

| | | | |
|--|--|---|--------|
| Документ подписан простой электронной подписью Информация о владельце: ФИО: Таскаев Сергей Валерьевич Должность: Ректор Дата подписания: 12.09.2025 09:48:45 Уникальный программный ключ: 04c19ed8bfb98f3b6cb77a486b9a8788b8322323 | МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ЧелГУ») | Фонд оценочных средств по дисциплине «Основы генетической инженерии» по направлению подготовки 06.03.01 «Биология» ФГБОУ ВО «ЧелГУ» | стр. 1 |
|--|--|---|--------|

**Фонд оценочных средств
для промежуточной аттестации
по дисциплине (модулю)**

Основы генетической инженерии

Направление подготовки (специальность)
06.03.01 Биология

Направленность (профиль)
Биология

Присваиваемая квалификация
Бакалавр

Форма обучения
очная

Год (ы) набора: 2025

Челябинск, 2025 г.

1. ПАСПОРТ ФОНДА ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

Направление подготовки: **06.03.01 Биология**

Направленность (профили): Биология

Дисциплина: **Основы генетической инженерии**

Семестры изучения: 7

Форма промежуточной аттестации: экзамен

2. ПЕРЕЧЕНЬ ФОРМИРУЕМЫХ КОМПЕТЕНЦИЙ

2.1. Компетенции, закреплённые за дисциплиной

Изучение дисциплины «**Основы генетической инженерии**» направлено на формирование следующих компетенций и индикаторов:

| Коды компетенции (по ФГОС) | Содержание компетенций согласно ФГОС | Коды и содержание индикаторов | Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине |
|----------------------------|--|--|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| УК-1 | Способен осуществлять поиск, критический анализ и синтез информации, применять системный подход для решения поставленных задач | УК-1.1. Выполняет поиск информации, определяет критерии системного анализа поставленных задач УК-1.2. Использует критический анализ, систематизацию и обобщение информации для решения поставленных задач | Знать: Для достижения индикатора УК-1.1.: молекулярные основы наследственности, способы введения чужеродной ДНК в клетку; основные понятия, термины генетической инженерии. Уметь: Для достижения индикатора УК-1.2.: формулировать и решать практические и научные задачи, предполагающие знание генетики; пользоваться справочной и научной литературой, а также каталогами оборудования и реактивов. Владеть: Для достижения индикатора УК-1.2.: навыками работы в молекулярно-генетической лаборатории; работы с основными лабораторными приборами (весы, рН- |

| | | | |
|------|---|--|--|
| | | | метр, центрифуга, прибор для электрофореза, автоматические пипетки и т.д.). |
| ПК-1 | Способен применять современные методы обработки, анализа и синтеза полевой, производственной и лабораторной биологической информации, правила составления научно-технических проектов и отчетов | <p>ПК-1.1 Применяет принципы анализа информации, принципы работы современной аппаратуры и вычислительных средств.</p> <p>ПК-1.2 Использует теоретические знания в лабораторной работе.</p> | <p>Знать: Для достижения индикатора ПК-1.1.: современные методы, используемые для решения теоретических и прикладных задач генетической инженерии</p> <p>Уметь: Для достижения индикатора ПК-1.1.: пользоваться справочной и научной литературой, а также каталогами оборудования и реактивов</p> <p>Владеть: Для достижения индикатора ПК-1.2.: навыками работы с основными лабораторными приборами (весы, рН-метр, центрифуга, прибор для электрофореза, автоматические пипетки и т.д.)</p> |

3. СОДЕРЖАНИЕ ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

3.1 Виды оценочных средств

| № п/п | Код компетенции/планируемые результаты обучения | Контролируемые темы/разделы | Наименование оценочного средства для текущего контроля | Наименование оценочного средства на промежуточной аттестации № задания |
|-------|---|-----------------------------|--|--|
| 1 | УК-1 | Раздел 1. Введение. | Устный | Вопросы |

| | | | | |
|---|--|--|--|---------------------------------|
| | <p>Знать: Для достижения индикатора УК-1.1.: молекулярные основы наследственности, способы введения чужеродной ДНК в клетку; основные понятия, термины генетической инженерии.</p> <p>Уметь: Для достижения индикатора УК-1.2.: формулировать и решать практические и научные задачи, предполагающие знание генетики; пользоваться справочной и научной литературой, а также каталогами оборудования и реактивов.</p> <p>Владеть: Для достижения индикатора УК-1.2.: навыками работы в молекулярно-генетической лаборатории; работы с основными лабораторными приборами (весы, рН-метр, центрифуга, прибор для электрофореза, автоматические пипетки и т.д.).</p> | <p>Раздел 2: Транспозоны Раздел 3: Плазмиды Раздел 4: Фаги Раздел 5: Векторы для клонирования в бактериях Раздел 6: Работа в молекулярно-генетической лаборатории Раздел 7. Работа в молекулярно-генетической лаборатории. Основные лабораторные методы.</p> | <p>опрос, выполнение лабораторных работ</p> | <p>к экзамену 1-26</p> |
| 2 | <p>ПК-1 Знать: Для достижения индикатора ПК-1.1.: современные методы, используемые для решения теоретических и прикладных задач генетической инженерии</p> <p>Уметь: Для достижения индикатора ПК-1.1.: пользоваться справочной и научной литературой, а также каталогами оборудования и реактивов</p> <p>Владеть: Для достижения индикатора ПК-1.2.: навыками работы с</p> | <p>Раздел 6. Анализ генов и геномов. Раздел 7. Работа в молекулярно-генетической лаборатории. Основные лабораторные методы</p> | <p>Устный опрос, реферативные сообщения, выполнение лабораторных работ</p> | <p>Вопросы к экзамену 20-26</p> |

| | | | |
|--|--|--|--|
| основными лабораторными приборами (весы, рН-метр, центрифуга, прибор для электрофореза, автоматические пипетки и т.д.) | | | |
|--|--|--|--|

Примечание: типовые задания, критерии и показатели оценивания в рамках текущего контроля представлены в рабочей программе дисциплины (модуля). Полные комплекты оценочных средств и контрольно-измерительных материалов хранятся на кафедре.

3.2 Содержание оценочных средств

Оценочные средства промежуточной аттестации по дисциплине «Цитология и гистология» представлены вопросами к экзамену по дисциплине.

3.1.1 Теоретические вопросы к экзамену

1. Основные типы бактериальных транспозонов: IS-элементы, Mu-подобные фаги.

Вставочные (инсерционные) последовательности (IS-элементы) - простейший тип мигрирующих элементов, их величина не превышает 1500 пар оснований (в среднем 800- 1400). IS-элементы самостоятельно не реплицируются и не кодируют распознаваемых фенотипических признаков. Содержащиеся в них гены обеспечивают только их перемещение из одного участка в другой.

Основные функции IS-последовательностей — регуляция активности генов бактериальной клетки (могут инактивировать гены, в которые включились, или, встраиваясь в хромосому, проявлять эффект промотора, включающего либо выключающего транскрипцию соответствующих генов), индукция мутаций типа делеций или инверсий (при перемещении) и дупликаций (при встраивании в хромосому), координация взаимодействий плазмид, траспозонов и профагов (как между собой, так и бактериальной хромосомой).

Mu-подобные фаги — умеренные бактериофаги γ -протеобактерий, сложнейшие транспозоны, которые помимо генов транспозиции/интеграции несут детерминанты сборки фаговых частиц и имеют внеклеточную форму существования. При первичной интеграции в геном инфицированной клетки используют механизм консервативной транспозиции, а при переходе из лизогенной стадии (профага) к литической — репликативную транспозицию.

