

Документ подписан простой электронной подписью
Информация о владельце:
ФИО: Таскаев Сергей Валерьевич
Должность: Ректор
Дата подписания: 01.07.2026 12:58:10
Уникальный программный ключ:
04c19ed8bfb98f7b6cb77a486b9a9788b8322323



МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Челябинский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ЧелГУ»)

Фонд оценочных средств для промежуточной аттестации по дисциплине (модулю) "Стандартизация и регламентация биоинженерной практики" по специальности 06.05.01 "Биоинженерия и биоинформатика" специализации Биоинженерия и биоинформатика ФГБОУ ВО «ЧелГУ»

Стр. 1

Фонд оценочных средств для промежуточной аттестации по дисциплине
(модулю)

Стандартизация и регламентация биоинженерной практики

Специальность

06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика

Специализация

Биоинженерия и биоинформатика

Присваиваемая квалификация

Биоинженер и биоинформатик

Форма обучения

очная

Год набора 2026

Челябинск 2026 г.



1. ПАСПОРТ ФОНДА ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

Специальность: 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика

Специализация: Биоинженерия и биоинформатика

Дисциплина: Стандартизация и регламентация биоинженерной практики

Семестр изучения: 9.

Форма промежуточной аттестации: зачет.

2. ПЕРЕЧЕНЬ ФОРМИРУЕМЫХ КОМПЕТЕНЦИЙ

Коды компетенции (по ФГОС)	Содержания компетенций согласно ФГОС	Коды и содержания индикаторов	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине
ПК-1	Способен применять современные методы обработки, анализа и синтеза полевой, производственной и лабораторной биологической информации, правила составления научно-технических проектов и отчетов в области биоинженерии и биоинформатики	ПК-1.1 Использует базовые принципы планирования научных исследований и правила техники безопасности при работе с исследовательской аппаратурой в области биоинженерии и биоинформатики	Для достижения ПК-1.1 знать: принципы современной биотехнологии, приемы генетической инженерии, основы нанобиотехнологии и молекулярного моделирования
		ПК-1.3 Планирует организацию и проведение научных исследований по актуальным биомедицинским проблемам	Для достижения ПК-1.3 уметь: оценивать и прогнозировать перспективность объектов своей профессиональной деятельности для биотехнологических производств
			Для достижения ПК-1.3 владеть: приемами определения биологической безопасности продукции



МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Челябинский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ЧелГУ»)

Фонд оценочных средств для промежуточной аттестации по дисциплине (модулю) "Стандартизация и регламентация биоинженерной практики" по специальности 06.05.01 "Биоинженерия и биоинформатика" специализации Биоинженерия и биоинформатика ФГБОУ ВО «ЧелГУ»

Стр. 3

биотехнологических и
биомедицинских производств.

3. СОДЕРЖАНИЕ ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

3.1 Виды оценочных средств

Код компетенции/планируемые результаты обучения	Контролируемые разделы	Наименование оценочного средства для текущего контроля	Наименование оценочного средства для промежуточной аттестации
ПК-1	Раздел 1. Введение в биоинженерию Раздел 2. Генетическая инженерия Раздел 3. Биоинженерия растений Раздел 4. Биоинженерия животных Раздел 5. Биоинженерия микроорганизмов Раздел 6. Биоинженеринг в России	Рефераты, ситуационные задачи	Вопросы к зачету

Типовые задания, критерии и показатели оценивания в рамках текущего контроля представлены в рабочей программе по дисциплине. Полные комплекты оценочных средств контрольно-измерительных материалов хранятся на кафедре и являются учебно-методическими материалами ограниченного (конфиденциального) пользования.

3.2 Содержание оценочных средств для промежуточной аттестации

3.2.1. Перечень теоретических вопросов к зачету по дисциплине «Стандартизация и регламентация биоинженерной практики»



вопрос	План ответа
1. Объекты изучения, задачи, методы исследования и основные направления развития современной биоинженерии.	<p>Определение биоинженерии как междисциплинарной науки; краткая историческая справка о становлении дисциплины; место биоинженерии в системе современных наук.</p> <p>Объекты изучения биоинженерии биологические макромолекулы (ДНК, РНК, белки); клетки и клеточные системы (прокариоты, эукариоты, стволовые клетки); ткани и органы; организмы (генетически модифицированные организмы, модельные организмы); экосистемы и биотехнологические процессы.</p> <p>Основные задачи биоинженерии разработка биомедицинских технологий и имплантатов; создание генетически модифицированных организмов с заданными свойствами; получение биологически активных веществ и биофармацевтических препаратов; восстановление и замена повреждённых тканей и органов (тканевая инженерия); оптимизация биотехнологических процессов в промышленности и сельском хозяйстве; решение экологических проблем с помощью биотехнологий.</p> <p>Методы исследования в биоинженерии молекулярно-биологические методы (ПЦР, секвенирование, генная инженерия); клеточные технологии (культивирование клеток, клеточная терапия); биоинформатические методы (анализ геномов, моделирование биомолекул); биосенсорные и диагностические технологии; методы биотехнологического производства (биореакторы, ферментация); методы визуализации и микроскопии (конфокальная микроскопия, электронная микроскопия).</p> <p>Основные направления развития современной биоинженерии генная и клеточная терапия; тканевая инженерия и 3D-биопечать органов; синтетическая биология (создание искусственных биологических систем); бионика и биомиметические технологии; биоинженерия в сельском хозяйстве (генетически модифицированные растения и животные); экологическая биоинженерия (биоремедиация, биodeградация отходов); нанобиотехнологии и доставка лекарственных препаратов.</p> <p>Заключение значимость биоинженерии для развития медицины, промышленности и экологии; этические и регуляторные аспекты биоинженерных исследований; перспективы дальнейшего развития дисциплины.</p>
2. Понятие вектора в генетической инженерии. Виды векторов.	<p>Краткое определение генетической инженерии; роль векторов в методах генетической инженерии (перенос и клонирование генов).</p> <p>Понятие вектора в генетической инженерии определение вектора как молекулы ДНК, способной переносить чужеродный генетический материал в клетку-хозяина; основные свойства векторов (автономная репликация, наличие маркеров, сайты рестрикции); принципиальная структура вектора (ориджин репликации, селективный маркер, полилинкер).</p> <p>Основные типы векторов плазмидные векторы: характеристика плазмид как природных векторов; преимущества и ограничения; примеры использования (клонирование небольших фрагментов ДНК). фаговые (вирусные) векторы:</p>



	<p>на основе бактериофагов (λ-фаг, M13); особенности упаковки и доставки ДНК; применение в генной терапии и клонировании.</p> <p>космиды: гибридные векторы (плаزمиды + фрагмент фага); способность клонировать более крупные фрагменты ДНК.</p> <p>искусственные хромосомы (BAC, YAC, PAC): ёмкость и стабильность при клонировании больших фрагментов; использование в геномных проектах (например, секвенирование генома человека).</p> <p>Специализированные векторы экспрессионные векторы (для синтеза белков в клетках-хозяевах); векторы для эукариотических систем (например, на основе вирусов SV40, аденовирусов); интегративные векторы (встраивающиеся в геном хозяина); индуцируемые векторы (регулируемая экспрессия генов).</p> <p>Критерии выбора вектора размер вставляемой ДНК; тип клетки-хозяина (бактериальная, дрожжевая, животная, растительная); цель эксперимента (клонирование, экспрессия, доставка в организм); наличие селективных маркеров и регуляторных элементов.</p> <p>Заключение значение векторов для развития генетической инженерии и биотехнологий; перспективы создания новых векторных систем (например, для генной терапии)</p>
<p>3. Конструирование экспрессирующих векторов и механизмы их функционирования.</p>	<p>Введение: понятие экспрессирующего вектора определение и назначение; отличие от других типов векторов (клонировующих, челночных); основные области применения (биотехнология, генная инженерия, медицина).</p> <p>Ключевые компоненты экспрессирующего вектора ориджин репликации (); селективный маркер (гены устойчивости к антибиотикам); промотор (сильные/индуцируемые, тканеспецифичные); сайт связывания рибосом (RBS/Shine-Dalgarno); множественный клонирующий сайт (MCS); терминатор транскрипции; дополнительные элементы (сигналы полиаденилирования, интроны для эукариот).</p> <p>Этапы конструирования экспрессирующего вектора выбор базового вектора; подбор промотора и других регуляторных элементов; клонирование целевого гена (рестрикция, лигирование); проверка конструкции (секвенирование, рестрикционный анализ); оптимизация (кодонная адаптация, добавление тегов).</p> <p>Механизмы функционирования экспрессирующего вектора репликация в клетке-хозяине; транскрипция под контролем промотора; трансляция мРНК (роль RBS, старт-кодона); посттрансляционные модификации (для эукариотических систем); регуляция экспрессии (индуцируемые системы, репрессоры).</p> <p>Системы экспрессии и их особенности прокариотические (E. coli); дрожжевые (S. cerevisiae); клетки млекопитающих; растительные системы; бесклеточные системы.</p> <p>Проблемы и ограничения токсичность продукта для клетки-хозяина; неправильная фолдинг белка;</p>



	<p>низкий уровень экспрессии; стабильность вектора. Заключение: перспективы развития новые технологии конструирования (CRISPR, Gibson assembly); синтетические векторы; применение в генной терапии и биофармацевтике</p>
4. Прокариотические и эукариотические векторы экспрессии.	<p>Введение: общее понятие вектора экспрессии определение и основная функция; ключевые требования к векторам (репликация, селекция, регуляция экспрессии); принципиальная разница между прокариотическими и эукариотическими системами. Прокариотические векторы экспрессии типичные хозяева (<i>E. coli</i>, <i>B. subtilis</i>); основные компоненты: ориджин репликации () прокариотического типа; селективные маркеры (гены устойчивости к антибиотикам); прокариотические промоторы (например, T7, lac, trp); сайт связывания рибосом (Shine-Dalgarno, RBS); множественный клонирующий сайт (MCS). особенности регуляции экспрессии (оперонная система, индукция IPTG); примеры векторов (pGEX-3х, pET-серии); преимущества и ограничения (быстрога, стоимость, отсутствие посттрансляционных модификаций). Эукариотические векторы экспрессии типы хозяев (дрожжи, клетки млекопитающих, растительные клетки); ключевые элементы конструкции: эукариотический оиджин репликации; селективные маркеры для эукариот (например, гены устойчивости к неомицину); эукариотические промоторы (CMV, SV40, тканеспецифичные); сигнал полиаденилирования; последовательность Козака (для инициации трансляции); интроны (в некоторых случаях). системы доставки (трансфекция, вирусные векторы); примеры векторов (плазмиды pSV, pCMV, аденовирусные векторы); особенности экспрессии (ядерная локализация, сплайсинг, посттрансляционные модификации). Сравнительный анализ прокариотических и эукариотических векторов различия в механизмах транскрипции и трансляции; возможности посттрансляционной модификации белков; уровни регуляции экспрессии (прокариоты — в основном на уровне ДНК; эукариоты — многоуровневая регуляция); скорость и стоимость экспрессии; применимость для разных типов белков (растворимые, мембранные, гликозилированные). Челночные (бирепликонные) векторы назначение и принцип работы; сочетание элементов прокариотических и эукариотических систем; примеры использования. Заключение: выбор вектора в зависимости от задачи критерии выбора (тип белка, требуемые модификации, масштаб производства); тенденции развития (синтетические векторы, оптимизированные системы экспрессии).</p>
5. Основные классы ферментов, использующихся в генетической инженерии.	<p>Роль ферментов в генетической инженерии. Общие принципы работы с ДНК-молекулами. Рестриктазы (эндонуклеазы рестрикции) Определение и основная функция (расщепление ДНК в специфических сайтах). Классификация по типам (I, II, III). Примеры распространённых рестриктаз (<i>EcoRI</i>, <i>HindIII</i>). Значение «липких» и «тупых» концов. ДНК-лигазы</p>



