникать гамма вирусы?

- А. В делящиеся клетки;
- В. В неделящиеся клетки;
- С. В половые клетки;
- Д. В дифференцированные клетки.

82. В какие клетки могут проникать лентивирусы?

- А. В делящиеся клетки;
- В. В неделящиеся клетки;
- С. В половые клетки;
- Д. В дифференцированные клетки.

83. Укажите, какую функцию выполняет белок лентивируса, кодируемый геном *tat*.

- A. Активатор трансляции клеточной РНК;
- B. Транспорт мРНК вируса в цитоплазму;
- C. Репликация в культуре лимфоцитов;
- D. Созревание вирусных гликопротеинов.

84. Укажите, какую функцию выполняет белок лентивируса, кодируемый геном *rev*.

- A. Активатор трансляции клеточной РНК;
- B. Транспорт мРНК вируса в цитоплазму;
- C. Репликация в культуре лимфоцитов;
- D. Созревание вирусных гликопротеинов.

85. Укажите, какую функцию выполняет белок лентивируса, кодируемый геном *nef*.

- A. Активатор трансляции клеточной РНК;
- B. Транспорт мРНК вируса в цитоплазму;
- C. Репликация в культуре лимфоцитов;
- D. Созревание вирусных гликопротеинов.

86. Укажите, какую функцию выполняет белок лентивируса, кодируемый геном *vpr*.

- A. Активатор трансляции клеточной РНК;
- B. Транспорт мРНК вируса в цитоплазму;
- C. Репликация в культуре лимфоцитов;
- D. Созревание вирусных гликопротеинов.

87. Укажите, какую функцию выполняет белок лентивируса, кодируемый геном *vpr*.

- A. Активатор трансляции клеточной РНК;
- B. Транспорт мРНК вируса в цитоплазму;
- C. Фактор инфекционности;
- D. Активатор транскрипции.

88. Укажите, какую функцию выполняет белок лентивируса, кодируемый геном *vpx*.

- A. Активатор трансляции клеточной РНК;
- B. Репликация в Т-лимфоцитах и макрофагах;
- C. Фактор инфекционности;
- D. Активатор транскрипции.

89. Укажите, какую функцию выполняет белок ретровируса, кодируемый геном *pol*.

- A. Активатор трансляции клеточной РНК;
- B. Репликация в Т-лимфоцитах и макрофагах;
- C. Синтез обратной транскриптазы и интегразы;
- D. Активатор транскрипции.

90. Укажите, какую функцию выполняет белок ретровируса, кодируемый геном *gag*.

- A. Активатор трансляции клеточной РНК;
- B. Синтез внутренних белков капсида;
- C. Синтез обратной транскриптазы;
- D. Активатор транскрипции.

91. Укажите, какую функцию выполняет белок ретровируса, кодируемый геном *env*.

- A. Активатор трансляции клеточной РНК;
- B. Синтез внутренних белков капсида;
- C. Синтез обратной транскриптазы;
- D. Активатор транскрипции.

92. Укажите, какую функцию выполняет локус пси (ψ) ретровируса.

- A. Активатор трансляции клеточной РНК;
- B. Упаковка вируса в капсид;
- C. Синтез обратной транскриптазы;
- D. Активатор транскрипции.
- D. Активатор транскрипции.

93. Укажите, где локализован промотор генов провирусной ДНК.

- A. Перед геном *gag*;
- B. Перед каждым геном (*gag*, *pol* и *env*);
- C. В 5'-концевом LTR;
- D. В 3'-концевом LTR.

94. Укажите, какие функциональные единицы гамма-ретровируса присутствуют в геноме пакующей линии.

- A. 5'-LTR- $\Delta\psi$ -*gag*-3'-LTR;
- B. 5'-LTR- $\Delta\psi$ -*pol-env*-3'-LTR;

- C. 5'-LTR-gag-3'-LTR;
- D. 5'-LTR-*pol-env* -3'-LTR.

94. Укажите, где локализованы функциональные единицы ретровируса в геноме пакующей линии.

- A. Вместе;
- B. Вне хромосом;
- C. В разных частях генома;
- D. Вводятся вместе с вектором.

95. Укажите функциональные единицы, входящие в состав ретровирусного вектора.

- A. 5'-LTR- $\Delta\psi$ -gag- целевой ген-селективный маркер 3'-LTR;
- B. 5'-LTR- ψ -целевой ген-селективный маркер-3'-LTR;
- C. 5'-LTR- ψ -gag-целевой ген-селективный маркер 3'-LTR;
- D. 5'-LTR-*pol-env* -3'-LTR.

96. Какие плазмиды содержит пакующая линия для лентивируса?