Интеграция фага Mu происходит в случайные сайты, провоцируя инсерционный мутагенез, с дупликацией 5 п.н. ДНК-мишени. При развитии литического сценария множественные копии фага вызывают фрагментацию хромосомы, что способствует упаковке в фаговые капсиды и последующей трансдукции не только вирусной ДНК, но и ближайших фрагментов ДНК-мишени. Иногда фрагменты хромосомы при упаковке вкапсид полностью заменяют фаговую ДНК.

2. Основные типы бактериальных транспозонов: Tn-элементы.

Транспозоны (Tn-элементы) состоят из 2000-25 000 пар нуклеотидов, содержат

фрагмент ДНК, несущий специфические гены, и два концевых IS-элемента. При включении в ДНК бактерий транспозоны вызывают дубликации, при выходе из определённого участка ДНК

делений, при выходе и включении обратно с поворотом фрагмента на 180 градусов— инверсии. Транспозоны не способны к самостоятельной репликации и размножаются только в составе бактериальной хромосомы. Каждый транспозон обычно содержит гены, приносящие важные для бактерии характеристики типа множественной устойчивости к антибактериальным агентам. Поскольку транспозоны содержат гены, определяющие фенотипически выраженные признаки (например, устойчивость к антибиотикам), то их легче обнаружить, чем IS-элементы. В общем, для транспозонов характерны те же гены, что и для плазмид (гены устойчивости к антибиотикам, токсинообразования, дополнительных ферментов метаболизма).

3. Классические транспозоны эукариот.

Транспозоны эукариот сходны по организации с мобильными генетическими элементами прокариот. Они с флангов ограничены инвертированными повторами, необходимыми для их транспозиции. Наиболее хорошо изученные транспозоны эукариот – P-элемент дрозофилы и Ac-элемент кукурузы. Они представлены в геномах в 30 – 50 копиях, содержат ген транспозазы. Этот ген имеет прерывистое строение – состоит из экзонов и интронов. РНК,

считанная с него, подвергается сплайсингу. Сплайсированная иРНК служит матрицей для синтеза транспозазы – белка, обеспечивающего перемещение элементов из одного участка генома в другой. При интеграции транспозонов в новый участок ДНК происходит дубликация сайта-мишени. P-элемент при транспозиции обычно встраивается в определенный сайт с канонической последовательностью: ГГЦАГАС.

4. Ретротранспозоны.

Ретротранспозоны - транспозоны, кодирующие ферменты типа обратной транскриптазы. Ретротранспозон - перемещающийся элемент в эукариотических организмах, имеющий гены, цикл репликации и интеграционный механизм, сходный с ретровирусами, т. е. содержащий гены, кодирующие обратную транскриптазу, протеазу, РНКазу и интегразу. Типичный ретротранспозон фланкирован длинными концевыми повторами, содержащими промотор и сигналы терминации транскрипции. Ретротранспозоны перемещаются путем обратной транскрипции РНК-копии и последующего встраивания ДНК-копии в новый сайт генома. Процесс синтеза ДНК при размножении ретротранспозонов с участием ревертазы происходит в вирусоподобных частицах, белковые компоненты которых также кодируются генами ретротранспозонов. Однако такие частицы неинфекционны, поскольку большая часть ретротранспозонов в отличие от ретровирусов не содержит гена, который мог бы кодировать белок оболочки вирусной частицы, обеспечивающей ее выход из клетки и способность к заражению других клеток. Существуют также ретротранспозоны, которые не содержат длинных концевых повторов (напр., семейство повторов L1 в геноме человека). Ретротранспозоны широко распространены у эукариот, они присутствуют в геномах дрожжей, растений, насекомых и

позвоночных, включая человека. Ретротранспозоны, или мобильные генетические элементы первого типа, состоят из двух подтипов — ретротранспозонов с длинными концевыми повторами (англ. LTR, long terminal repeats), и ретротранспозонов без длинных концевых повторов. Последние в свою очередь делятся на длинные диспергированные повторы (англ. LINE, long interspersed elements) и короткие диспергированные повторы (англ. SINE, short interspersed elements).

5. Роль транспозонов.

Некоторые этапы эволюционирования организмов были вызваны активностью мобильных элементов генома. Уже первая нуклеотидная последовательность генома человека доказала, что многие гены являются производными транспозонов. Мобильные генетические элементы могут влиять на организацию генома путем рекомбинации генетических последовательностей и входя в состав таких фундаментальных структурных элементов хроматина, как центромеры и теломеры. Мобильные элементы могут влиять на соседние гены, изменяя узоры (паттерны) сплайсинга и полиаденилирование или выполняя функции энхансера или промоторов. Транспозоны могут влиять на структуру и функции генов путем выключения и изменения функций, изменения структуры генов, мобилизации и реорганизации фрагментов генов, и изменение эпигенетического контроля генов.

6. Применение транспозонов

Генная инженерия. Поскольку мобильные элементы генома способны к встраиванию в хроматин, они используются в генной инженерии для специального и контролируемого вставки генов или участков ДНК, которые изучают ученые. Транспозоны используются для мутагенеза и для определения регуляторных элементов генома в лабораториях.

Филогенетика. Кроме использования транспозонов в генной инженерии, изучение активности транспозонов является методом филогенетики. Путем анализа и сопоставления нуклеотидных последовательностей геномов различных видов можно найти транспозоны, что имеющиеся у одних видов, но отсутствуют в других. Виды, в которых одинаковый Ретротранспозон, скорее всего получили его от общего предка. Таким образом можно получить информацию об эволюционном развитии видов и построить филогенетические деревья.

7. Плазмиды. Основные свойства бактериальных плазмид: Репликация. Интеграция. Конъюгация. Мобилизация.

Плазмиды — внехромосомные мобильные генетические структуры бактерий, представляющие собой замкнутые кольца двунитчатой ДНК. По размерам составляют 0,1—5 % ДНК хромосомы. Плазмиды способны автономно копироваться (реплицироваться) и существовать в цитоплазме клетки, поэтому в клетке может быть несколько копий плазмид. Плазмиды могут включаться (интегрироваться) в хромосому

и реплицироваться вместе с ней. Различают трансмиссивные и нетрансмиссивные плазмиды. Трансмиссивные (конъюгативные) плазмиды могут передаваться из одной бактерии в другую. Среди фенотипических признаков, сообщаемых бактериальной клетке плазмидами, можно выделить следующие:

- 1) устойчивость к антибиотикам;
- 2) образование колицинов;
- 3) продукция факторов патогенности;
- 4) способность к синтезу антибиотических веществ;
- 5) расщепление сложных органических веществ;
- 6) образование ферментов рестрикции и модификации.

Репликация плазмид происходит независимо от хромосомы с участием того же набора ферментов, который осуществляет репликацию бактериальной хромосомы. Плазмиды, имеющие значительные молекулярные размеры (более 10 мкм длины), обнаруживаются в бактериальных клетках в небольшом числе экземпляров (1 - 2 копии на хромосому), поэтому их называют малокопийными плазмидами. Автономная репликация и последующая сегрегация таких плазмид регулируются согласованно с репликацией бактериального генома и поэтому в каждой клетке содержится только одна или две копии плазмиды. О таком типе репликации говорят как о репликации со строгим контролем.