	<p>Функция (соединение фрагментов ДНК). Механизм действия. Применение в клонировании и создании рекомбинантных молекул. ДНК-полимеразы Основная роль (синтез ДНК). Виды: Таq-полимераза (ПЦР), обратная транскриптаза (синтез кДНК). Особенности термостабильных полимераз. Обратная транскриптаза Функция (синтез ДНК на матрице РНК). Значение для получения кДНК и работы с эукариотическими генами. Нуклеазы (экзонуклеазы и неспецифические эндонуклеазы) Различия между экзо- и эндонуклеазами. Применение для удаления нуклеотидов или дегградации ДНК/РНК. Щелочная фосфатаза Функция (удаление фосфатных групп с 5'-концов ДНК). Значение для предотвращения самолигирования векторов. Полинуклеотидкиназа Функция (фосфорилирование 5'-концов ДНК/РНК). Использование в мечении ДНК. Топоизомеразы Роль в регуляции суперспирализации ДНК. Применение в некоторых методах клонирования. Заключение Обобщение значения различных классов ферментов. Перспективы развития ферментных технологий в генетической инженерии.</p>
<p>6. Системы экспрессии генов в бактериальных клетках.</p>	<p>Определение экспрессии генов; значение контролируемой экспрессии для биотехнологий и исследований. Основные компоненты бактериальной системы экспрессии промотор и его роль; оператор и регуляторные последовательности; терминатор; рибосом-связывающий сайт (RBS); кодирующая последовательность гена. Механизмы регуляции экспрессии у бактерий конститутивная и индуцируемая экспрессия; оперонная организация (на примере <i>lac</i>-оперона); роль репрессоров и активаторов; механизмы аттенуации. Ключевые регуляторные системы <i>lac</i>-система (индуцируется лактозой/ИПТГ); <i>tac</i>- и <i>trc</i>-промоторы (гибридные, более сильные); T7-система (высокая специфичность и мощность); арабинозная система (<i>araBAD</i>); температурно-индуцируемые системы. Векторы для экспрессии в бактериях плазмидные векторы: основные элементы (ориджин, маркер отбора, множественный клонирующий сайт); фаговые векторы; интегративные векторы. Факторы, влияющие на эффективность экспрессии выбор штамма-хозяина (например, <i>E. coli</i> BL21, Rosetta); оптимизация кодонов; растворимость и фолдинг белка; токсичность продукта для клетки; условия культивирования (температура, индуктор, фаза роста). Типичная схема экспрессионного эксперимента клонирование гена в экспрессионный вектор;</p>



	<p>трансформация бактерий; отбор клонов; индукция экспрессии; анализ продукции белка (электрофорез, вестерн-блот). Ограничения бактериальных систем экспрессии отсутствие посттрансляционных модификаций (гликозилирование, фосфорилирование); образование телец включения; трудности с экспрессией крупных/сложных белков. Заключение: перспективы и альтернативы совершенствование бактериальных систем (шапероны, слитые теги); сравнение с эукариотическими системами экспрессии.</p>
<p>7. Проблемы экспрессии чужеродных генов в микроорганизмах. Обеспечение возможности экспрессии генов млекопитающих в микробной клетке.</p>	<p>Определение экспрессии генов; актуальность гетерологической экспрессии (экспрессии чужеродных генов); основные модели-организмы для экспрессии (E. coli, дрожжи и др.). Ключевые проблемы экспрессии генов млекопитающих в микроорганизмах Различия в генетическом коде и сигнальных последовательностях: промоторы, терминаторы, сайты связывания рибосом (RBS); различия в регуляторных элементах. Сплайсинг и обработка РНК: отсутствие сплайсосомы у прокариот; необходимость использования кДНК (комплементарной ДНК). Посттрансляционные модификации: гликозилирование, фосфорилирование, образование дисульфидных связей; несовпадение паттернов модификаций у млекопитающих и микроорганизмов. Фолдинг и агрегация белков: образование телец включения; нехватка шаперонов для правильного сворачивания чужеродных белков. Токсичность продукта для клетки-хозяина: нарушение метаболизма; активация стрессовых ответов. Стабильность мРНК и белка: быстрая деградация чужеродной мРНК; протеолитическая деградация белка. Способы обеспечения экспрессии генов млекопитающих в микробных клетках Оптимизация кодирующей последовательности: оптимизация кодонов (codon optimization); удаление нестабильных мотивов в мРНК. Использование подходящих векторов и промоторов: индуцируемые промоторы (T7, lac, GAL1 и др.); векторы с сильными RBS. Применение штаммов-хозяев с модифицированным метаболизмом: штаммы с дефицитом протеаз; штаммы с усиленной экспрессией шаперонов. Секреция белка во внеклеточное пространство или периплазму: сигнальные пептиды для транспорта; снижение токсичности и агрегации. Использование эукариотических систем (дрожжи, грибковые клетки): наличие аппарата гликозилирования; возможность сплайсинга. Совместная экспрессия вспомогательных белков: шапероны, изомеразы дисульфидных связей; ферменты посттрансляционных модификаций. Примеры успешных реализаций производство инсулина в E. coli; синтез эритропоэтина в дрожжах; другие терапевтические белки.</p>



	<p>Заключение обобщение основных проблем и решений; перспективы развития технологий гетерологической экспрессии; значение для биотехнологии и медицины.</p>
8. Клетки дрожжей как экспрессирующие системы.	<p>Определение экспрессирующих систем; место дрожжей среди других систем экспрессии (прокариоты, клетки млекопитающих); основные виды дрожжей-хозяев (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>Pichia pastoris</i>, <i>Hansenula polymorpha</i>, <i>Yarrowia lipolytica</i> и др.). Преимущества дрожжевых систем эукариотическая природа (наличие аппарата посттрансляционных модификаций); безопасность (статус GRAS — «общепризнаны как безопасные»); хорошо изученная генетика и биохимия; быстрый рост на недорогих питательных средах; простота генетических манипуляций; возможность секреции белка во внешнюю среду. Ограничения дрожжевых систем отличия в гликозилировании по сравнению с клетками млекопитающих; ограниченная способность к высокоплотному культивированию; вариабельность уровня продукции между трансформантами; возможные проблемы с фолдингом крупных или сложных белков. Ключевые элементы экспрессионной системы векторы (в т. ч. челночные, на основе плазмиды 2 мкм); селективные маркеры (ауксотрофные — <i>LEU2</i>, <i>TRP1</i>, <i>URA3</i>, <i>HIS3</i>; доминантные — устойчивость к антибиотикам); промоторы (конститутивные и индуцируемые: <i>ADHI</i>, <i>PGK</i>, <i>GAP</i>, <i>GAL1/7/10</i>, <i>PHO5</i>, терморегулируемые и др.); терминаторы; сигнальные пептиды для секреции. Оптимизация экспрессии выбор штамма-хозяина (с дефицитом протеаз, усиленной секрецией и т. п.); оптимизация кодонов; контроль условий культивирования (температура, pH, аэрация); индукция экспрессии (субстраты, температура, ионы и т. д.); модификация этапов процессинга и фолдинга. Примеры применения производство рекомбинантных белков (ферменты, вакцины, терапевтические белки); синтез гликопротеинов; биофармацевтические препараты (на примере <i>Pichia pastoris</i>). Заключение обобщение сильных и слабых сторон дрожжевых систем; перспективы развития (генетическая инженерия штаммов, оптимизация гликозилирования и др.); значение для биотехнологии и медицины.</p>
9. Системы экспрессии, основанные на культуре клеток животных.	<p>Определение систем экспрессии на основе клеток животных; место среди других экспрессионных систем (прокариоты, дрожжи, растительные клетки); основные области применения (биофармацевтика, фундаментальные исследования, тканевая инженерия). Основные типы клеточных линий для экспрессии перевиваемые линии (CHO, НЕК 293, ВНК, Vero, COS); первичные культуры (ограниченное число делений); иммортиализованные клетки; стволовые клетки (в т. ч. индуцированные плюрипотентные). Преимущества систем на клетках животных полноценный аппарат посттрансляционных модификаций (гликозилирование, фосфорилирование, γ-карбоксилирование и др.); корректный фолдинг сложных белков (в т. ч. мультидоменных и мультимерных);</p>



возможность продукции функциональных гликопротеинов и антител;
физиологическая релевантность для медицинских приложений;
способность секретировать белки в культуральную среду.

Ограничения и сложности
высокая стоимость культивирования (дорогие среды, сыворотки);
требовательность к условиям (температура, pH, CO₂, стерильность);
низкая скорость роста по сравнению с микроорганизмами;
риск вирусной контаминации и генетической нестабильности;
регуляторные требования для фармацевтического производства.

Ключевые компоненты экспрессионной системы
векторы (плазмидные, вирусные — ретро-, адено-, AAV-векторы);
промоторы (конститутивные — CMV, SV40; индуцируемые);
селективные маркеры (антибиотическая устойчивость, ауксотрофные маркеры);
сигналы полиаденилирования, энхансеры;
системы интеграции в геном (транспозоны, рекомбиназы).

Методы трансфекции и генерации стабильных линий
химическая трансфекция (липиды, полимеры);
электропорация;
вирусная трансдукция;
микроинъекции;
отбор и клонирование стабильных продуцентов.

Оптимизация продукции белка
выбор клеточной линии и вектора;
оптимизация условий культивирования (перфузионные системы, биореакторы);
контроль метаболизма и апоптоза;
модуляция гликозилирования (инженерные клетки с модифицированными ферментами);
масштабирование процесса.

Примеры успешного применения
моноклональные антитела (ритуксимаб, трастузумаб);
рекомбинантные факторы свертывания (VIII, IX);
гормоны и цитокины (ЭПО, интерфероны);
вакцины (субъединичные, вирус-подобные частицы);
ферменты и лизоцимы для терапии.

Современные тенденции и перспективы
использование CRISPR/Cas9 для точной интеграции генов;
клетки с «человекоподобным» гликозилированием;
3D-культуры и органоиды;
автоматизация и цифровизация биопроцессов;
снижение стоимости и повышение доступности терапий.

Заключение
сводное сравнение с другими системами экспрессии;
ключевые драйверы развития области;
значение для медицины и биотехнологии.

10. Бесклеточные системы синтеза белка.

Определение бесклеточных (in vitro) систем синтеза белка;
принципиальное отличие от клеточных экспрессионных систем;
историческая справка (ключевые открытия и этапы развития).

Основные типы бесклеточных систем
на основе лизатов *E. coli* (наиболее распространённые);
эукариотические системы (из клеток ретикулоцитов кролика, зародышей пшеницы, насекомых);
синтетические/минимальные системы (сборка из очищенных компонентов);
микрокомпартиментализированные системы (капли, везикулы).

Компоненты реакционной смеси
рибосомы и тРНК;
факторы трансляции (IF, EF, RF);
аминокислоты (в т. ч. модифицированные/неприродные);
источники энергии (ГТФ, АТФ, креатинфосфат);



буферные компоненты и ионы (Mg^{2+} , K^{+});
ДНК-матрица (плазмида, линейная кассета) или мРНК.

Преимущества бесклеточных систем
скорость (синтез за часы, без клеточного цикла);
возможность включения не природных аминокислот;
отсутствие клеточной токсичности для продукта;
простота модификации условий реакции;
открытость системы (лёгкий отбор проб, добавление реагентов);
безопасность (нет живых организмов).

Ограничения и вызовы
высокая стоимость реагентов;
ограниченная продолжительность реакции (истощение ресурсов);
низкая выходная концентрация белка по сравнению с клеточными системами;
сложности с фолдингом крупных белков;
необходимость оптимизации состава для каждого белка.

Методы повышения эффективности
рециркуляция энергии (ферментные системы регенерации АТФ/ГТФ);
непрерывный проток реагентов (перфузионные реакторы);
иммобилизация компонентов на носителях;
оптимизация соотношения Mg^{2+}/K^{+} и pH;
добавление шаперонов и фолдаз.

Области применения
экспресс-синтез белков для скрининга и структурной биологии;
включение меченых аминокислот (N^{15} , C^{13} , флуорофоров);
синтез токсичных белков и мембранных белков;
биосенсорные платформы;
синтетическая биология (создание искусственных клеток);
персонализированная медицина (быстрый синтез терапевтических белков).

Современные технологии и инновации
микрофлюидные чипы для высокопроизводительного синтеза;
капельные системы (droplet-based synthesis);
автоматизированные платформы;
комбинированные системы с клеточными экстрактами и синтетическими компонентами.