- A. Плазида с генами *gag* и *pol*;
- B. Плазида с геном *rev*;
- C. Плазида с геном *env*, кодирующим глипротеин;
- D. Плазида с генами *gag*, *pol* и *env*.

97. Что обеспечивает делеция области U3 (Δ U3) в геноме ретровируса?

- A. Делецию ретровирусного промотора, необходимого для транскрипции всех генов;
- B. Возможность встраивать целевой ген под определенные промоторы (например, промотор цитомегаловируса (CMV-промотор));
- C. Не оказывает влияние на экспрессию встроенных генов;
- D. Возможность регулировать экспрессию целевых генов.

98. Что обеспечивает псевдотипирование ретровируса?

- A. Экспрессию чужеродного гена в определенном типе клеток;
- B. Экспрессию чужеродного гена вне хромосом;
- C. Экспрессию чужеродного гена в составе хромосомы;
- D. Способность вируса инфицировать определенный тип клеток.

99. Что обозначает клонирование *ex vivo*?

А. Выделение и культивирование специфических типов клеток животных *in vitro*;

В. Введение в культуру клеток чужеродных генов и отбор трансфицированных клеток;

С. Реинфузию (введение) трансфицированных клеток животному;

Д. Прямое введение клонированных и определенным образом упакованных последовательностей ДНК в специфические ткани животного.

100. Какой способ введения векторов *ex vivo* является наиболее простым и эффективным?

А. инфицирование;

В. Кальций-фосфатный метод;

С. ДЕАЕ-декстрановый метод;

Д. Электропорация.

3.2. Темы рефератов

Тема 1. Ферменты генетической инженерии.

Отличительные особенности систем рестрикции-модификации I-IV типов. Принцип классификации и основные свойства рестриктаз, используемых в генетической инженерии (сайты узнавания, сайты расщепления с образованием липких и тупых концов). Осложнения, возникающие при реакции рестрикции («звездочная» активность). Нуклеотидное окружение сайта рестрикции. Форма скрученности ДНК. Метилирование сайтов рестрикции. Функциональные особенности ДНК-лигаз бактерий *E. coli* и фага T4. Особенности организации и функциональной активности ДНК-полимераза I *E. coli*, фрагмента Кленова, ДНК-полимеразы фага T4, ДНК-полимеразы фага T7, щелочных фосфатаз, терминальной трансферазы и сферы их использования. Функциональные особенности и использование Taq-полимеразы, Vent и Deep Vent в полимеразной цепной реакции.

Тема 2. Методы изоляции и анализа генов.

Принцип и условия проведения ПЦР. Характеристика праймеров для ПЦР (размер, состав, наличие комплементарных последовательностей), типы последовательностей ДНК, добавляемых к 5'-концам праймера (сайты рестрикции, сайты связывания с рибосомой, промоторы, терминаторы и др). Возможности ПЦР (заякоренная ПЦР, инвертированная ПЦР, Alu-ПЦР, «перекрывающаяся» ПЦР для мутагенеза и синтеза генов и др). Ингибиторы ПЦР, реагенты, повышающие специфичность ПЦР. Химический синтез ДНК. Фосфорамидитный метод, суть метода, сферы использования. Одновременное и поэтапное секвенирование. Методы секвенирования ДНК с использованием полимеразной реакции (Сенгера, Illumina). Характеристика методов, сферы использования.

Тема 3. Векторные системы для молекулярного клонирования в клетках прокариот.

Принципы создания генно-модифицированных бактерий. Выбор вектора (плазмидный, вирусный, гибридный; автономно реплицирующийся, интегративный; мало и многокопийный). Анализ изолируемого гена (выбор промотора, терминатора, сайта связывания с рибосомой, анализ состава кодонов). Характеристика векторов (общего назначения, для секвенирования, для мутагенеза, для клонирования регуляторных последовательностей и продуктов ПЦР, для экспрессии чужеродного генетического материала). Механизм репликации ColE1-репликона. Базовый репликон. Типы экспрессионных кассет. Способы отбора рекомбинантной ДНК (прямой, косвенный). Генетическая организация векторов pBR322, pACYC177, pUC18/pUC19, pTZ57R/T, pJET1.2/blunt, pMUTIN, pET-28a(+). Механизм

репликации фага M13 и фага λ . Вектора на основе фага M13, преимущества и недостатки. Вектора на основе фага λ (вектора внедрения, хароны, вектора замещения). Минимальная и максимальная емкость вектора на основе фага λ . Сферы использования векторов на основе фага λ . Принцип организации гибридных векторов (фазмиды, космиды, фагмиды). Примеры, сферы использования. Способы введения векторов в клетки бактерий (конъюгация, трансфекция, трансформация, электропорация).