Самостоятельная репликация более мелких плазмид (0,5 - 10 мкм) подвержена менее строгому контролю и их число может достигать нескольких десятков копий на хромосому, т.е. они являются многокопийными. Такой тип репликации называется репликация с ослабленным контролем. Небольшие многокопийные плазмиды представляют собой удобный объект для генетической инженерии и их часто используют в качестве векторов при клонировании генетического материала различных организмов.

Интегрированные плазмиды репродуцируются одновременно с бактериальной хромосомой. Интеграция плазмид происходит при наличии гомологичных последовательностей ДНК, при которых возможна рекомбинация хромосомной и плазмидной ДНК (что сближает их с профагами).

Под конъюгацией понимают перенос ДНК между бактериальными клетками при их непосредственном контакте. Как правило, при конъюгации передаются плазмиды, но у некоторых организмов передаваться может и хромосомная ДНК. При конъюгации имеет место однонаправленный перенос генетического материала от клетки-донора к клетке-реципиенту.

Неконъюгативные плазмиды – мелкие плазмиды, не содержат tra-генов, неспособны

самостоятельно передаваться от одних клеток к другим. Неконъюгативные плазмиды могут быть перенесены в реципиентные клетки с помощью конъюгативных плазмид. Перенос неконъюгативных плазмид с помощью конъюгативных называется мобилизацией. Мобилизация может функционировать из-за наличия в плазмидах IS-элементов и транспозонов, которые обеспечивают образование коинтегратов. В реципиентных клетках коинтеграты распадаются на два автономных репликона.

8. Основные свойства бактериальных плазмид: Несовместимость. Поверхностное исключение. Стабильность. Фенотипические признаки.

Несовместимость. Родственные плазмиды не могут сосуществовать в одной клетке, поскольку они несовместимы.

Поверхностное исключение присуще конъюгативным плазидам. Свойство означает, что если в клетке есть определенная плазида, то другая плазмидная ДНК при конъюгации с трудом преодолевает клеточную стенку.

Стабильность. Надёжность числа копий сайты *ori*, *inc*. Точное распределение по дочерним клеткам белок *par*. Разрешение коинтеграгов.

Придают клеткам различные фенотипические признаки: 1) устойчивость к антибиотикам, ионам тяжелых металлов, мутагенам (R-плазмиды); 2) способность вызывать биодеградацию ксенобиотиков (D-плазмиды); 3) способность синтезировать антибиотики, бактериоцины, пигменты и др. соединения; 5) способность вызывать образование опухолей у растений (Ti-плазмиды); 6) донорные свойства (F-плазмиды) и др.

9. F-плазида. Генетика. Конъюгативность. Образование F'-плазмид.

F-плазида, или F-фактор — это конъюгативная эписома клеток *Escherichia coli* K-12, то есть клеточный элемент, необходимый для одного из типов полового процесса бактерий — конъюгации. Размер её кольцевой ДНК составляет 94,5 тысяч пар

нуклеотидов. Молекулярная масса F-фактора равна $45 \cdot 10^6$ Да. F-плазида — эписома со строгим контролем репликации. Попадая в F-клетки (клетки, не имеющие F-плазмиды до этого), эта плазида изменяет их фенотипические свойства. Клетки приобретают половые пили (выросты мембраны для конъюгации), а также чувствительность к фагам MS2, f1, f2, Q β , становятся донорами ДНК, перестают поддерживать развитие фагов T3 и T7. При конъюгации таких клеток блокируется проникновение в них донорной ДНК (проявляется свойство поверхностного исключения). За конъюгативные свойства F-плазмиды отвечает *tra*-область генома, в которую входит 24 гена, сгруппированных в три оперона. За автономную репликацию F-плазмиды отвечают *гер*-гены. За распределение молекул плазмидной ДНК по дочерним клеткам отвечают гены области *par*. Рядом с областью *par* находится ген *rif*, продукт которого исключает развитие в клетке фагов T3 и T7. Структурными компонентами, обеспечивающими интеграцию F-плазмиды в бактериальную хромосому, являются элементы IS2, IS3A, IS3B и Tn1000 (они представляют собой последовательности нуклеотидов), входящие в состав плазмидной ДНК. Они взаимодействуют с аналогичными элементами бактериальной ДНК через сайтспецифическую рекомбинацию и встраиваются в неё в разных местах и направлениях в зависимости от локализации и направления бактериальных элементов. Клетка после интеграции в её ДНК F-плазмиды приобретает свойства Hfr-клетки, то есть способна с высокой частотой направленно передавать свои гены другим клеткам. F-плазида, интегрированная в хромосому, может из неё исключаться. При неправильном исключении F-плазмиды образуется F'-плазида, то есть F-плазида, содержащая в своём составе гены бактериальной хромосомы. Если при вычлениении F'-плазмиды из бактериальной хромосомы хоть какие-то нуклеотиды в *tra*-опероне выпадают, то образовавшаяся F-плазида будет неконъюгативной (не сможет входить в клетки-реципиенты). Для сохранения репликонных свойств (способности самовоспроизводиться) F'-плазида обязательно должна содержать область *гер*.

10. R-плазида. Плазида ColE1.

R-плазмиды – это плазмиды, детерминирующие множественную лекарственную устойчивость (или резистентность, откуда и название) бактериальной клетки к антибактериальным веществам (прежде всего антибиотикам). Состав R-плазмиды определяется наличием в нем двух основных оперонов. Поэтому эта плазида может находиться в двух формах. Если в состав R-плазмиды входит tra-оперон, то в этом случае R-плазида является конъюгативной. Tra-оперон в составе этой плазмиды называется RTF-фактор (resistance transfer factor – фактор, передающий устойчивость). Гены, детерминирующие устойчивость к антибиотикам, формируют так называемый g-оперон (если быть более точным, то устойчивость к каждому антибиотику детерминирует отдельный g-оперон – т.е. в состав R-плазмиды входит несколько g-оперонов), который, в свою очередь, тоже может существовать как самостоятельная плазида. Другими словами, конъюгативная R-плазида состоит из двух плазмид: RTF-фактора и g-фактора (что можно понимать, как включение меньшей g-плазмиды в состав большей RTF-плазмиды).

Col-плазмиды. Col-факторы, или факторы колициногенности определяют способность бактериальных клеток штаммов *E. coli* синтезировать белки - колицины, вызывающие гибель клеток, не имеющих иммунитета к колицину данного типа. Col-плазмиды подразделяют на 2 группы. Феномен колициногенности был открыт А. Gratia в 1925 году у бактерий штамма *E. coli*. Как оказалось позднее, плазмиды колициногенности достаточно широко распространены и отличаются размерами, копийностью, принадлежностью к разным группам несовместимости.

Одна бактериальная клетка может нести несколько разных Col - плазмид. Из чего можно сделать вывод о принадлежности указанных плазмид к разным группам несовместимости и, следовательно, отсутствию филогенетического родства между ними. Среди Col - плазмид встречаются как конъюгативные (ColIb, ColV и др.), так и неконоъюгативные (ColE1, ColE2 и др.) плазмиды.

11. Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*. Плазмиды грамположительных бактерий

Ti-плазида, индуцирующая опухоль плазида. Плазида почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, T-участок которой способен включаться в ядерную ДНК реципиентной клетки двудольных растений, что приводит к образованию специфических опухолей (корончатых галлов). У разных штаммов бактерий эта плазида кроме T-ДНК содержит область, кодирующую функцию конъюгации (Tra), область репликации (Ori V) и область вирулентности (Vir). Последовательности Ti-плазмиды, фланкирующие T-ДНК (пограничные или концевые области), играют важную роль в интеграции в растительный геном и содержат несовершенные прямые повторы по 24—25 п.н. В корончатых галлах разные штаммы *Agrobacterium tumefaciens* индуцируют синтез разных опинов (октопина, нопалина, агропина), в соответствии с чем различают октопиновые или нопалиновые Ti- плазмиды. Ti-плазмиды широко используют в качестве векторов в генной инженерии растений. Для этого переносимый (целевой) ген вставляется в Ti-плазмиду вместо области T-ДНК. Ti-плазида без T-ДНК называется обезоруженной.