Сравнение с клеточными системами экспрессии
критерии выбора (скорость, стоимость, сложность белка, масштаб);
комплементарность методов (когда целесообразно комбинировать).

Заключение
ключевые тенденции развития области;
потенциал для биотехнологии и медицины;
перспективы снижения стоимости и масштабирования

11. Методы получения изолированных генов.

Определение понятия «изолированный ген»;
значение изолированных генов в генетической инженерии и биотехнологии.

Основные методы получения изолированных генов
выделение генов из генома с помощью рестриктаз (эндонуклеаз);
химико-ферментативный синтез гена *in vitro*;
получение гена с помощью обратной транскрипции (кДНК-метод);
амплификация гена методом ПЦР (полимеразной цепной реакции).

Описание ключевых методов (кратко по каждому)
принцип работы и этапы;
необходимые ферменты и реагенты;
преимущества и ограничения метода.

Выбор метода: критерии и факторы
длина и сложность целевой последовательности;
наличие исходной матричной ДНК/РНК;
требуемая точность и наличие известных последовательностей;
временные и ресурсные затраты.

Заключение



	обобщение: какие методы наиболее востребованы сегодня; перспективы развития технологий получения изолированных генов.
12. Основные принципы технологии рекомбинантной ДНК.	<p>Что такое рекомбинантная ДНК (рекДНК). Основная задача: создание искусственных генетических конструкций с заданными свойствами. Практическое значение (медицина, биотехнология, сельское хозяйство).</p> <p>Ключевые этапы получения рекомбинантной ДНК Выделение целевой ДНК (из организма-донора). Выбор и подготовка вектора (плазида, вирусная ДНК и др.). Расщепление ДНК рестриктазами (рестрикторными эндонуклеазами). Сшивание фрагментов ДНК-лигазой (формирование рекомбинантной молекулы). Введение рекДНК в клетку-реципиент (трансформация, трансфекция). Отбор и идентификация клеток с рекомбинантной ДНК.</p> <p>Основные инструменты и ферменты Рестриктазы (типы, сайты узнавания, «липкие» и «тупые» концы). ДНК-лигазы (механизм сшивания фосфодиэфирных связей). ДНК-полимеразы (в т. ч. для ПЦР и секвенирования). Обратная транскриптаза (синтез кДНК на матрице РНК).</p> <p>Векторные системы Требования к векторам: ориджин репликации (ori), маркерные гены, сайты клонирования. Типы векторов: плазмидные, фаговые, космиды, искусственные хромосомы. Векторы для экспрессии (сильные промоторы, сигналы терминации).</p> <p>Методы введения ДНК в клетки Трансформация (бактерии, дрожжи). Трансфекция (клетки млекопитающих). Электропорация. Биобаллистика (для растительных клеток). Вирусные векторы (в генной терапии).</p> <p>Отбор и скрининг рекомбинантных клонов Селективные маркеры (антибиотикорезистентность, ферментные гены). Скрининг по цвету (например, X-gal/lacZ-система). ПЦР-анализ и рестрикторный анализ. Секвенирование для подтверждения структуры.</p> <p>Методы анализа рекомбинантной ДНК Электрофорез в агарозном/полиакриламидном геле. Саузерн-блоттинг (гибридизация ДНК). ПЦР и RT-PCR. Секвенирование (метод Сэнгера, NGS).</p> <p>Типичные применения технологии Получение рекомбинантных белков (инсулин, интерфероны, вакцины). Генная терапия. Создание ГМО (растения, микроорганизмы). Молекулярное клонирование и геновые библиотеки.</p> <p>Этические и биологические риски Безопасность ГМО и рекомбинантных организмов. Регуляция и биобезопасность (руководства НИИ, ВОЗ). Общественное восприятие и дискуссии.</p>
13. Способы введения рекомбинантной ДНК в клетки.	<p>Значение методов трансфекции/трансформации в генной инженерии. Основные цели: экспрессия чужеродных генов, создание ГМО, генная терапия. Общие требования к методам (эффективность, безопасность, применимость к разным типам клеток).</p> <p>Физические методы Электропорация: принцип действия (кратковременные электрические импульсы, создание пор в мембране), сферы применения. Микроинъекция: прямое введение ДНК в ядро клетки, использование микроманипуляторов, область применения (ооциты, эмбриональные клетки).</p>



Биобаллистика (генная пушка): покрытие частиц золотом/вольфрамом ДНК и «выстрел» в ткань, применение в растениеводстве.

Оптическая трансфекция: использование лазерного излучения для локального проникновения мембраны.

Химические методы

Кальций-фосфатная трансфекция: образование преципитатов ДНК с фосфатом кальция, поглощение клетками.

Липофекция: использование катионных липидов для формирования липосом, сливающихся с клеточной мембраной.

Полимерные носители: полимеры (например, DEAE-декстран) для комплексообразования с ДНК и эндоцитоза.

Биологические методы

Вирусные векторы:
ретровирусы,
аденовирусы,
лентивирусы,
адено-ассоциированные вирусы (AAV).
Преимущества и ограничения каждого типа.

Агробактерии (*Agrobacterium tumefaciens*): природный механизм переноса Т-ДНК в растительные клетки, использование в генной инженерии растений.

Специальные методы для разных типов клеток

Бактерии: химическая трансформация (обработка $CaCl_2$), электропорация.

Дрожжи: литические ферменты + осмотический шок, электропорация.

Растительные клетки: протопласты + ПЭГ, биобаллистика, агробактериальная трансформация.

Животные клетки: липофекция, электропорация, вирусные векторы, микроинъекция.

Млекопитающие (в т. ч. человеческие): вирусные векторы для генной терапии, электропорация, наночастицы.

Сравнительный анализ методов
Эффективность трансфекции (процент успешных клеток).
Токсичность и жизнеспособность клеток.
Стабильность интеграции ДНК (транзистентная vs стабильная трансфекция).
Масштаб применения (лабораторные исследования vs биопроизводство).

Современные тенденции и инновации
Нанотехнологии (углеродные нанотрубки, золотые наночастицы).
CRISPR/Cas9-ассоциированные методы доставки.
Управляемая доставка (тканеспецифичные векторы, стимул-чувствительные системы).

Заключение
Итоги: разнообразие методов и их специализация.
Выбор оптимального способа в зависимости от задачи и типа клеток.
Перспективы развития технологий доставки ДНК.

14. Области применения рекомбинантных микроорганизмов.

Определение рекомбинантных микроорганизмов;
суть технологии (генетическая модификация, перенос генов);
ключевое преимущество (получение организмов с заданными свойствами).

Медицина и фармацевтика
производство терапевтических белков (инсулин, интерфероны, факторы свёртывания);
разработка вакцин (в т. ч. рекомбинантных);
генная терапия и создание лекарственных препаратов;
диагностика (ферменты для ПЦР, репортёрные белки).

Сельское хозяйство
создание трансгенных растений с устойчивостью к вредителям, болезням, гербицидам;
улучшение питательной ценности культур;
биологические средства защиты растений;
кормовые добавки (аминокислоты, ферменты).

Промышленная биотехнология
синтез ферментов для пищевой, текстильной, бумажной промышленности;



	<p>производство биопластиков и биополимеров; биотрансформация сырья (биокатализ); получение биотоплива (биоэтанол, биодизель).</p> <p>Экология и биоремедиация очистка сточных вод и почв от загрязнений (нефть, тяжёлые металлы, пестициды); деградация пластиковых отходов; улавливание и переработка парниковых газов.</p> <p>Научные исследования модельные организмы для изучения генов и метаболических путей; скрининг лекарственных мишеней; синтетическая биология и конструирование биосистем.</p> <p>Пищевая промышленность производство ферментов (рекомбинантная амилаза, протеаза); синтез пищевых добавок (витамины, ароматизаторы); ферментированные продукты с улучшенными свойствами.</p> <p>Заключение обобщение ключевых областей применения; перспективы развития технологий этика и безопасность.</p>
<p>15. Генетические маркеры. Методы идентификации и изоляции клонов с рекомбинантной ДНК.</p>	<p>Определение генетического маркера; роль маркеров в генной инженерии; общая схема клонирования рекомбинантной ДНК.</p> <p>Типы генетических маркеров селективные маркеры (антибиотикорезистентность, ауксотрофные маркеры); репортёрные гены (<i>lacZ</i>, <i>gfp</i>, <i>luc</i>); молекулярные маркеры (SSR, SNP, RFLP); функциональные маркеры (гены-мишени).</p> <p>Методы идентификации рекомбинантных клонов селекция по устойчивости к антибиотикам (принцип действия, примеры); бело-голубая селекция (система <i>lacZ</i>, механизм скрининга); ПЦР-анализ (дизайн праймеров, амплификация целевых последовательностей); рестрикционный анализ (расщепление эндонуклеазами, электрофорез); гибридизация по Саузерну (использование ДНК-зондов); секвенирование (подтверждение вставки).</p> <p>Методы изоляции рекомбинантных клонов отбор колоний на селективных средах (механизм, примеры сред); микроманипуляция и пипетирование (ручное выделение колоний); проточная цитометрия (сортировка клеток по флуоресценции); клонирование в векторах с аффинными метками (выделение по белковым тегам).</p> <p>Современные подходы и автоматизация высокопроизводительный скрининг (микропланшеты, роботизированные системы); NGS-технологии для массового анализа клонов; CRISPR-Cas-опосредованный отбор.</p> <p>Типичные проблемы и способы их решения ложноположительные результаты (причины, контроль); низкая эффективность трансформации; нестабильность рекомбинантных конструкций.</p> <p>Заключение значение методов идентификации и изоляции в биотехнологии; перспективы развития (новые маркеры, автоматизация).</p>
<p>16. Протопластирование и слияние (фузия) протопластов.</p>	<p>Определение протопластов (клетки без клеточной стенки); значение метода в биотехнологии и клеточной инженерии; основные области применения (создание гибридов, генетическая трансформация, изучение клеточных процессов).</p> <p>Получение протопластов (протопластирование) источники материала (растительные, грибные, бактериальные клетки); методы удаления клеточной стенки:</p>



ферментативный (пектиназы, целлюлазы, литические ферменты);
механический;
осмотический шок;
условия культивирования протопластов (осмотические стабилизаторы, питательные среды);
оценка жизнеспособности и выхода протопластов.
Методы слияния протопластов (фузии)
химические методы (полиэтиленгликоль — ПЭГ);
электрофузия (воздействие электрическим полем);
вирусные индукторы слияния;
сравнение эффективности и специфики методов.
Этапы процесса слияния
подготовка протопластов к фузии (очистка, концентрация);
индукция слияния;
стабилизация гибридных клеток;
регенерация клеточной стенки у гибридов.
Отбор и идентификация гибридных клеток
селективные среды (маркерные гены, ауксотрофные мутанты);
морфологические и биохимические критерии;
молекулярно-генетические методы (ПЦР, секвенирование, кариотипирование).
Культивирование и регенерация гибридов
условия роста гибридных клеток;
восстановление клеточной стенки;
получение целостных организмов (растений, грибов);
проблемы регенерации и пути их решения.
Практическое применение метода
создание соматических гибридов и цибридов;
перенос цитоплазматических генов (митохондрии, пластиды);
генетическая трансформация (введение чужеродной ДНК);
изучение межклеточного взаимодействия и компартиментализации.
Ограничения и проблемы метода
низкая эффективность слияния и регенерации;
нестабильность гибридных геномов;
видовая специфичность;
трудоемкость и высокая стоимость.
Современные достижения и перспективы
оптимизация протоколов фузии;
применение в синтетической биологии и биофабрикации;
использование для редактирования геномов (в комбинации с CRISPR/Cas).

17. Гибридизация эукариотических организмов.