Тема 4. Векторные системы для молекулярного клонирования в клетках эукариот.

Принципы создания генно-модифицированных растительных и животных клеток, генно-модифицированных растений и животных (половые и соматические клетки). Выбор вектора (вирусный, гибридный; автономно реплицирующийся, интегративный). Анализ изолируемого гена (выбор промотора, интрона, энхансера, сайта окружающего старт-кодон, сайт полиаденилирования, анализ состава кодонов). Особенности организации T-ДНК и *vir*-локуса. Ti-плазмид *A. tumefaciens*. Механизм переноса T-ДНК в клетки растений. Принцип создания векторов на основе Ti-плазмид *A. tumefaciens* (коинтегративные, бирепликонные). Промоторы и селективные маркеры, используемые в векторах для клонирования в клетках растений. Методы введения векторов в клетки растений. Направления в генетической инженерии животных (трансгенные животные, генная терапия, продуценты биологически активных соединений). Генетическая организация вируса SV40 и принцип векторов на его основе (вирусные и гибридные вектора, пакующие клетки). Организация экспрессионных кассет в векторных системах для животных и способы достижения высокого уровня экспрессии чужеродных генов в животных клетках. Селективные и репортерные маркеры, используемые в векторах животных. Генетическая организация вируса осповакцины и цикл его развития в клетках животных. Принцип создания векторов на его основе. Встраивание чужеродного материала в локус, кодирующий синтез тимидинкиназы (усовершенствованные вектора с добавлением репортерных генов *lacZ* и *lux*, кодирующих β -галактозидазу и люциферазу соответственно), в локус *vr37*, определяющий образование бляшек при его росте в культуре животных клеток. Использование в качестве селективного маркера гена *gpt* (определяет синтез ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы), позволяющего вводить несколько чужеродных генов в состав вируса осповакцины. Подходы для создания «ослабленных» вакцин. Стадии развития ретровирусов в животной клетке (спектр хозяев гамма- и лентивирусов). Организация гамма- и лентивирусов с указанием функционально значимых детерминант. Принцип создания векторов на основе ретровирусов. «Пакующие» клеточные линии для отбора гибридных конструкций на основе гамма- и лентивирусных векторов. Принцип создания векторов для экспрессии чужеродного гена в определенном типе клеток (псевдотипирование ретровируса, тканеспецифичные промоторы). Вектора на

основе ретровирусов для встраивания в определенные участки генома, либо поддержания вне хромосомы. Особенности генной терапии *ex vivo* и *in vivo*. «Идеальный» вектор на основе ретровируса. Способы введения векторов в клетки животных (микроинъекция, инфицирование, кальций-фосфатный метод, ДЕАЕ-декстрановый метод, электропорация, слияние протопластов).

3.3. Вопросы для подготовки к экзамену

1. Ферменты рестрикции. Классификация, значение для генной инженерии. Рестриктазы класса II. Классификация. Условия реакции рестрикции.

2. Характеристика ДНК-лигаз.

3. Характеристика ДНК-полимераз (ДНК-полимераза I, фага T4, фага T7, Taq, Vent, Deep Vent, РНК-зависимая ДНК-полимераза).

4. Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза, щелочные фосфатазы, полинуклеотидкиназа фага T4. Характеристика, значение для генной инженерии.

5. Полимеразная цепная реакция. Принцип, условия проведения.

6. Возможности полимеразной цепной реакции (синтез одноцепочечной ДНК, заякоренная ПЦР, Alu-ПЦР, синтез регуляторных участков).

7. Принцип получения мутаций с использованием полимеразной цепной реакции.

8. Характеристика праймеров, используемых в полимеразной цепной реакции. Типы модификаций 5'-концов праймеров.

9. Практическое использование полимеразной цепной реакции в медицине, криминалистике, генной инженерии.

10. Химический синтез ДНК. Фосфорамидитный метод. Сферы применения.

11. Дидезоксинуклеотидный метод определения нуклеотидной последовательности ДНК. Принцип секвенирования Illumina. Сферы применения.

12. Особенности организации регуляторных последовательностей генов про- и эукариот. Принципы конструирования экспрессионных кассет.

13. Общая характеристика плазмид бактерий (фенотипические маркеры, размеры, классификация). Понятие «базового репликона».

14. Принципы создания векторных систем для молекулярного клонирования (основные свойства, классификация). Особенности векторных систем для молекулярного клонирования в клетках бактерий, растений и животных.

15. Механизм копирования ColE- репликона. Векторные системы на основе ColE1-репликона (pBR322, pUC18/19).

16. Регуляция экспрессии лактозного оперона у бактерий. Катаболитная репрессия. Использование *lacZ*-гена в качестве репортерного в составе векторных молекул.