Многокопийные плазмиды грамположительных бактерий размером до 10 kb, как правило, реплицируются по механизму "катыщегося кольца" (плазмиды RCR-типа). В процессе копирования плазмид RCR-типа образуются промежуточные структуры, напоминающие греческую букву, сигма (σ) и выявляются интермедиаты в виде

однонитевой ДНК. Кроме того, белки репликации плазмид RCR-типа (Rep-белки) и сайты инициации вегетативной репликации (dso и sso) характеризуются рядом отличительных особенностей. Грамотрицательные бактерии имеют дополнительный барьер проницаемости в виде внешней мембраны, через которую не проникают белковые молекулы. Поэтому некоторые ферменты, например фосфатазы, которые обычно секретируются грамположительными бактериями, задерживаются у них в периплазме. Однако и среди грамотрицательных бактерий есть виды и штаммы, способные продуцировать внеклеточные белки. Так, штаммы *E. coli*, несущие плазмиду, детерминирующую синтез гемолизина, приобретают способность и к его секреции. Первоначально гомолизин, по-видимому, поступает в периплазматическое пространство. Для выведения его из клетки необходим синтез двух белков, кодируемых той же плазмидой. Эти белки встраиваются во внешнюю мембрану и обеспечивают энергозависимое перемещение гомолизина наружу.

12. Природная генная инженерия плазмид

В мире микроорганизмов плазмиды играют роль своеобразных посредников при межклеточном обмене генами. Обычно о присутствии плазмид в бактериальной клетке судят по проявлению определенных признаков, к которым относятся устойчивость к отдельным лекарственным препаратам, способность к переносу генов при конъюгации, синтез веществ

антибиотической природы, способность использовать некоторые сахара или обеспечивать деградацию ряда веществ. Из перечисленного выше видно, что плазмиды делают возможным существование организмов в более широком диапазоне условий внешней среды, т.е. действуют как факторы адаптации. Большую группу составляют плазмиды с нерасшифрованными функциями; такие плазмиды выявляют с использованием физико-химических методов. Большинство бактериальных плазмид имеет фактор несовместимости и фактор переноса. Они несут множество специальных, детерминируемых каждой отдельной плазмидой маркеров, таких как устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам, ультрафиолетовому облучению, способность к биосинтезу токсинов. В 60-70 годы прошлого века накопилось множество фактов, свидетельствующих о роли плазмид, преимущественно крупных, в процессе быстрого распространения в клинике устойчивых штаммов бактерий. И тогда закономерно встал вопрос о происхождении этих плазмид: присутствовали ли они в клетках патогенных бактерий изначально (до применения антибиотиков), а затем просто произошло увеличение их численности, или же они сформировались в условиях интенсивного использования различных антибиотиков.

13. Понятие о фагах. Фаг λ . Генетика.

Бактериофаги, или фаги - вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки и клетки архей. Чаще всего бактериофаги размножаются внутри бактерий и вызывают их лизис. Как правило, бактериофаг состоит из белковой оболочки и генетического материала одноцепочечной или двуцепочечной нуклеиновой кислоты (ДНК или, реже, РНК).

Фаг лямбда (фаг λ) — это умеренный бактериальный вирус *E. coli* двухцепочечной геномной ДНК. Был впервые обнаружен Э. Ледербергом в 1950 году (Е.М. Lederberg, 1950). Основное отличие – могут быть в 3-х состояниях: Вирион, Вегетативный фаг,

Профаг. Длинный хвостовой отросток, ДНК 2-х цепочечная, линейная внутри головки. На 5'-конце каждой ее цепи имеется одноцепочечная последовательность из 12 нуклеотидов – липкие концы (cos-сайты). Сразу же после проникновения фаговой ДНК в бактериальную клетку, липкие концы ДНК ковалентно соединяются ДНК-лигазой клетки-хозяина и образуется кольцевая молекула. Далее, как правило, эта кольцевая молекула бактериофаговой ДНК не приступает к транскрипции, а встраивается в бактериальную хромосому. Установлено, что гены фага λ кодируют синтез четырех регуляторных белков, один из которых репрессорный белок cI (кодируется геном cI) блокирует развитие событий литического цикла, а антирепрессорный белок Cro (кодируется геном cro), наоборот, запускает их. После поступления ДНК фага λ в клетку, выбор между литическим и лизогенным путями развития зависит от относительной скорости накопления регуляторных белков: если преобладает антирепрессорная функция белка Cro , торазвиваются события литического цикла, если успевает проявиться функция репрессорного белка cI , литический цикл не осуществляется, так как белок cI связывается с ДНК фага λ в особых участках, препятствуя транскрипции фаговых генов.

Встраивание ДНК фага λ в бактериальную хромосому осуществляется согласно интегративной модели А.Кемпбелла. Этот процесс называется сайт-специфической рекомбинацией, так как встраивание ДНК фага λ осуществляется в одном и том же месте (сайте) между генами gal и bio и не зависит от hes А-системы бактериальной клетки. За интеграцию ДНК фага λ ответственен фермент лямбда-интеграза. Этот фермент узнает дверазные последовательности – одну в хромосомной ДНК ($att \lambda$), а другую в ДНК фага ($b2$). Затем происходит разрыв обеих молекул ДНК и последующее их перекрестное воссоединение. После этого ДНК фага λ реплицируется с клеточной ДНК как единая структура, и все дочерние клетки при делении получают копию фаговой ДНК в составе хромосомы. Подобные клетки называются лизогенными, а ДНК фага λ в них – профагом.

14. Фаг λ . Механизм лизогении. Получение необычных трансдуцирующих фагов.

Лизогенный цикл, или лизогения (англ. Lysogenic cycle) — тип жизненного цикла бактериофагов, при котором фаг встраивает свой геном в геном бактерии и удваивается при каждом делении клетки (такая стадия жизненного цикла вируса называется профагом), то есть не убивает клетку-хозяина сразу, в отличие от литического цикла. Лизогения запускается при блокировке литического цикла. Так, баланс между литическим и лизогенным циклом у фага λ зависит от двух белков: репрессора, необходимого для лизогении, и белка Cro , без которого полный литический цикл невозможен. Эти белки синтезируются на ранней стадии и при литическом цикле, и при лизогенном. Эти два белка конкурируют за связывание с определённым оператором. Если белок cII , необходимый для перехода к лизогении, сможет стимулировать образование такого количества репрессора, чтобы он противодействовал Cro , то будет сохраняться лизогения, в противном случае фаг переключится на литическую программу. Именно белок- репрессор, кодируемый геном cI , поддерживает лизогению и блокирует транскрипцию ранних генов литического цикла, связываясь с ключевыми операторами O_L и O_R , предотвращая транскрипцию гена cro , без белкового продукта которого литический цикл невозможен. Чтобы связываться с операторами, репрессор должен иметь димерную форму. Более того, для поддержания лизогении необходимо присутствие его димеров. Репрессор связывается

с ДНК с помощью мотива «спираль-поворот-спираль», причём димеры репрессора связываются с оператором кооперативно.