Понятие гибридизации
определение гибридизации как процесса образования гибридов;
биологическая суть: объединение генетического материала разных клеток в одной;
отличие от скрещивания (частичное совпадение понятий).
Основные типы гибридизации
внутривидовая (различия только по генотипу, в пределах одного вида);
отдалённая (межвидовая и межродовая — объединение разных геномов).
Механизмы и особенности процесса
половая гибридизация (оплодотворение);
соматическая гибридизация (слияние неполовых клеток);
молекулярная гибридизация (слияние нуклеиновых кислот);
цитоплазматическая гибридизация (объединение митохондрий/пластид).
Результаты и феномены при гибридизации
гетерозис в первом поколении (повышенная жизнеспособность, плодовитость);
стерильность отдалённых гибридов (причины: нарушение конъюгации хромосомом, несбалансированные гаметы);
пути преодоления стерильности (полиплоидизация, амфидиплоидия);
трангрессивные фенотипы (признаки, выходящие за пределы родительских форм).
Видообразование через гибридизацию



гибридогенное видообразование (симпатрический путь);
аллополиплоидия (у растений — удвоение хромосомных наборов от разных видов);
рекомбинационное видообразование (новые гомозиготные рекомбинанты);
роль внешних преград (экологическая, сезонная, морфологическая изоляция).
Примеры естественной гибридизации
растения (пшеница, розы, фиалки, тритикале);
животные (мул, зубробизон, архаромеринос, нар);
одноклеточные организмы (грибы, водоросли, инфузории).
Искусственная гибридизация в селекции
цели: создание новых сортов и пород с ценными признаками;
методы преодоления несовместимости (полиплоидия, беккроссы);
примеры успешных гибридов в сельском хозяйстве.
Методы анализа гибридов
цитогенетические (кариотипирование, анализ хромосом);
молекулярно-генетические (ПЦР, секвенирование);
биохимические и фенотипические маркеры;
гибридизация ДНК (оценка генетического родства).
Ограничения и проблемы гибридизации
низкая жизнеспособность межвидовых гибридов;
трудности регенерации и размножения;
генетическая нестабильность гибридных геномов;
этические и экологические аспекты (в случае ГМО).
Значение и перспективы
эволюционная роль (источник генетического разнообразия);
прикладное значение в биотехнологии и селекции;
новые направления (клеточная инженерия, синтетическая биология).

18. Клонирование эмбрионов млекопитающих.

Понятие клонирования
определение клонирования как получения генетически идентичных организмов;
различие между естественным (например, монозиготные близнецы) и искусственным клонированием;
ключевые термины: клон, донор, реципиент, суррогатная мать.
Научные предпосылки и история
основные этапы развития технологии (от амфибий к млекопитающим);
знаковый эксперимент с овечкой Долли (1996 г.);
современные достижения: клонирование более 20 видов млекопитающих.
Методы клонирования эмбрионов
перенос ядер соматических клеток (SCNT):
забор донорской соматической клетки;
энуклеация ооцита (удаление ядра);
слияние клеток и активация развития;
альтернативные подходы (тетраплоидная комплементация, использование ИПСК).
Последовательность этапов клонирования
подготовка донорских клеток и ооцитов;
микрохирургические манипуляции (перенос ядра);
стимуляция развития реконструированного эмбриона;
культивирование *in vitro*;
трансплантация эмбриона суррогатной матери;
вынашивание и рождение клона.
Биологические сложности и ограничения
низкая эффективность процедуры (высокий процент неудач);
эпигенетические нарушения и аномалии развития;
проблемы плацентации и внутриутробного роста;
сокращённая продолжительность жизни некоторых клонов.
Отличия клона от исходного организма
генетическая идентичность при возможных фенотипических различиях;
влияние цитоплазмы ооцита и условий развития;
роль случайных мутаций и эпигенетики.



	<p>Применение клонирования млекопитающих сохранение редких и исчезающих видов; воспроизводство ценных сельскохозяйственных животных; биомедицинские исследования (модели болезней, тестирование лекарств); коммерческое клонирование домашних животных.</p> <p>Этические и правовые аспекты дискуссии о моральной допустимости клонирования; запрет на клонирование человека в большинстве стран; регулирование использования технологии в животноводстве и науке.</p> <p>Перспективы развития совершенствование методов переноса ядер и активации эмбрионов; снижение рисков эпигенетических нарушений; интеграция с геномным редактированием (CRISPR/Cas9); потенциальные применения в регенеративной медицине.</p> <p>Заключение оценка текущего состояния технологии; баланс между научными возможностями и этическими ограничениями; значение клонирования для биологии и прикладных отраслей</p>
<p>19. Способы получения трансгенных животных.</p>	<p>Определение трансгенного животного (организм с искусственно введённым чужеродным геном); основные цели создания: биомедицинские исследования, фармацевтика, сельское хозяйство, биореакторы; ключевые термины: трансген, промотор, маркерный ген, микроинъекция.</p> <p>Основные методы получения трансгенных животных микроинъекция ДНК в пронуклеус зиготы; использование эмбриональных стволовых клеток (ES-клеток); ретровирусные и лентивирусные векторы; метод CRISPR/Cas9 и другие системы геномного редактирования; транспозон-опосредованная интеграция.</p> <p>Микроинъекция в пронуклеус: пошаговая схема получение зигот от суперовулированных самок; подготовка рекомбинантной ДНК (конструкция с трансгеном и регуляторными элементами); микроинъекция в мужской пронуклеус; трансплантация модифицированных зигот суррогатным матерям; скрининг потомства на наличие трансгена (ПЦР, Саузерн-блот).</p> <p>Метод эмбриональных стволовых клеток выделение и культивирование ES-клеток; трансфекция клеток конструкцией с трансгеном; селекция трансформированных клонов; инъекция ES-клеток в бластоцисту; получение химерных животных и выведение гомозиготных линий.</p> <p>Вирусные векторы особенности ретровирусов и лентивирусов (интеграция в геном); упаковка трансгена в вирусную частицу; инфицирование ранних эмбрионов или ооцитов; преимущества (высокая эффективность) и риски (инсерционный мутагенез).</p> <p>Геномное редактирование (CRISPR/Cas9 и аналоги) принцип работы системы CRISPR/Cas9; доставка компонентов (мРНК Cas9 + гРНК, рибонуклеопротеины); целевое встраивание трансгена или нокаут гена; преимущества: точность, возможность мультиплексного редактирования.</p> <p>Транспозонные системы механизм транспозиции (например, система <i>Sleeping Beauty</i>); ко-инъекция транспозона и транспозазы в зиготу; стабильная интеграция трансгена в геном.</p> <p>Этапы верификации трансгенных животных молекулярно-генетическая диагностика (ПЦР, секвенирование);</p>



	<p>анализ экспрессии трансгена (РТ-ПЦР, вестерн-блот, иммуногистохимия); фенотипическая оценка (изучение целевых признаков); получение стабильных трансгенных линий (скрещивание и наследование).</p> <p>Проблемы и ограничения методов низкая эффективность интеграции у некоторых подходов; позиционный эффект (влияние окружения на экспрессию трансгена); нецелевые модификации (особенно при геномном редактировании); этические и биологические риски (нарушение функций генов, онкогенез).</p> <p>Примеры практического применения модели заболеваний человека (мышь с мутациями генов болезней); биофармацевтика (производство терапевтических белков в молоке); сельскохозяйственные животные с улучшенными признаками (устойчивость к болезням, повышенная продуктивность); сохранение биоразнообразия (репозитории генов).</p> <p>Заключение сравнительная эффективность методов; перспективы развития (комбинация подходов, точность доставки); баланс между научными возможностями и этико-правовыми ограничениями.</p>
<p>20. Основные этапы получения трансгенных растений.</p>	<p>Постановка цели и выбор целевого гена определение желаемого признака (устойчивость к вредителям, гербицидам, повышение питательной ценности и т. п.); подбор соответствующего гена, отвечающего за нужный признак.</p> <p>Получение изолированного гена выделение гена из донорского организма; синтез гена <i>in vitro</i> (при необходимости); клонирование гена с помощью ПЦР или других методов.</p> <p>Создание генетической конструкции подбор вектора (плазмиды) для переноса гена; встраивание целевого гена в вектор; добавление регуляторных элементов (промотора, терминатора); включение селективного маркера (например, гена устойчивости к антибиотику).</p> <p>Трансформация растительных клеток выбор метода введения гена (агробактериальная трансформация, биолистика, электропорация и др.); перенос генетической конструкции в клетки растения-реципиента.</p> <p>Селекция и регенерация трансгенных клеток отбор трансформированных клеток с помощью маркера; культивирование отобранных клеток <i>in vitro</i>; регенерация целых растений из трансформированных клеток (тканевая культура).</p> <p>Проверка трансформации молекулярно-генетические методы подтверждения (ПЦР, секвенирование); анализ экспрессии гена (РТ-ПЦР, вестерн-блот); фенотипическая оценка проявления целевого признака.</p> <p>Испытания и внедрение полевые испытания устойчивости и продуктивности; оценка биобезопасности (воздействие на экосистему, аллергенные свойства); получение разрешений и регистрация сорта; масштабирование производства трансгенных семян.</p>
<p>21. Методы выделения и очистки НК из природных образцов. Методы определения концентрации НК.</p>	<p>Краткое определение нуклеиновых кислот (НК): ДНК и РНК. Значение выделения и очистки НК для молекулярно-биологических исследований. Общие требования к препаратам НК (чистота, целостность, концентрация).</p> <p>Методы выделения НК из природных образцов 2 Лизис клеток/тканей: механический (гомогенизация, ультразвук); химический (буферы с детергентами, ЭДТА); ферментативный (протеиназы, лизоцим).</p>



	<p>2Очистка от белков и других примесей: фенол-хлороформная экстракция; осаждение белков солями (например, ацетатом натрия); использование протеиназы К. Осаждение НК: спиртовое осаждение (этанол/изопропанол); осаждение солями (ацетат натрия, хлорид натрия). 2Современные экспресс-методы: сорбентные методы (силика, магнитные частицы); коммерческие наборы для выделения НК. Методы очистки НК колоночная хроматография (ионно-обменная, эксклюзионная); ультрафильтрация; диализ; очистка от РНКаз/ДНКаз (специальные буферы, ингибиторы). Методы определения концентрации НК Спектрофотометрические методы: измерение поглощения при (); расчёт концентрации по коэффициентам (для ДНК: ; для РНК:); оценка чистоты по соотношениям и . Флуориметрические методы: использование флуоресцентных красителей (например, PicoGreen для ДНК, RiboGreen для РНК); высокая чувствительность (нг/мл). Электрофорез в агарозном геле: визуальная оценка целостности и приблизительной концентрации; сравнение с маркерами известной концентрации. ПЦР в реальном времени (qPCR): количественная оценка специфичных фрагментов ДНК/кДНК; высокая точность и специфичность. Заключение Сравнение методов по чувствительности, скорости, стоимости. Выбор метода в зависимости от цели исследования и типа образца. Важность контроля качества и количества НК для последующих экспериментов.</p>
<p>22. Физические принципы метода гель-электрофореза. Проведение и параметры агарозного гель-электрофореза.</p>	<p>Определение гель-электрофореза как метода разделения макромолекул (ДНК, РНК, белков) в гелевой матрице под действием электрического поля. Область применения: анализ размера, чистоты и количества нуклеиновых кислот, генотипирование, клонирование и др. Физические принципы метода Основа разделения: движение заряженных молекул в электрическом поле (электрофоретическая подвижность); зависимость скорости миграции от размера и формы молекулы. Роль гелевой матрицы: агароза как пористый гель, создающий «молекулярное сито»; селективное торможение молекул: мелкие мигрируют быстрее, крупные — медленнее. Электрическое поле: постоянное напряжение, направленное от катода (-) к аноду (+); влияние напряжённости поля на скорость миграции. Заряд нуклеиновых кислот: отрицательный заряд фосфатных групп ДНК/РНК; движение к аноду (+). Подготовка к проведению агарозного гель-электрофореза Приготовление агарозного геля: выбор концентрации агарозы (от 0,5 % до 3 % в зависимости от размера фрагментов); растворение агарозы в буфере (ТАЕ, ТВЕ), заливка в форму с гребёнкой. Буферы для электрофореза: состав и функции (ТАЕ: трис-ацетат-ЭДТА; ТВЕ: трис-борат-ЭДТА);</p>



проводимость и буферная ёмкость.
Подготовка образцов:
добавление загрузочного буфера (глицерин/фикол, красители);
использование маркеров молекулярной массы.
Проведение электрофореза
Загрузка образцов:
внесение смесей в лунки геля.
Подача напряжения:
типичные значения: 80–150 В;
контроль по движению красителя.
Время разделения:
зависит от размера фрагментов и напряжённости поля (30–60 мин).
Остановка процесса:
отключение питания, извлечение геля.
Визуализация и анализ результатов
Окрашивание:
бромистый этидий (в гель или после электрофореза);
безопасные альтернативы (GelRed, SYBR Green).
Детекция:
УФ-трансиллюминатор или система гель-документирования;
фиксация изображений.
Интерпретация:
сравнение с маркером для определения размера фрагментов;
оценка интенсивности полос (приблизительная концентрация).
Ключевые параметры и их влияние
концентрация агарозы (разрешающая способность);
напряжённость электрического поля (скорость и разрешение);
состав буфера (проводимость, нагрев);
температура (влияние на вязкость геля);
размер и конформация ДНК (линейная, кольцевая, суперспирализованная).
Заключение
преимущества агарозного гель-электрофореза (простота, наглядность, доступность);
ограничения метода (разрешающая способность, чувствительность);
варианты модернизации (капиллярный электрофорез, пульсирующей поле).