17. Особенности организации экспрессионной кассеты векторов pUC18/19, pET векторов.
18. Принципы создания векторов для инактивации генов (организация вектора pMUTIN).
19. Механизм копирования фага M13. Вектора на основе фага M13 (M13mp18/19).
20. Принцип организации фагмид (например, pBluescript).
21. Организация фага λ . Принцип создания векторов на основе фага λ (векторы внедрения и векторы замещения).
22. Понятия максимальной и минимальной емкости векторов, сконструированных на основе фага λ .
23. Принцип организации космид и фазмид.
24. Способы введения векторов в клетки бактерий.
25. Организация T-ДНК и *vir*-локуса. T_i-плазмид *A. tumefaciens*.
26. Механизм переноса T-ДНК T_i-плазмид *A. tumefaciens*.
27. Принципы создания векторов на основе T_i-плазмид *A. tumefaciens*.
28. Методы введения векторов в клетки растений.
29. Трансгенные растения. Принципы создания. Примеры.
30. Принципы создания векторных систем для животных.
31. Организация вируса SV40.
32. Векторные системы на основе вируса SV40 (вирусные и плазмидные вектора).
33. Организация экспрессионных кассет в векторных системах для животных. Способы достижения высокого уровня экспрессии чужеродных генов в животных клетках.
34. Селективные маркеры, используемые в векторных системах животных.
35. Особенности организации вируса коровьей оспы (ВКО). Принцип конструирования векторов на основе ВКО (локусы ТК и *vr37* для отбора рекомбинантных вирусов). Примеры использования.
36. Генетическая организация ретровирусов.
37. Векторные системы животных на основе ретровирусов (гамма-ретровирусов и лентивирусов). Принципы конструирования («пакующие» клетки, псевдотипирование, тканеспецифичные промоторы). Примеры использования.
38. Способы введения векторов в клетки животных.
39. Достижения генетической инженерии бактерий, животных и растений.

4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

4.1. Рекомендуемая литература

Основная:

1. Журавлева Г.А. Генная инженерия в биотехнологии: учебник / Г.А. Журавлева. – СПб.: Эко-Вектор, 2016. – 328 с.
2. Горбунов Ю. А. Основы генетической инженерии и биотехнологии : учебник / Ю. А. Горбунов [и др.] ; под ред. Ю. А. Горбунова. – Минск : ИВЦ Минфина, 2016. – 344 с.
3. Шмид Р Наглядная биотехнология и генетическая инженерия М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – 327 с.
4. Титок М. А. «Введение в методологию рекомбинантной ДНК» : методические указания. – Минск : БГУ, 2013. – 56 с.
5. Титок, М. А. Плазмиды грамположительных бактерий : монография / Под ред. Ю.К. Фомичева. Минск: БГУ, 2004. – 120 с.
6. Рыбчин, В. Н. Основы генетической инженерии : учебник / В. Н. Рыбчин. – Санкт-Петербург: Изд-во СПбГТУ, 2002. – 552 с.

Дополнительная:

7. Патрушев, Л. И. Искусственные генетические системы : монография / Л.И. Патрушев. Москва: Наука, 2004. Т.1. – 526 с.
8. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия : учеб.-справ. пособие / С. Н. Щелкунов. Новосибирск: Сибирский университет, 2004. – 496 с.
9. Журавлева, Г. А. Генная инженерия в биотехнологии : учебник / Под ред. С.Г. Инге-Вечтомова. Санкт-Петербург: Эко-Вектор, 2016. – 328 с.
10. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение : руководство по биотехнологии / Б. Глик, Дж. Пастернак. Москва: Мир, 2002. – 589 с.

4.2. Электронные ресурсы

3. Образовательный портал БГУ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://edubio.bsu.by/course/view.php?id=7> – Дата доступа: 23.03.2020.
4. Образовательный портал биологического факультета БГУ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://bio.bsu.by/microbio/kursy_vektornye_sistemy.html – Дата доступа: 23.03.2020.
5. Образовательный портал биологического факультета БГУ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html> – Дата доступа: 23.03.2020.

6. Портал Международного генетического банка ДНК [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) – Дата доступа: 23.03.2020.

7. Портал фирмы-производителя реактивов для молекулярной биологии Thermofisher [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.thermofisher.com> – Дата доступа: 23.03.2020.

4.3. Учебная программа

Учебная программа по дисциплине «Векторные системы» для учреждений высшего образования по специальности 1-31 01 01-03 Биология (Биотехнология) и 1-31 01 03 Микробиология и презентации к курсу доступны на образовательном портале биологического факультета БГУ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: по адресу: http://bio.bsu.by/microbio/kursy_vektornye_sistemy.html – Дата доступа: 23.03.2020.