Явление переноса генетической информации от клетки-донора к клетке-реципиенту с помощью фага было названо трансдукцией. Трансдукция основана на том, что в процессе размножения фагов в бактериях могут образовываться фаговые частицы, которые наряду с фаговой ДНК или вместо нее содержат фрагменты бактериальной ДНК. Такие фаговые частицы называются трансдуцирующими. По морфологии и адсорбционным свойствам они ничем не отличаются от обычных фаговых вирионов, но при заражении ими новых клеток передают генетические детерминанты предыдущего хозяина. В соответствии с этим принято выделять два типа трансдукции:

- генерализованную (неспецифическую, или общую);
- специфическую, или ограниченную.

В осуществлении генерализованной трансдукции бактериальный вирус является толькопереносчиком генетического материала бактерий. При специфической трансдукции вирусвключает ДНК бактерий в свой геном и передает ее, лизогенизируя бактерии-реципиенты.Генерализованная трансдукция

осуществляется дефектными частицами фагов.Образование таких частиц происходит в ходе репродукции фагов, сопровождающейсяраспадом бактериальной хромосомной ДНК. Фаговые частицы, несущие фрагменты ДНКбактерий, называются дефектными или трансдуцирующими. Если полученным фаголизатом, содержащим как нормальные, так и дефектные частицы, обработать клетки штамма-реципиента, то заражение их нормальным фагом ведет, как правило, к лизису клеток. Однако некоторые клетки инфицируют дефектные трансдуцирующие фаги. В клетки поступают короткие фрагменты двунитевой ДНК донора. Циркуляризации бактериальной ДНК при этом не происходит, рекомбинируют с ДНК реципиента линейные фрагменты ДНК донора. Рекомбинация, происходящая при общей трансдукции, находится под контролем гена *hcsA*, это общая гомологичная рекомбинация, осуществляемая путем реципрокного обмена соответствующими гомологичными участками. Возникают рекомбинанты, называемые трансдуктантами. Трансдуктанты незлизогенны и не обладают иммунитетом к фагам, так как трансдуцирующие частицы, вызвавшие их образование, не содержат фаговой ДНК.

15. Фаги лямбдоидного семейства.

Скудное строение генов, порядок. Одинаковый механизм лизогении. Белки-репрессоры: *cI* Int.

Колифаги - бактериофаги (вирусы бактерии), которые заражают бактериальную клетку, размножаются в ней и убивают её. Обычно колифаги обитают в колиморфных бактериях. Бактериофаги являются также индикаторами качества воды (степени очистки воды) из-за сходства с кишечными вирусами (энтеровирусами) человека. Они достаточно хорошо обнаруживаются. Наиболее изучены две группы:

соматические колифаги, которые инфицируют штаммы организма - хозяина (*E. Coli*) через рецепторы клеточных стенок; и F-специфические РНК-бактериофаги, которые инфицируют штаммы *E. Coli* и родственные бактерии через F- или секс-пили.

16. Фаг P1.

P1 является умеренным бактериофагом, который заражает *Escherichia coli* и некоторые другие бактерии. При прохождении лизогенного цикла геном фагов существует как

плаزمиды в бактерии, в отличие от других фагов (например, фагов лямбды), которые интегрируются в ДНК хозяина. P1 имеет головку, содержащую ДНК, прилагается к контрактильный хвост с шестью хвостовыми волокнами. P1 фаг получил исследовательский интерес, потому что он может быть использован для передачи ДНК из одной бактериальной клетки в другую в процессе, известном как трансдукция. Как он реплицирует во время своего литического цикла он захватывает фрагменты хромосомы хозяина. Если полученные вирусные частицы используются для заражения другого хозяина, захваченные фрагменты ДНК могут быть интегрированы в геном нового хозяина. Этот метод генной инженерии *in vivo* широко использовался в течение многих лет и до сих пор используется и сегодня, хотя и в меньшей степени. P1 также может быть использован для создания вектора клонирования искусственных хромосом P1, который может нести относительно большие фрагменты ДНК. P1 кодирует рекомбиназы сайта конкретных, *Cre*, который широко используется для выполнения клеточных конкретных или времени конкретных рекомбинации ДНК путем фланговых целевой ДНК с *loxP* сайтов.

Геном фага p1 умеренно велик, около 93Kbp в длину. В вирусной частице он находится в виде линейной двойной молекулы ДНК. После вставки в хост он циркуляризируется и реплицируется как плаزمиды. В вирусной частице молекула ДНК длиннее (110Kbp), чем фактическая длина генома. Он создается путем вырезания фрагмента соответствующего размера из конкатемерной цепи ДНК, имеющих несколько копий генома. Из-за этого концы молекулы ДНК идентичны. Это называется неизлечимо излишним. Это важно для ДНК, чтобы быть круговой в хозяине. Другим последствием вырезания ДНК из конкатемера является то, что данное линейное молекула может начаться в любом месте на круговом геноме. Это называется циклической перестановкой. Геном особенно богат последовательностями *Chi*, признанными бактериальной рекомбиназой *RecBCD*. Геном содержит два происхождения репликации: *oriR*, который реплицирует его во время лизогенного цикла и *oriL*, который реплицирует его на литической стадии. Геном P1 кодирует три tRNAs, которые выражаются в литической стадии.

17. Фаг M13. Эволюционные взаимоотношения плазмид и фагов.

Бактериофаг, геном которого представлен кольцевой одноцепочечной ДНК, специфичен в отношении мужских (F+) клеток *E. coli* - M13 не лизует клетку-хозяина, а фаговое потомство постоянно выходит в межклеточную среду; M13-ДНК широко используется в качестве вектора для клонирования, т.к. позволяет выделять клонированные в составе вектора фрагменты ДНК в одноцепочечной форме, что позволяет непосредственно использовать их для секвенирования по методу Сэйнджера. Капсид фага прежде всего собрано от 50 белков аминокислоты, названных pVIII (или p8), который закодирован геном VIII (или g8) в геноме фага. Для дикой частицы типа M13 это делает приблизительно 2 700 копий p8, чтобы сделать палочку приблизительно 900 нм длиной. Общие стадии к вирусному жизненному циклу: инфекция, повторение вирусного генома, собрание новых вирусных частиц и затем выпуска частиц потомства от хозяина. Волокнистое использование фага бактериальная структура, известная как F-пиль, чтобы заразить *E. coli*, с наконечником M13 p3, связывающимся с белком TolA на бактериальном pilus. Геном фага тогда передан цитоплазме бактериальной клетки, где резидентские белки преобразовывают одноцепочечный геном ДНК в двухцепочечную репликативную форму («RF»). Эта ДНК тогда служит шаблоном для

выражения генов фага.

Эволюционные взаимоотношения плазмид и фагов: играют роль в эволюции бактерий, способствуют горизонтальному переносу генов. Изучая плазмиды и фаги можно понять эволюцию более сложных организмов. Фазмиды – свойства фагов и плазмид наиболее интересный объект. Предполагается, что это промежуточное звено между плазмидами и фагами или продукт их эволюционного взаимодействия. Фаг и плазмиды не могут размножаться вне клетки. Предполагается, что вирусы берут своё начало со стадии плазмид. Первые вирусы были фазмидами, утратили свойства плазмиды и стали вирусамис литическим путём.

18. Понятие о векторах.