23. Принцип рестрикционного анализа.

Определение понятия
Что такое рестрикционный анализ (краткая дефиниция).
Область применения метода (молекулярная биология, генетическая инженерия и др.).
Суть принципа
Основная идея метода.
Роль рестриктаз (ферментов) в процессе.
Принцип специфичности распознавания последовательностей ДНК.
Механизм действия
Этапы процесса рестрикции: связывание фермента, разрезание ДНК.
Типы концов, образующихся после разрезания (липкие/ровные).
Значение палиндромных последовательностей.
Практическое применение
Картирование геномов.
Клонирование ДНК.
Диагностика генетических заболеваний.
ДНК-фингерпринтинг.
Преимущества и ограничения метода
Высокая специфичность и воспроизводимость.
Зависимость от наличия рестрикционных сайтов.
Возможные ложноотрицательные результаты.
Современные модификации и альтернативы
Использование рестриктаз с разной специфичностью.



	Комбинирование с ПЦР и секвенированием. Методы, вытесняющие рестрикционный анализ (NGS и др.).
24. Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH).	<p>Определение метода Что такое FISH (расшифровка аббревиатуры, суть метода). Принцип <i>in situ</i>-анализа (исследование непосредственно в ткани/клетке).</p> <p>Основные цели и задачи Выявление специфических последовательностей ДНК/РНК. Локализация генов на хромосомах. Диагностика хромосомных аномалий и генетических заболеваний.</p> <p>Принцип метода Использование флуоресцентно-меченных ДНК-зондов. Комплементарное связывание зонда с целевой последовательностью. Визуализация результатов с помощью флуоресцентной микроскопии.</p> <p>Этапы проведения FISH Подготовка образца (фиксация клеток/ткани). Денатурация ДНК (разделение цепей). Гибридизация с флуоресцентным зондом. Отмывка несвязавшихся зондов. Анализ результатов под флуоресцентным микроскопом.</p> <p>Типы FISH-зондов Локус-специфические (для конкретных генов). Центромерные (для анализа хромосомных регионов). Теломерные (для изучения концов хромосом). Whole-chromosome painting (окрашивание целых хромосом).</p> <p>Области применения Цитогенетика (анализ хромосомных перестроек). Онкология (выявление онкогенов, диагностика опухолей). Пренатальная диагностика (выявление анеуплоидий). Микробиология (идентификация микроорганизмов).</p> <p>Преимущества метода Высокая специфичность и чувствительность. Возможность анализа неполимеризованной ДНК. Визуализация пространственной локализации последовательностей. Одновременное исследование нескольких мишеней (мультицветной FISH).</p> <p>Ограничения и недостатки Необходимость знания последовательности для подбора зонда. Ограниченное разрешение (не выявляет мелкие мутации). Трудоёмкость и высокая стоимость реагентов. Требования к квалификации персонала.</p> <p>Современные модификации Спектральное кариотипирование (SKY-FISH). 3D-FISH (изучение пространственной организации хроматина). Комбинирование с другими методами (например, с секвенированием).</p>
25. Характеристика и принцип метода нозерн-гибридизации.	<p>Суть нозерн-гибридизации (Northern blot); целевое назначение (анализ РНК); место в ряду гибридизационных методов (аналогия с саузерн-блотом).</p> <p>Основные цели применения выявление конкретных молекул РНК (мРНК, некодирующих РНК); определение размера транскрипта; оценка уровня экспрессии генов; анализ сплайсинга и альтернативных транскриптов.</p> <p>Принцип метода (ключевые этапы) выделение тотальной РНК или мРНК из образца; электрофоретическое разделение РНК по размеру (агарозный гель с формальдегидом); перенос РНК на твёрдую мембрану (блоттинг);</p>



	<p>фиксация РНК на мембране (УФ-облучение или нагревание); гибридизация с меченым ДНК- или РНК-зондом; детекция сигнала (авторадиография, хемилюминесценция и др.).</p> <p>Ключевые реагенты и оборудование буферы для выделения и электрофореза; формальдегид (денатурация РНК); нитроцеллюлозные/нейлоновые мембраны; меченые зонды (радиоактивные, флуоресцентные, биотинилированные); системы детекции.</p> <p>Преимущества метода специфичность (за счёт комплементарного зонда); возможность оценки размера транскриптов; количественный анализ экспрессии; работа с сложными смесями РНК.</p> <p>Ограничения и недостатки трудоемкость и длительность; необходимость работы с радиоактивными материалами (в классических вариантах); низкая чувствительность по сравнению с ПЦР-методами; требование высокого качества РНК (чувствительность к деградации).</p> <p>Современные модификации и альтернативы использование нерадиоактивных меток; комбинация с ПЦР (RT-PCR, qPCR); микрочипы и секвенирование РНК (RNA-seq) как высокопроизводительные альтернативы</p>
<p>26. Характеристика и принцип метода саузерн-гибридизации.</p>	<p>Общее определение метода суть саузерн-блоттинга (Southern blot); автор метода (Эдвин Саузерн, 1975 г.); целевое назначение (анализ ДНК); место в ряду блоттинг-методов (основа для нозерн- и вестерн-блота).</p> <p>Основные цели применения выявление специфических последовательностей ДНК; генотипирование и идентификация особей; диагностика генетических заболеваний; анализ рестриционных фрагментов (RFLP); подтверждение результатов клонирования; изучение геномной организации (повторы, делеции, вставки).</p> <p>Принцип метода (ключевые этапы) выделение геномной ДНК из образца; рестрикция ДНК эндонуклеазами (расщепление на фрагменты); электрофоретическое разделение фрагментов в агарозном геле; денатурация ДНК (щелочной буфер → одностранные молекулы); перенос ДНК на твердую мембрану (блоттинг, капиллярный или вакуумный); фиксация ДНК на мембране (УФ-облучение или нагревание); гибридизация с меченым ДНК-зондом (комплементарным искомым последовательности); отмывка неспецифически связавшихся зондов; детекция сигнала (авторадиография, хемилюминесценция, флуоресценция).</p> <p>Ключевые реагенты и оборудование рестриционные эндонуклеазы; буферы для электрофореза и блоттинга; агарозные гели; нитроцеллюлозные/нейлоновые мембраны; меченые зонды (радиоактивные ³²P, биотинилированные, флуоресцентные); системы детекции (рентгеновская пленка, CCD-камеры и др.).</p> <p>Преимущества метода высокая специфичность (за счёт комплементарности зонда); возможность анализа крупных геномных фрагментов; визуализация рестриционного профиля; надёжность при диагностике точечных мутаций и перестроек.</p>



	<p>Ограничения и недостатки трудоёмкость и длительность (1–3 дня); необходимость большого количества ДНК (мкг); использование радиоактивных изотопов (в классических протоколах); низкая чувствительность по сравнению с ПЦР; чувствительность к качеству ДНК (деградация, примеси).</p> <p>Современные модификации и альтернативы нерадиоактивные системы мечения (биотин, флуорофоры); комбинация с ПЦР (PCR-Southern); микрочипы для гибридизации; секвенирование нового поколения (NGS) как высокопроизводительная альтернатива.</p>
<p>27. Характеристика и принцип метода вестерн-гибридизации.</p>	<p>Общее определение метода суть вестерн-блоттинга (вестерн-гибридизации); целевое назначение (выявление специфических белков в образце); место метода в ряду биохимических анализов.</p> <p>Основные области применения диагностика заболеваний (инфекционных, онкологических и др.); исследование экспрессии белков; контроль чистоты белковых препаратов; изучение посттрансляционных модификаций.</p> <p>Ключевые этапы метода (последовательно) подготовка образца (лизис клеток, денатурация белков); электрофорез в полиакриламидном геле (разделение белков по массе); перенос белков на мембрану (нитроцеллюлозную или PVDF); блокирование неспецифических сайтов связывания; инкубация с первичными антителами (специфическое связывание); инкубация со вторичными антителами (усиление сигнала); детекция (химилюминесценция, окраска и др.).</p> <p>Принцип детекции роль антител (первичных и вторичных); механизмы визуализации (ферментативные реакции, флуоресценция); интерпретация результатов (полосы на мембране = целевые белки).</p> <p>Преимущества метода высокая специфичность (за счёт антител); чувствительность (обнаружение малых количеств белка); возможность оценки молекулярной массы белка; мультиплексный анализ (одновременное выявление нескольких белков).</p> <p>Ограничения и сложности трудоёмкость и длительность протокола; необходимость высококачественных антител; риск неспецифического связывания; требования к оборудованию и реагентам.</p> <p>Современные модификации количественный вестерн-блоттинг; использование флуоресцентных меток; автоматизированные системы обработки.</p>
<p>28. Технологии, основанные на ДНК-чипах</p>	<p>Определение и суть технологии что такое ДНК-чип (микрочип, биочип); базовая структура: матрица иммобилизованных ДНК-проб на твёрдой подложке; принцип работы: гибридизация комплементарных последовательностей.</p> <p>Типы ДНК-чипов олигонуклеотидные чипы (короткие фрагменты); кДНК-чипы (клонированные гены); чипы для SNP-анализа (однонуклеотидные полиморфизмы); чипы для анализа экспрессии генов; аранжировочные чипы (для сравнительной геномной гибридизации).</p>



	<p>Этапы проведения анализа подготовка образца (выделение ДНК/РНК, мечение флуоресцентными красителями); гибридизация с чипом; промывка для удаления неспецифически связавшихся молекул; сканирование и регистрация сигнала; биоинформатическая обработка данных.</p> <p>Основные области применения генотипирование и выявление мутаций; анализ экспрессии генов (профилирование транскриптома); диагностика инфекционных заболеваний; фармакогенетика (подбор терапии по генетическому профилю); онкогеномика (выявление опухолевых маркеров); изучение генетического разнообразия и эволюционных связей.</p> <p>Преимущества технологии высокопараллельный анализ тысяч генов одновременно; высокая чувствительность и специфичность; экономия времени и реагентов по сравнению с методами одиночного анализа; стандартизация и автоматизация процессов.</p> <p>Ограничения и проблемы высокая стоимость оборудования и чипов; сложность интерпретации данных (шум, кросс-гибридизация); требования к качеству и количеству исходного материала; необходимость биоинформатической поддержки; ограниченная динамическая шкала детектируемых сигналов.</p> <p>Современные тенденции и развитие уменьшение размеров чипов и повышение плотности проб; интеграция с ПЦР и секвенированием; появление «лабораторий на чипе» (microfluidic chips); применение в персональной медицине и предиктивной диагностике.</p>
<p>29. Компоненты и схема проведения ПЦР. Требования к организации помещений для ПЦР-лаборатории. Проблема контаминации.</p>	<p>Компоненты ПЦР ДНК-матрица — образец, содержащий целевую последовательность для амплификации. Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP) — строительные блоки для синтеза ДНК. Праймеры — короткие олигонуклеотиды, комплементарные концам целевой последовательности. Обеспечивают специфичность реакции. Тaq-полимераза — термостабильный фермент, катализирующий удлинение праймеров. Буферный раствор — поддерживает оптимальные условия реакции (рН, ионная сила). Схема проведения ПЦР ПЦР включает повторяющиеся циклы, каждый из которых состоит из трёх этапов: Денатурация (94–96 °С) — разделение двухцепочечной ДНК на одноцепочечные. Отжиг праймеров (45–60 °С) — присоединение праймеров к комплементарным участкам ДНК. Удлинение (72 °С) — синтез новых цепей ДНК с помощью Таq-полимеразы. Циклы повторяются 30–40 раз, что приводит к экспоненциальному увеличению количества целевой последовательности. Для детекции продуктов используют электрофорез, флуоресцентные зонды или другие методы</p> <p>Требования к организации помещений ПЦР-лаборатории Зонирование: Зона приёма, регистрации, разбора и первичной обработки материала. Зона выделения нуклеиновых кислот (НК). Зона приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР. Зона детекции продуктов амплификации (электрофорез, ГиФА). Отделка помещений: стены, пол и потолок должны быть гладкими, без щелей, устойчивыми к дезинфекции. Рекомендуется использовать кафель или масляную краску Вентиляция: приточно-вытяжная или вытяжная система. Важно исключить воздухообмен между зоной детекции и другими помещениями. Разница в давлении воздуха между зонами достигается за счёт разной кратности воздухообмена.</p>



Оборудование: ПЦР-боксы, боксы биологической безопасности (классы I–III), амплификаторы, центрифуги, холодильники. Все поверхности обрабатывают дезинфицирующими средствами и УФ-излучением.