Вектор – обязательная генетическая конструкция, используемая в опытах по генной инженерии. Вектором (лат. – переносчик, носитель) в ГИ называют молекулу ДНК, способную самостоятельно реплицироваться, включать чужеродную ДНК, переносить ее в реципиентные клетки и стабильно там поддерживать. Векторы используют для создания *in vitro* молекул рекДНК и для последующего введения их в клетки, в составе которых они клонируют число чужеродных генов.

19. Общая характеристика векторов. Какие факторы являются определяющими при выборе клонирующего вектора?

Требования к вектору.

1. Вектор должен длительное время существовать в популяции клеток- хозяев, т.е. реплицироваться автономно или вместе с хромосомами клеток.
2. В любом векторе должны быть биохимические или генетические маркеры, которые позволяли бы обнаруживать его присутствие в клетках. Можно выделить 2 группы маркерных генов, позволяющие отличить трансформированные клетки: Селективные гены, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.), гербицидам (у растений). Это могут быть гены ауксотрофности по какому-либо субстрату и т.д. Основной принцип работы такого маркера – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток. Репортерные гены, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано (гены β -глюкуронидазы (GUS), зеленого флюоресцентного белка (GFP), люциферазы (LUC), хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT)).
3. Структура вектора должна допускать встраивание в нее чужеродной последовательности нуклеотидов без нарушения ее функциональной целостности. Это значит, что вектор должен содержать хотя бы один единичный сайт рестрикции.

Классификация векторов:

По области использования:

1. Клонирование (клонирование генов, кДНК или любых фрагментов ДНК).
 2. Экспрессирующие (синтез мРНК и белков).
 3. Интегративные (обеспечивают интеграцию чужеродной ДНК в геном клетки или вируса)
 4. Специализированные векторы (секвенирование и мутирование генов).
- По происхождению:

1. Плазмидные
2. Фаговые
3. Гибридные (сочетают свойства плазмид и фагов).

По структуре ДНК:

1. Кольцевые
2. Линейные

По способу поддержания в клетке:

1. Автономные (реплицирующиеся самостоятельно)
2. Интегративные (реплицирующие в составе клеточной хромосомы. По числу молекул в клетке:

1. Малокопийные (несколько копий)
2. Мультикопийные (десятки копий).

По числу репликаторов, имеющихся в векторном геноме:

1. Монорепликонные
2. Бирепликонные, их также называют челночными, если они могут реплицироваться в клетках различных видов

20. Системы клонирования в клетках *E. coli*. Плазмидные векторы. Трансформация клеток *E. coli* плазмидными векторами.

Первые плазмидные векторы pSC101 и ColE1 представляют интерес лишь с исторической точки зрения. Они оба несут по одному сайту узнавания для рестриктазы EcoRI и использовались для клонирования *l*coRI-фрагментов ДНК. С этой целью кольцевые векторные молекулы сначала линейризовали рестриктазой, в результате чего образовывались 3'-выступающие односторонние концы 5'-ААТТ-3'. Такие же концы имелись у фрагментов чужДНК, что позволяло объединять эти молекулы благодаря их комплементарным взаимодействиям и восстанавливать ковалентные связи с помощью ДНК-лигазы. Отметим, кстати, что одновременно было предложено синтезировать комплементарные концы у взаимодействующих молекул ферментативными методами. Эти процедуры получения рекДНК стали с тех пор классическими, ознаменовав начало истории генетической инженерии.

Трансформация клеток *E. coli*. Плазмидные векторы и рекДНК, сконструированные на их основе, вводят в реципиентные клетки методом генетической трансформации, т. е. путем обработки клеток изолированной ДНК. Возможность трансформации бактерий зависит от их компетентности, т. е. от способности пропускать ДНК через клеточную стенку. Для некоторых родов бактерий (*Bacillus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Streptomyces* и др.) состояние компетентности естественно. Наиболее распространены обработка клеток двухвалентными катионами "на холоду" и электропорация (пробой клеточной стенки электрическим током). Известно также, что последовательные циклы замораживания и оттаивания ослабляют клеточную стенку и делают ее проницаемой для вхождения ДНК в клетку.

21. Системы клонирования в клетках *E. coli*. Фаговые векторы.

Векторы, сконструированные на основе ДНК фага λ . Фаговые векторы подразделяются на векторы внедрения и векторы замещения. Первые несут один сайт узнавания для избранной рестриктазы, поэтому у них, как и у плазмидных векторов, длина рекДНК равна сумме длин вектора и клонируемого фрагмента. Векторы замещения имеют два

сайта узнавания для используемой рестриктазы, поэтому в такие векторы клонируемые фрагменты ДНК вставляют вместо участков, ограниченных данными сайтами. В обоих случаях в реакциях образования рекДНК участвуют два фрагмента λ ДНК (левое и правое плечи векторного генома, имеющие на одном из своих концов *cos*-сайт) и фрагмент чужДНК. Под действием лигазы благодаря *cos*-сайтам прежде всего объединяются разные плечи λ ДНК. Затем образовавшиеся векторные молекулы реагируют с чужДНК и друг с другом, формируя конкатемеры. Они являются субстратом при сборке фаговых частиц *in vitro*.

Векторы, созданные на базе ДНК нитевидных фагов. Близкородственные нитевидные колифаги M13, f1 и fd обладают однонитевой кольцевой ДНК, состоящей из 6,4 тыс. нуклеотидов, и имеют ряд свойств, позволяющих использовать их в качестве векторов. Во-первых, в их ДНК между генами II и IV есть межгенный участок (спейсер), в который можно вставлять чужеродные гены. Во-вторых, размер капсиды зависит от длины упаковываемой молекулы ДНК, что позволяет клонировать фрагменты ДНК размером до 15 тыс. нуклеотидов. В-третьих, они образуют фаголизаты с высокой концентрацией (до 10¹² частиц в 1 мл) и, таким образом, позволяют получать большие количества векторной и клонируемой ДНК.

22. Системы клонирования в клетках *E. coli*. Гибридные векторы

Фагмиды. Фагмидами называют плазмидные векторы, содержащие *ori*-сайт нитевидных фагов. Из векторов этого типа наиболее часто используются плазмиды серии pEMBL, pUC118/119 и Bluescript M13. Они образованы внедрением в векторы pUC фрагмента ДНК фага f1 или M13, содержащего сайт *pac*, необходимый для морфогенеза фаговых частиц, и сайты *ori*(+) и *ori*(-). В присутствии фага-помощника f1 (или M13) фагмиды, используя сайты *ori*(+), начинают реплицироваться как фаговые ДНК, образуя однонитевые копии плазмид, причем выбор нити для копирования зависит от ориентации *ori*-сайта. Образовавшиеся однонитевые ДНК могут упаковываться *in vivo* в капсулу и одновременно с фагом-помощником покидать естественным путем клетку. Таким образом, с помощью фагмид клонируемый фрагмент может быть получен и использован в одно- или двунитевой форме. Их преимущество перед векторами M13mp — возможность клонирования в них относительно больших фрагментов ДНК (до 10 т.п.н.), не подвергающихся внутренним перестройкам.

Космиды. Как уже отмечалось, емкость векторов, полученных на базе ДНК фага λ (не более 23 т.п.н.), ограничена тем, что существенную их часть составляют гены, кодирующие структурные белки фага. Как выяснилось, в головку этого фага может упаковаться любая ДНК подходящего размера (36—52 т.п.н.), ограниченная двумя *cos*-сайтами, ориентированными в одном направлении. Это позволило, совместив в одном геноме плазмидный репликатор и *cos*-сайт фага λ , создать векторы нового типа, так называемые космиды. Размер космид в среднем составляет 5 т.п.н., что позволяет с их помощью клонировать ДНК размером до 45-47 т.п.н. Поэтому космиды предназначены для конструирования банков генов. Космиды фактически представляют собой автономные *cos*-сайты. Использование их для клонирования генов основано на том, что в линейаризованной форме они могут присоединяться к обоим концам фрагментов чужДНК и образовывать структуры типа конкатемерных молекул ДНК. Такие молекулы способны упаковываться *in vitro* в головки фага λ , если, конечно, *cos*-сайты находятся в одинаковой ориентации и размер ДНК между ними не превышает 52 т.п.н. Инъекцированные в клетки рекомбинантные молекулы ДНК циркуляризируются через

cos-сайты и автономно реплицируются. В присутствии фага-помощника они могут быть упакованы *in vivo* в фаговые головки и после лизиса клеток отобраны в виде фаговых частиц.

23. Векторы для клонирования больших фрагментов ДНК. Векторы-транспозоны.

Клонирование больших (50—100 т.п.н. и более) фрагментов ДНК — важная проблема, поскольку при этом, во-первых, существенно облегчается создание геномных библиотек, а, во-вторых, удается провести функциональный анализ полных больших генов или их комплексов. Действительно, многие гены эукариот состоят из нескольких сотен т.п.н., а своеобразным рекорсменом является ген дистрофина, чья транскрибируемая область превышает 2 млн.п.н. Поэтому в последнее десятилетие были предприняты усилия по конструированию емких векторов.

Векторы pNAC — пока единственные линейные прокариотические векторы. При клонировании больших фрагментов ДНК линейные векторы обладают преимуществом перед кольцевыми векторами, так как эффективность образования рекДНК в этом случае выше. В то же время следует учитывать, что в процедурах выделения большие линейные молекулы ДНК более ломки, чем кольцевые. Отметим важную особенность репликационных векторов, использованных для создания вышеупомянутых векторов: все они малокопийны. Это вызвано необходимостью обеспечить стабильность клонируемой ДНК. Известно, что с увеличением ее размера увеличивается вероятность ее структурных перестроек (делеции, вставки, инверсии). Вероятность повышается по мере увеличения числа копий рекДНК, поскольку все более сказывается эффект межмолекулярной рекомбинации.

Векторы-транспозоны. Иногда желательно, чтобы чужДНК находилась в составе клеточной хромосомы. Например, если клетки (скажем, *Pseudomonas* или *Rhizobium*) предназначены для использования в природных условиях, то интеграция клонируемого гена в хромосому позволяет предотвратить опасность его "утечки" в другие виды бактерий. Или, допустим, изучается регуляция клонируемого гена. Тогда важно, чтобы он стабильно поддерживался в клетке в единственном числе. В таких случаях в качестве переносчика генов применяют модифицированные транспозоны, которые в свою очередь переносятся в клетки подходящими плазмидами или фагами. Векторам, которые переносят транспозоны, придают способность к "самоубийству", т.е. после цикла клеточного деления эти векторы элиминируются. Известно довольно много способов "самоубийства": термочувствительный характер репликации, включение гена-киллера (например, ген *kil* у фага λ) и т.д. У векторов-транспозонов удаляют гены транспозаз, лишая их тем самым способности к самостоятельным перемещениям. На их место вставляется чужДНК. Сами гены транспозаз внедряют в векторы-носители транспозонов; именно с их помощью транспозоны переносятся в клеточный геном. После "самоубийства" векторов-носителей рекомбинантный транспозон остается локализованным в определенной точке клеточного генома.

24. Другие системы клонирования (использование традиционных промышленных микроорганизмов).

Векторы грамотрицательных бактерий. Векторы для грамотрицательных бактерий конструируют, используя плазмиды с широким кругом хозяев, относящихся к группам несовместимости P, Q и W. Эти плазмиды реплицируются почти во всех грамотрицательных бактериях, включая промышленно важные штаммы

Agrobacterium, *Azotobacter*, *Methylophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rizobium* и др. Наиболее характерные представители перечисленных групп — плазмиды RP4, RSF1010 и Sa (29,6 т.п.н.), соответственно. Плазида RP4 имеет единственные сайты рестрикции в своих селективных генах ApR и KmR, но из-за большого размера не используется в качестве вектора. Вектором является, например, ее производная плазида pRK2501, у которой есть сайты клонирования в генах KmR (XhoI и HindIII) и TcR (Sall), а также единственные сайты EcoRI и BglII. У этого вектора отсутствует способность к конъюгации и мобилизации, поэтому его перенос возможен только методом трансформации.

Плазида RSF1010 мультикопийна, неконъюгативна и невелика по размеру, но в ее селективных маркерах нет единственных сайтов рестрикции, поэтому она неудобна для клонирования генов. Для этой цели применяют ее производные, их которых первыми были предложены векторы серии pKT. Преимущество описываемых векторов состоит в том, что нет необходимости делать их челночными. С их помощью вначале можно осуществлять предварительные операции по клонированию в хорошо изученных генетических системах (например, *E. coli*), а затем отобранными клонами рекДНК проводить трансформацию клеток других видов. Недостаток этих векторов — их нестабильность, которая вызвана тем, что гены, отвечающие за стабильность, разбросаны по всему плазмидному геному и часть из них отсутствует в векторах. Другой недостаток — разный уровень экспрессии плазмидных генов в разных клетках, что влияет на число копий плазмид, уровень синтеза чужеродного продукта и на эффективность выражения селективных маркеров.

Векторы *Bacillus subtilis*. Клетки *B. subtilis*, будучи почвенными микроорганизмами, обладают хорошо развитым аппаратом секреции продуктов метаболизма и выделяют в ростовую среду такие промышленно важные ферменты, как, например, амилазы, β -лактомазы, протеазы и др. Секреция чужеродных белков существенно облегчает их выделение и очистку, а, кроме того, иногда являются единственным средством их спасения от деградации внутри клетки.

Векторы *Streptomyces*. Грамположительные почвенные бактерии рода *Streptomyces* производят свыше 60 % известных антибиотиков и обладают собственными плазидами и

фагами. Неудивительно поэтому, что для этих клеток достигнут существенный прогресс в разработке систем клонирования. Векторы обычно конструируют на базе низкокопийных плазмид SCP2 (30 т.п.н. из *S. coelicolor*) и SLP1 (17 т.п.н. из *S. lividans*). Все плазмиды конъюгативны. Однако у мультикопийных плазмидных векторов гены, отвечающие за конъюгативность, обычно делетированы, чтобы избежать возможности неконтролируемого обмена рекомбинантными ДНК между клетками в смеси трансформантов. В качестве селективных маркеров используют гены, обеспечивающие устойчивость клеток к различным антибиотикам. Наиболее распространенным маркером является ген *tsr* (устойчивость клеток к тиострептону).

25. Анализ генов и геномов. Создание геномной библиотеки.

После того, как ДНК сшита в пробирке, ее необходимо размножить, т.е. клонировать. Цель: получить многочисленные копии желаемых генов. Для клонирования небольших фрагментов ДНК используют плазмиды или фаговые ДНК, для крупных — космиды и искусственные хромосомы.

Существует два подхода к клонированию ДНК:

- 1) использование бактериальных или дрожжевых клеток для размножения

введенной в них чужеродной ДНК.

2) амплификация ДНК *in vitro*.

Используя микроорганизмы, можно создавать два типа библиотек ДНК: геномную и клоновую (библиотека кДНК).