Дополнительные требования: бактерицидные лампы, запрет на использование жалюзи, герметичные окна, отдельные наборы посуды и реагентов для каждой зоны.



Проблема контаминации Контаминация — загрязнение рабочих зон, оборудования и воздуха ампликонами (продуктами ПЦР) или другими нуклеиновыми кислотами, приводящее к ложноположительным результатам.

Виды контаминации:

Перекрёстная — перенос материала между пробами при обработке, выделении НК или внесении в реакционную смесь.

Тотальная — загрязнение поверхностей, воздуха и оборудования ампликонами, что может привести к массовым ложноположительным результатам.

Причины контаминации:

Неправильная организация лаборатории (отсутствие зонирования, нарушение поточности).

Ошибки при работе с образцами и реагентами (несоблюдение правил асептики, использование загрязнённых инструментов).

Аэрозольное распространение ампликонов при открытии пробирок или планшетов.

Загрязнение реагентов или праймеров.

Меры предотвращения контаминации:

Строгое соблюдение поточности движения материалов и персонала.

Использование одноразовых перчаток, наконечников с фильтрами, стерильной посуды.

Регулярная дезинфекция рабочих поверхностей, оборудования и воздуха (УФ-облучение, химические средства).

Постановка отрицательных контролей для выявления контаминации.

Обучение персонала правилам работы в ПЦР-лаборатории.

Действия при выявлении контаминации:

Утилизация всех реактивов и материалов в контаминированной зоне.



Деконтаминация помещений и оборудования.
Повторное тестирование подозрительных проб с использованием альтернативных методов.



Вывод: ПЦР — высокочувствительный метод, требующий строгого соблюдения правил организации лаборатории и работы с материалами. Ключевыми аспектами являются зонирование помещений, контроль вентиляции, регулярная дезинфекция и обучение персонала. Профилактика контаминации позволяет избежать ложноположительных результатов и обеспечить достоверность исследований.

30. Разновидности ПЦР. Практическое использование ПЦР-анализа для фундаментальных и прикладных исследований.

Введение: суть метода ПЦР
краткое определение ПЦР (полимеразная цепная реакция);
ключевое преимущество — амплификация (умножение) целевых фрагментов ДНК;
базовые компоненты и принцип цикличности.

Основные разновидности ПЦР
Классическая (стандартная) ПЦР — получение копий ДНК для последующего анализа (электрофорез, секвенирование).
ПЦР в реальном времени (qPCR, RT-PCR) — количественная оценка ДНК/кДНК с мониторингом накопления продукта в каждом цикле.
Обратная транскрипция ПЦР (RT-PCR) — амплификация РНК через синтез кДНК с помощью ревертазы.
Мультиплексная ПЦР — одновременная амплификация нескольких мишеней в одной реакции (разные пары праймеров).
Гнездовая ПЦР (nested PCR) — двухэтапный процесс с внутренними праймерами для повышения специфичности.
Асимметричная ПЦР — амплификация одной цепи ДНК (например, для секвенирования).
ПЦР с горячим стартом (hot start PCR) — подавление неспецифической амплификации до первого цикла денатурации.



Цифровая ПЦР (dPCR) — абсолютное количественное определение ДНК без калибровочных кривых (разделение образца на множество реакций).

Практическое использование в фундаментальных исследованиях

Геномика и транскриптомика:
картирование генов, анализ экспрессии (qPCR, RT-PCR);
изучение альтернативного сплайсинга, нонсенс-опосредованного распада мРНК.

Молекулярная биология и генетика:
клонирование и субклонирование фрагментов ДНК;
мутагенез (в т. ч. сайт-направленный);
филогенетический анализ и эволюционные исследования.

Функциональная геномика:
валидация данных RNA-seq, ChIP-seq;
анализ регуляторных элементов (промоторы, энхансеры).

Практическое использование в прикладных исследованиях и диагностике

Медицинская диагностика:
выявление патогенов (вирусы, бактерии, паразиты);
генетические заболевания (мутации, делеции, дупликации);
онкодиагностика (мутации онкогенов, химерные транскрипты).

Инфекционная диагностика:
COVID-19, ВИЧ, гепатиты, туберкулёз, ИППП и др.;
типирование штаммов, определение резистентности.

Судебно-медицинская экспертиза и идентификация:
ДНК-профилирование (STR-анализ);
установление родства, идентификация останков.

Сельское хозяйство и биотехнология:
ГМО-анализ;
селекция и маркер-ассоциированное скрещивание;
диагностика фитопатогенов.

Экологический мониторинг и биоразнообразие:
метагеномные исследования (почва, вода, воздух);
идентификация видов по ДНК-штрихкодированию.

Контроль качества и безопасность:
обнаружение патогенов в пище и воде;
мониторинг биозагрязнений в фармацевтике и биопромышленных процессах.

Преимущества и ограничения ПЦР-анализа

Преимущества: высокая чувствительность и специфичность, скорость, возможность работы с малыми количествами материала, масштабируемость.

Ограничения: риск контаминации, необходимость тщательного дизайна праймеров, зависимость от качества образца, стоимость оборудования и реагентов.

Заключение
ПЦР — универсальный инструмент, трансформирующий фундаментальные и прикладные исследования;
развитие новых модификаций расширяет область применения и повышает точность анализа.

31. Секвенирование ДНК по Сэнгеру.

Введение: общая характеристика метода
автор и год разработки (Ф. Сэнгер, 1977);
принципиальное значение — первый надёжный метод определения нуклеотидной последовательности;
область применения: валидация результатов NGS, анализ точечных мутаций, подтверждение клонирования.

Принцип метода
основа — ферментативный синтез комплементарной цепи ДНК с остановкой на определённом нуклеотиде;
ключевая особенность — использование дидезоксинуклеотидов (ddNTP) как терминаторов синтеза;
образование фрагментов разной длины, заканчивающихся конкретным нуклеотидом.

Основные компоненты реакции
одноцелевая ДНК-матрица;



праймер (короткий олигонуклеотид);
ДНК-полимераза;
дезоксинуклеотиды (dNTP);
дидезоксинуклеотиды (ddNTP, меченные флуорофорами или радионуклидами);
буферный раствор.

Этапы проведения секвенирования
подготовка матрицы (амплификация целевого фрагмента ПЦР);
постановка четырёх параллельных реакций (по одному ddNTP на реакцию) либо одной мультиплексной (все ddNTP с разными метками);
ферментативный синтез с терминацией;
разделение фрагментов по длине (электрофорез в полиакриламидном геле или капиллярный электрофорез);
детекция меченных фрагментов и расшифровка последовательности.

Методы детекции и анализа результатов
радиоавтография (ранние версии);
флуоресцентная детекция с лазерным сканированием (современные автоматизированные системы);
построение хроматограммы (график интенсивности сигналов по позициям);
интерпретация последовательности с помощью ПО.

Преимущества метода
высокая точность (до 99 %);
длина прочтения до 800–1000 н. п. за один запуск;
относительно низкая стоимость для малых объёмов;
простота интерпретации результатов.

Ограничения метода
низкая производительность (одно прочтение за реакцию);
не подходит для массового параллельного анализа;
сложность анализа гетерозиготных вариантов в смешанных образцах;
необходимость чистой одноцелевой матрицы.

Современное применение
подтверждение результатов высокопроизводительного секвенирования (NGS);
диагностика моногенных заболеваний;
анализ мутаций в онкогенах;
валидация генетических конструкций (плазмиды, трансгены);
филогенетические исследования (секвенирование отдельных генов).

Заключение
метод Сэнгера — «золотой стандарт» точного секвенирования коротких фрагментов;
сохраняет актуальность несмотря на развитие NGS благодаря надёжности и доступности.

32. Секвенирование с помощью капиллярного секвенатора.

Суть метода и место в современной геномике
определение капиллярного секвенирования как автоматизированной версии метода Сэнгера;
ключевое отличие от классического гель-электрофореза — использование тонких капилляров вместо пластин геля;
область применения: рутинная диагностика, валидация NGS-данных, исследования точечных мутаций.

Принцип работы капиллярного секвенатора
разделение ДНК-фрагментов по длине за счёт электрофореза в капилляре с полимерным буфером;
детекция флуоресцентно меченных терминаторных нуклеотидов (ddNTP);
преобразование оптических сигналов в нуклеотидную последовательность.

Основные компоненты системы
капилляр (кварцевое волокно с полимером внутри);
источник высокого напряжения для электрофореза;
лазер для возбуждения флуорофоров;
детектор (фотомультипликатор или CCD-камера);
термостатируемая камера для капилляра;
автосэмплер для загрузки образцов;
ПО для анализа данных.



Этапы процесса секвенирования

подготовка реакционной смеси (ПЦР-продукт + праймер + терминаторы с флуорофорами);
термическая циклизация для синтеза меченных фрагментов;
загрузка образца в капилляр;
электрофорез с разделением фрагментов по размеру;
лазерная детекция флуоресценции в зоне детектора;
сбор данных и построение хроматограммы.

Особенности детекции и обработки сигналов

мультиплексная детекция (4 цвета для A, T, G, C);
коррекция спектрального перекрытия сигналов (деконволюция);
автоматическое выравнивание пиков и определение последовательности;
оценка качества прочтения (значения Q-scores).

Преимущества капиллярного секвенирования

высокая скорость анализа (1 образец — 1–2 ч);
автоматизация и минимизация ручного труда;
разрешение фрагментов с разницей в 1 н. п.;
длина прочтения до 800–1000 н. п.;
возможность высокоточной количественной оценки (например, для микросателлитов).

Ограничения метода

стоимость оборудования и расходных материалов;
ограниченная пропускная способность (по сравнению с NGS);
сложность анализа длинных повторов и гомополимерных участков;
требования к чистоте образца (отсутствие ингибиторов, оптимальная концентрация).

Типичные области применения

диагностика наследственных заболеваний (мутации в конкретных генах);
валидация результатов секвенирования нового поколения (NGS);
анализ микросателлитной нестабильности (MSI);
секвенирование клонированных фрагментов (плазмиды, ПЦР-продукты);
судебно-генетическая экспертиза (STR-анализ);
филогенетические исследования (секвенирование маркерных генов).

Сравнение с другими методами секвенирования

vs. классический гель-электрофорез: выше скорость, точность и автоматизация;
vs. NGS: ниже пропускная способность, но выше точность для отдельных мишеней;
vs. нанопорового секвенирования: короче длина прочтений, но выше качество.

Заключение

капиллярное секвенирование — золотой стандарт точного анализа коротких ДНК-фрагментов;
сохраняет востребованность в клинической диагностике и исследовательской практике;
дополняет высокопроизводительные методы там, где критична точность единичных прочтений.

33. Секвенаторы нового поколения (Ion, SOLiD, пиросеквенирование, Illumina/Solexa). Полногеномное секвенирование.

Концепция NGS (Next-Generation Sequencing)

определение NGS и её принципиальное отличие от метода Сэнгера;
ключевые преимущества: высокая производительность, параллельность, снижение стоимости на базу;

общая схема рабочего процесса (подготовка библиотек → секвенирование → биоинформатический анализ).

Основные технологии NGS и их принципы

Пиросеквенирование (Roche 454):

детекция высвобождения пирофосфата (PPi) при включении нуклеотида;
люминесцентный сигнал и пошаговая подача нуклеотидов;
длина прочтений до 700–1000 пн.

Ion Torrent (полупроводниковое секвенирование):

измерение изменения pH при включении нуклеотида;
использование ион-чувствительных датчиков;
высокая скорость, но склонность к ошибкам в гомополимерных участках.

SOLiD (ligation-based sequencing):

секвенирование через лигирование олигонуклеотидных зондов;
двухбазовая кодировка (color space);
повышенная точность за счёт повторного чтения каждой позиции.



Illumina/Solexa (синтез с обратимо терминирующими нуклеотидами):
флуоресцентно меченные dNTP с блокирующей группой;
циклическое добавление, возбуждение и деблокировка;
высокая точность и производительность (миллиарды прочтений за запуск).

Сравнительный анализ технологий
длина прочтений (от 50 пн у SOLiD до ~1000 пн у 454);
точность (ошибки: гомополимеры у Ion, substitution у SOLiD, высокие показатели у Illumina);
пропускная способность (млн–млрд прочтений за цикл);
стоимость на мегабазу и время цикла;
типичные области применения каждой платформы.

Полногеномное секвенирование (WGS): суть и этапы
цель: получение полной последовательности генома организма;
этапы:
выделение ДНК и контроль качества;
фрагментация ДНК и подготовка библиотек (адаптеры, индексация);
амплификация библиотек (кластеризация на проточной кювете у Illumina);
секвенирование в параллельном режиме;
сборка генома (de novo или привязка к референсу);
аннотирование и интерпретация вариантов.

Технические вызовы и решения в WGS
сборка повторов и сложных регионов;
покрытие (depth of coverage) и его влияние на точность;
ошибки секвенирования и методы их коррекции;
вычислительные ресурсы и алгоритмы сборки (SPAdes, SOAPdenovo, HISAT2, etc.).

Области применения полногеномного секвенирования
медицинская геномика (диагностика редких заболеваний, онкогеномика);
популяционная генетика и эволюционные исследования;
микробиология (метагеномный анализ, патоген-трекинг);
селекция и агрогеномика;
персонализированная медицина (фармакогеномика, риск-профилирование).

Преимущества и ограничения NGS в контексте WGS
Преимущества:
комплексное покрытие генома;
выявление структурных вариаций, CNV, SNP;
масштабируемость и снижение стоимости.
Ограничения:
высокие требования к биоинформатической обработке;
сложность интерпретации «тёмных» регионов генома;
этические и конфиденциальные аспекты работы с геномными данными.

Современные тенденции и перспективы
переход к длинным прочтениям (PacBio, Oxford Nanopore) как дополнение к NGS;
интеграция мультиомных данных (геномика + транскриптомика + эпигеномика);
ускорение и удешевление протоколов (например, PCR-free библиотеки);
облачные платформы для анализа геномов.

Заключение
NGS радикально изменила масштабы и доступность геномных исследований;
разные платформы дополняют друг друга, выбирая оптимальную технологию под задачу;
полногеномное секвенирование стало ключевым инструментом фундаментальной и прикладной геномики.

34. Роль биоинформатики в современной молекулярной генетике и биотехнологии.

Определение и междисциплинарный характер биоинформатики
что такое биоинформатика (синтез биологии, информатики, математики и статистики);
исторический контекст: от первых баз данных до Big Data в биологии;
ключевые задачи: хранение, анализ и интерпретация биологических данных.

Основные направления биоинформатики в молекулярной генетике
аннотация геномов (поиск генов, регуляторных элементов, повторов);
сравнительная геномика (выявление консервативных и видоспецифичных участков);
транскриптомика (анализ экспрессии генов, альтернативного сплайсинга);



эпигеномика (анализ метилирования, модификаций гистонов, открытых участков хроматина); изучение некодирующих РНК и их функций.

Биоинформатические инструменты для анализа последовательностей
алгоритмы выравнивания (BLAST, Smith-Waterman, Needleman-Wunsch);
программы для сборки геномов (SPAdes, Velvet, SOAPdenovo);
предсказание структуры и функции белков (SWISS-MODEL, Phyre2);
филогенетический анализ (MEGA, PHYLIP, RAxML).

Роль в высокопроизводительных технологиях (NGS, микрочипы, масс-спектрометрия)
обработка «сырых» данных секвенирования (качество прочтений, фильтрация, тримминг);
картирование прочтений на референсный геном (BWA, Bowtie, STAR);
выявление генетических вариантов (SNP, INDEL, CNV) — GATK, Samtools;
анализ данных RNA-seq, ChIP-seq, ATAC-seq;
интеграция мультиомных данных.

Применение в биотехнологии и синтетической биологии
дизайн праймеров и олигонуклеотидов (Primer3, OligoCalc);
оптимизация кодонов для гетерологической экспрессии;
моделирование метаболических путей и сетей (KEGG, BioCyc);
компьютерный дизайн белков и ферментов (Rosetta, AlphaFold);
разработка генетических конструкций и «биокирпичей» (BioBricks).

Базы данных и ресурсы как основа биоинформатического анализа
геномные репозитории (GenBank, EMBL, DDBJ);
аннотированные геномы (Ensembl, UCSC Genome Browser);
белковые базы (UniProt, PDB);
пути и сети (KEGG, Reactome, STRING);
литературные базы (PubMed, PMC).

Методы машинного обучения и искусственного интеллекта
предсказание функций неизвестных генов и белков;
классификация вариантов по патогенности (SIFT, PolyPhen-2);
анализ изображений (микроскопия, гистология);
прогнозирование взаимодействий белок-белок, белок-ДНК;
генеративные модели для дизайна молекул.

Практическое значение для медицины и сельского хозяйства
персонализированная геномика и диагностика наследственных заболеваний;
онкогеномика (выявление драйверных мутаций, таргетная терапия);
фармакогеномика (прогнозирование ответа на лекарства);
селекция растений и животных (геномная селекция, CRISPR-дизайн);
мониторинг патогенов и эпидемиология (генотипирование вирусов, бактерий).

Вызовы и перспективы развития
обработка и хранение Big Data в биологии;
стандартизация форматов и протоколов;
воспроизводимость анализов и «кризис репликации»;
этика и безопасность генетических данных;
интеграция экспериментальных и вычислительных подходов.

Заключение: синтез биологии и вычислений
биоинформатика как неотъемлемый инструмент современной молекулярной биологии;
усиление роли вычислительных методов в открытии и разработке;
перспективы: системная биология, цифровой двойник организма, автоматизация экспериментов.

35. Международные базы данных по молекулярной биологии и генетике.

Значение биологических баз данных
роль в хранении, систематизации и обмене научными данными;
принципы открытости и доступности (open access);
стандартизация форматов данных.
Основные типы биологических данных и соответствующие им базы
нуклеотидные последовательности;
белковые последовательности и структуры;
геномные аннотации;
функциональные и патогенные варианты;



биохимические пути и взаимодействия.
Крупнейшие репозитории нуклеотидных последовательностей
GenBank (NCBI, США);
EMBL-Bank (EMBL-EBI, Европа);
DDBJ (Япония);
принцип тройного партнёрства (INSDC) и синхронизация данных.
Базы данных геномов и аннотаций
Ensembl (EMBL-EBI/Sanger);
UCSC Genome Browser (США);
RefSeq (NCBI) — эталонные последовательности;
особенности представления и поиска геномных данных.
Ресурсы по белковым последовательностям и структурам
UniProt (унифицированная база белков);
PDB (Protein Data Bank) — трёхмерные структуры;
InterPro — домены и функциональные мотивы.
Базы данных генетических вариантов и патологий
dbSNP (полиморфизмы);
ClinVar (клинически значимые варианты);
OMIM (наследственные заболевания);
COSMIC (мутации при раке).
Ресурсы по биохимическим путям и взаимодействиям
KEGG (метаболические пути);
Reactome (реакции и процессы);
STRING (сети белок-белковых взаимодействий).
Литературные и интегративные базы
PubMed/PMC (научные публикации);
Gene (NCBI) — интеграция данных о генах;
BioProject и BioSample (описание исследований и образцов).
Особенности доступа и поиска данных
поисковые интерфейсы (Entrez, EBI Search);
API и пакетные загрузки;
форматы данных (FASTA, GenBank, GFF/GTF, PDB).
Заключение: роль и перспективы
критическая важность для воспроизводимости исследований;
вызовы: рост объёмов данных, интеграция разнородных ресурсов;
тенденции: облачные платформы, AI-ассистированный анализ.

36. Направленная модификация белков. Методы направленного мутагенеза.

Суть и цели направленной модификации белков
определение направленного (сайт-направленного) мутагенеза;
основные задачи: изучение структуры/функции белка, оптимизация активности, стабильность, специфичность;
области применения (биотехнология, медицина, фундаментальные исследования).
Принципы сайт-направленного мутагенеза
целенаправленное внесение изменений в ДНК-последовательность гена;
соответствие изменений заданным аминокислотным заменам;
использование ПЦР и рекомбинантных технологий.
Основные методы направленного мутагенеза
ПЦР-основанные методы:
мегапраймерный мутагенез;
метод с перекрывающимися праймерами (overlap extension PCR);
быстрый сайт-направленный мутагенез с двумя праймерами.
Использование коммерческих наборов (QuikChange и аналоги):
принцип работы на основе плазмидной ДНК и термостабильной полимеразы;
денатурация, отжиг мутагенных праймеров, элонгация, удаление матричной ДНК.
Методы с использованием рестрикционных эндонуклеаз и лигаз:
встраивание синтезированных фрагментов в заданный сайт.
Современные технологии на основе CRISPR/Cas9:
точное редактирование генома *in vivo* и *in vitro*;



возможность внесения точечных замен, делеций, вставок.
Этапы эксперимента по направленному мутагенезу
дизайн мутагенных праймеров (выбор сайта, длина, T_m , отсутствие димеров);
амплификация мутантной ДНК;
трансформация компетентных клеток;
отбор клонов и скрининг (ПЦР, рестрикционный анализ, секвенирование);
экспрессия мутантного белка и функциональная проверка.
Биоинформатическая поддержка
программы для дизайна праймеров (Primer3, NEBaseChanger);
предсказание структурных последствий мутаций (SWISS-MODEL, PyMOL);
анализ консервативности аминокислотных позиций (Multiple Sequence Alignment).
Примеры практических приложений
улучшение термостабильности ферментов;
изменение субстратной специфичности (например, для биокатализа);
создание флуоресцентных белковых меток с новыми свойствами;
разработка терапевтических белков с повышенной активностью/сниженной иммуногенностью.
Ограничения и сложности методов
риск вторичных мутаций при ПЦР;
низкая эффективность трансформации для некоторых конструкций;
необходимость тщательной валидации (секвенирование, функциональный анализ);
технические требования к оборудованию и реагентам.
Заключение: перспективы развития
интеграция с высокопроизводительным скринингом (directed evolution);
сочетание с методами белковой инженерии (фаговый дисплей, рибосомный дисплей);
рост роли вычислительных методов в предсказании эффектов мутаций.

37. Случайный мутагенез и селекция белков с определенной функцией (молекулярная эволюция).

Введение: концепция молекулярной эволюции в белковой инженерии
определение случайного (ненаправленного) мутагенеза;
отличие от сайт-направленного мутагенеза;
основная идея: создание генетического разнообразия → селекция по заданному признаку;
ключевые термины: библиотека мутантов, селективное давление, эволюционный отбор.
Методы индукции случайных мутаций
Химический мутагенез (например, нитрозогуанидин, этилметансульфонат);
Физическое воздействие (УФ-излучение, ионизирующая радиация);
Ошибочные ПЦР-методы (пониженная точность Taq-полимеразы, вариация концентрации Mg^{2+});
Мутагенные плазмиды/бактерии (штаммы с дефектной системой репарации);
ДНК-шаффлинг (рекомбинация фрагментов гомологичных генов).
Создание библиотек мутантных белков
выбор вектора и хозяина для экспрессии (бактериальные, дрожжевые, фаговые системы);
обеспечение достаточного размера библиотеки (тысячи–миллионы клонов);
контроль уровня мутагенеза (1–5 замен на ген для баланса разнообразия и функциональности).
Стратегии селекции и скрининга
Отбор по фенотипу (рост на селективных средах, устойчивость к ингибиторам);
Флуоресцентная активация клеточной сортировки (FACS) для белков с оптическими метками;
Фаговый дисплей (отбор связывающих вариантов через аффинную очистку);
Рибосомный дисплей (in vitro селекция без клеточных систем);
Высокопроизводительные анализы (микрофлюидика, капельная ПЦР).
Этапы экспериментального цикла «мутагенез → селекция»
генерация библиотеки мутантов;
экспрессия вариантов белка;
применение селективного давления (субстрат, температура, pH, лиганд и т. п.);
изоляция успешных клонов;
амплификация и повторный цикл (итеративная эволюция).
Биоинформатическая поддержка и анализ результатов
секвенирование отобранных вариантов;
выявление «горячих точек» мутаций и кооперативных замен;



моделирование структурно-функциональных связей (МД-симуляции, докинги); построение филогенетических деревьев мутантных линий.

Примеры успешного применения

эволюция ферментов с новой субстратной специфичностью (эстеразы, липазы); повышение термостабильности белков; создание антител и связывающих белков с высоким аффинитетом; оптимизация биокатализаторов для промышленных процессов.

Преимущества и ограничения метода

Преимущества:

не требует знания структуры белка; позволяет находить неочевидные решения; масштабируемость при использовании высокопроизводительных платформ.

Ограничения:

большой объём скрининга (множество «пустых» вариантов); риск потери функции при избыточном мутагенезе; трудоёмкость итеративных циклов.

Современные тенденции и комбинации с другими методами

сочетание с рациональным дизайном (полурациональный мутагенез); использование ИИ для предсказания перспективных мутаций; автоматизация скрининга на микрофлюидных чипах; эволюция мультидоменных белков и метаболических путей.

Заключение: значение молекулярной эволюции в биоинженерии

метод как аналог естественного отбора в лабораторных условиях; вклад в фундаментальное понимание структуры-функции белков; перспективы для синтеза биокатализаторов, терапий и биоматериалов.

38. Создание химерных и мультифункциональных белков.

Определение понятий: химерный белок, мультифункциональный белок.

Актуальность направления в биотехнологии и медицине.

Основные сферы применения (терапия, диагностика, биокатализ, биосенсоры).

Принципы конструирования химерных белков

Слияние функциональных доменов из разных белков.

Роль линкеров и спейсеров в стабилизации структуры.

Выбор родительских белков: критерии совместимости доменов.

Примеры типовых химер (рецептор-фермент, антитело-токсин, флуоресцентный маркер-белок).

Методы создания химерных конструкций

Генетическая инженерия: ПЦР-основанные методы слияния генов.

Рекомбинантные технологии (использование векторов, сайтов клонирования).

Сайт-направленный мутагенез для оптимизации стыков.

Биоинформатический дизайн: предсказание структуры и стабильности.

Подходы к созданию мультифункциональных белков

Интеграция нескольких активных центров в одной полипептидной цепи.

Использование модульных доменов (SH2, PDZ, GFP и др.).

Конструирование биспецифических антител и фьюжн-белков.

Направленная эволюция для отбора мультифункциональных вариантов.

Ключевые технологические этапы

Дизайн последовательности и моделирование структуры.

Синтез гена и клонирование в экспрессионный вектор.

Экспрессия в гетерологических системах (бактерии, дрожжи, клетки млекопитающих).

Очистка и характеристика полученного белка.

Функциональная валидация: тесты на активность, специфичность, стабильность.

Примеры успешных разработок

Биспецифические антитела для иммунотерапии рака.

Фермент-флуоресцентные химеры для визуализации биохимических реакций.

Гибридные токсины для селективного уничтожения клеток.

Мультидоменные белки-скаффолды для сборки метаболических путей.

Проблемы и ограничения

Нарушение фолдинга при слиянии доменов.



	<p>Потеря активности одного или обоих функциональных модулей. Иммуногенность химерных белков <i>in vivo</i>. Технические сложности экспрессии крупных конструкций. Перспективы развития Использование ИИ для предсказания оптимальных химерных конструкций. Разработка «умных» белков с регулируемой активностью. Применение в синтетической биологии и тканевой инженерии. Создание мультифункциональных биоматериалов.</p>
39. Создание белков с гибридными свойствами. Создание искусственных белков <i>de novo</i>	<p>Значение белковой инженерии в современной науке и биотехнологии. Основные задачи: получение белков с заданными/улучшенными свойствами, создание принципиально новых функций. Понятие гибридных белков Определение: что такое гибридный (химерный) белок. Принципы конструирования: слияние доменов, объединение функциональных фрагментов разных белков. Примеры успешных гибридов (например, фьюжн-белки для терапии, биосенсоры). Методы создания гибридных белков Генетическая рекомбинация и клонирование (<i>fusion genes</i>). Сайт-направленный мутагенез и редизайн интерфейсов. Использование линкеров и спейсеров для оптимизации структуры. Биоинформатические инструменты для предсказания совместимости доменов. Создание белков <i>de novo</i>: основные подходы Что значит «<i>de novo</i>»: проектирование с нуля без опоры на природные аналоги. Вычислительное проектирование: алгоритмы <i>Rosetta</i>, <i>AlphaFold</i>, молекулярная динамика. Рациональный дизайн vs. направленная эволюция. Синтез генов и экспрессия искусственных последовательностей. Технологические этапы <i>de novo</i>-проектирования Выбор целевой структуры/функции. Моделирование третичной структуры и стабилизирующих взаимодействий. Оптимизация аминокислотной последовательности. Экспериментальная валидация: экспрессия, очистка, функциональная проверка. Примеры и достижения Искусственные ферменты с новой каталитической активностью. Структурные белки с заданными механическими свойствами. Терапевтические белки <i>de novo</i> (например, мини-антитела, ингибиторы). Проблемы и ограничения Сложность предсказания фолдинга и стабильности. Низкая эффективность экспрессии гетерологических последовательностей. Трудности в достижении заданной функции <i>in vivo</i>. Этические и биобезопасные аспекты. Перспективы Интеграция ИИ и высокопроизводительного скрининга. Применение в медицине, биоремедиации, материаловедении. Развитие «синтетической биологии» и биофабрикации.</p>



4. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ

4.1. Порядок проведения промежуточной аттестации

Промежуточная аттестация проводится в форме зачета. Промежуточная аттестация может быть выставлена по итогам текущей успеваемости при следующих условиях:

- выполнение всех заданий текущей аттестации с оценкой не ниже хор.;
- посещение не менее чем 80% всех занятий.

Оценочные средства для промежуточной аттестации представлены перечнем теоретических вопросов к зачету.

При подведении итогов учитываются результаты текущей аттестации.

4.2. Критерии оценивания промежуточной аттестации по видам оценочных средств

Критерии оценивания письменных вопросов (зачет)

Неудовлетворительно:

Полнота ответа – Студент не знает значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, отсутствуют межпредметные связи.

Структурированность – Нет.

Логика изложения – Отсутствует логика в изложении материала.

Ответы на дополнительные вопросы – Нет.

Удовлетворительно:

Полнота ответа – Студент усвоил только основной материал, но не знает отдельных деталей, допускает неточности, не достаточно правильные формулировки, ответ отличается низким уровнем самостоятельности.

Структурированность – Не всегда прослеживается четкость и структурированность.

Логика изложения – Не всегда прослеживается логика изложения материала.

Ответы на дополнительные вопросы – Затрудняется с ответами, ответ отличается низкой самостоятельностью.

Хорошо:

Полнота ответа – Студент твердо знает учебно-программный материал, грамотно и по существу излагает его; ответ отличается меньшей обстоятельностью.

Структурированность – Ответ структурирован, грамотен, обстоятелен.



Логика изложения – Корректно и логически стройно его излагает ответ.
Ответы на дополнительные вопросы – Не затрудняется с ответом при видоизменении задания, не всегда ответы на дополнительные вопросы отличаются полнотой, структурированностью.

Отлично:

Полнота ответа – Студент полно излагает учебный материал на основе лекций и дополнительной литературы, осуществляет межпредметные связи; владеет понятийным аппаратом и уяснил взаимосвязь основных понятий дисциплины и их значение для приобретения профессии.

Структурированность – Ответ структурирован, грамотен, обстоятелен.

Логика изложения – Корректно и логически стройно его излагает ответ.

Ответы на дополнительные вопросы – Не затрудняется с ответом при видоизменении задания, свободно справляется с поставленными задачами, ответы на дополнительные вопросы характеризуются полнотой, структурированностью.

Оценка «**Зачтено**» соответствует критерию выше удовлетворительно. Содержание материала раскрыто, требующий лишь незначительных уточнений и дополнений, которые студент может сделать самостоятельно после наводящих вопросов преподавателя. Допускаются такие незначительные недочеты в ответе студента как отсутствие самостоятельного вывода, нарушение последовательности в изложении, речевые ошибки и др.

Оценка «**Не зачтено**» соответствует критерию ниже неудовлетворительно.

Студент не может изложить содержание материала, не знает основных понятий дисциплины, не отвечает на дополнительные и наводящие вопросы преподавателя.

4.3. Результаты промежуточной аттестации и уровни сформированности компетенций

Уровни сформированности компетенций определяются следующим образом: при подведении итогов учитываются результаты текущей аттестации.

Особенности проведения процедуры оценивания результатов обучения инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья обозначены в рабочей программе дисциплины (модуля).

«1 уровень» - ознакомление (иметь общее представление, узнавать);

«2 уровень» - понимание учебного материала, излагаемого в учебнике, методической разработке или преподавателем;

«3 уровень» - умение логично, последовательно, достаточно полно и точно излагать изученный материал;



«4 уровень» - творчески использовать полученные знания.

Для удовлетворительной (положительной) оценки знаний требуется минимум 3-й уровень усвоения учебного материала, что соответствует оценке «зачтено».

Требования (критериальные показатели) к уровню освоения дисциплины

Результат зачета	Требования к знаниям
Зачтено	Содержание материала раскрыто, требующий лишь незначительных уточнений и дополнений, которые студент может сделать самостоятельно после наводящих вопросов преподавателя. Допускаются такие незначительные недочеты в ответе студента как отсутствие самостоятельного вывода, нарушение последовательности в изложении, речевые ошибки и др.
Незачтено	Студент не может изложить содержание материала, не знает основных понятий дисциплины, не отвечает на дополнительные и наводящие вопросы преподавателя.



МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Челябинский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ЧелГУ»)

Фонд оценочных средств для промежуточной аттестации по дисциплине (модулю) "Стандартизация и регламентация биоинженерной практики" по специальности 06.05.01 "Биоинженерия и биоинформатика" специализации Биоинженерия и биоинформатика ФГБОУ ВО «ЧелГУ»

Стр. 39

06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика, специализация «Биоинженерия и биоинформатика», фонд оценочных средств для промежуточной аттестации по дисциплине «Стандартизация и регламентация биоинженерной практики», год набора 2026, очная форма обучения

Проректор по учебной работе утверждено 03.03.2026 А.А. Саламатов

Ученым советом биологического факультета

Протокол заседания № 8 от 27.02.2026

Председатель Ученого совета
биологического факультета согласовано Д.С. Сташкевич

Заседанием кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии

Протокол заседания № 9 от 27.02.2026

Заведующий кафедрой согласовано А.Л. Бурмистрова

Автор (составитель) Ю.Ю. Филиппова

Структура фонда оценочных средств соответствует приказу ректора ФГБОУ ВО от 27.09.2022 № 573-1 «Об утверждении положения ФОС по ОП ВО в ФГБОУ ВО ЧелГУ»