Геномная библиотека (банк генов, клонотека) – это коллекция клонов ДНК, включающая все фрагменты, входящие в геном данного вида. Т. е. банк генов еще можно назвать набором клонированных фрагментов генома. Если геном какого-либо организма разрезать, вставить в плазмидные или вирусные вектора и ввести в клетку, то в таком виде его можно сохранить. При разрезании плазмидной или фаговой ДНК вероятность выпадения целых и неизмененных кусков генома довольно высока.

Такой способ получения геномной библиотеки получил название «метод дробовика», так как геном в данном случае представлен отдельными фрагментами.

Для создания банка генов необходимо:

1) выделение всей геномной ДНК

2) фрагментация ДНК рестриктазами или ультразвуком

3) Очищенные кольцевые молекулы ДНК (векторы) обрабатывают той же рестриктазой, получая линейную ДНК. Клеточную ДНК добавляют к плазмидной в присутствии лигаз. Таким образом получают рекомбинантную плазмидную ДНК

4) рекДНК вводят в бактериальные или дрожжевые клетки, где плаزمида реплицируется с образованием многих копий.

5) Клонирование бактерий: каждая возникшая колония клеток представляет собой клон или потомство одной клетки. Плазмиды одной колонии содержат клон геномной ДНК, а совокупность плазмид образует библиотеку геномной ДНК.

Недостаток: фрагменты ДНК образуются в огромном количестве. Разрезание геномной ДНК определяется случаем, поэтому лишь часть фрагментов содержат полноценные гены. Некоторые фрагменты могут содержать только часть гена или же интронные последовательности.

Достоинство: библиотека генов может храниться и использоваться неограниченно долго.

Использование:

-источник трансгенов

-источник материала для изучения структуры, функции и регуляции индивидуальных генов, структуры и функции белков

-сохранение генофонда исчезающих видов

Аналогичные коллекции, полученные из индивидуальных хромосом или их частей, называются хромосомными библиотеками.

26. Скрининг банка генов. Физическое картирование ДНК.

Банк генов (*gene bank*) — набор генов данного организма, полученный на основе рекомбинантных ДНК.

Существует несколько методов скрининга, т. е. поиска в геномной библиотеке или в банке ДНК тех клонов (бактериальных или фаговых), которые содержат рекДНК с заданным геном. Из них основные — гибридизационный, иммунологический, генетический и рекомбинационный. Выбор метода во многом зависит от использованной системы клонирования. В случае клонирования эукариотической ДНК в клетках *E. coli* единственным "паспортом" чужДНК служит ее нуклеотидная последовательность. Этот "паспорт" присутствует при всех способах клонирования, поэтому общий метод скрининга

— гибридизация рекДНК с зондами, т. е. с нуклеотидными последовательностями (олигонуклеотидами, однонитевыми кДНК или мРНК), которые комплементарны отыскиваемому гену. На практике для этого пользуются методом гибридизации колоний (Gnmstein, Hogness, 1975). Если клонируемые гены экспрессируются (некоторые банки кДНК; клонированные в *E. coli* геномные банки клеток кишечной группы, их фагов и плазмид), то для скрининга применяют иммунологические и другие методы, регистрирующие присутствие специфического белка.

Возможен направленный поиск в банке кДНК только тех генов, которые участвуют в определенном процессе, например, индуцируются действием какого-либо гормона.

Физическое картирование основано на прямом анализе молекул ДНК, составляющих каждую хромосому (без анализа результатов скрещивания). Его конечная цель - определение последовательности нуклеотидов в каждой хромосоме.

4. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ

4.1. Порядок проведения промежуточной аттестации

Промежуточная аттестация проводится в форме устного экзамена по билетам. Билет содержит два теоретических вопроса.

Оценочные средства для промежуточной аттестации представлены перечнем вопросов к экзамену. Критерием успешности освоения учебного материала **по окончанию учебного семестра** (промежуточная аттестация) является экспертная оценка преподавателя, учитывающая: текущую успеваемость в течение семестра (Устный опрос, реферативные сообщения, выполнение лабораторных работ). Кроме того, экспертная оценка преподавателя может основываться на регулярности посещения обязательных учебных занятий, успешности выполнения установленных на данный семестр объемов рабочей программы.

Промежуточная аттестация проводится в форме экзамена по билетам. Билет содержит два теоретических вопроса.

4. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ

4.1. Порядок проведения промежуточной аттестации

Оценочные средства для промежуточной аттестации представлены перечнем вопросов к экзамену. Критерием успешности освоения учебного материала **по окончанию учебного семестра** (промежуточная аттестация) является экспертная оценка преподавателя, учитывающая: текущую успеваемость в течение семестра (Устный опрос, реферативные сообщения, выполнение лабораторных работ). Кроме того, экспертная оценка преподавателя может основываться на регулярности посещения обязательных учебных занятий, успешности выполнения установленных на данный семестр объемов рабочей программы.

Промежуточная аттестация проводится в форме экзамена по билетам. Билет содержит два теоретических вопроса.

4.2 Критерии оценивания промежуточной аттестации по видам оценочных

средств**4.2.1 Критерии оценивания теоретического вопроса**

Отлично. Студент глубоко и полно владеет содержанием учебно-программного материала; исчерпывающе, последовательно, корректно и логически стройно его излагает не затрудняясь с ответом при видоизменении задания, свободно справляется с поставленными задачами, показывает знания монографического материала. правильно обосновывает принятие решения; владеет навыками и приёмами выполнения практических работ; обнаруживает умение самостоятельно ставить задачи, обобщать и излагать материал, формулировать выводы; при изложении материала осуществляет межпредметные связи; владеет понятийным аппаратом и уяснил взаимосвязь основных понятий дисциплины и их значение для приобретения профессии.

Хорошо. Студент твердо знает учебно-программный материал, грамотно и по существу излагает его; ответ отличается меньшей обстоятельностью, глубиной и полнотой; в ответе на вопрос не допускает существенных неточностей; может правильно применить теоретические положения и владеет необходимыми навыками при выполнении практических задач.

Удовлетворительно. Студент усвоил только основной материал, но не знает отдельных деталей, допускает неточности, не достаточно правильные формулировки, нарушает последовательность в изложении материала и испытывает затруднения в выполнении практических заданий. Ответ отличается низким уровнем самостоятельности.

Неудовлетворительно. Студент не знает значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, отсутствует логика в изложении материала, с большими затруднениями выполняет практические задания, отсутствуют межпредметные связи.

4.3. Результаты промежуточной аттестации и уровни сформированности компетенций

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.

Требования (критериальные показатели) к уровню освоения дисциплины

| | |
|--------------------|----------------------|
| Результат экзамена | Требования к знаниям |
|--------------------|----------------------|

| | |
|---------------------|---|
| Отлично | Студент глубоко и полно владеет содержанием учебно-программного материала; исчерпывающе, последовательно, корректно и логически стройно его излагает не затрудняясь с ответом при видоизменении задания, свободно справляется с поставленными задачами, показывает знания монографического материала. правильно обосновывает принятие решения; владеет навыками и приёмами выполнения практических работ; обнаруживает умение самостоятельно ставить задачи, обобщать и излагать материал, формулировать выводы; при изложении материала осуществляет межпредметные связи; владеет понятийным аппаратом и уяснил взаимосвязь основных понятий дисциплины и их значение для приобретения профессии |
| Хорошо | Студент твердо знает учебно-программный материал, грамотно и по существу излагает его; ответ отличается меньшей обстоятельностью, глубиной и полнотой; в ответе на вопрос не допускает существенных неточностей; может правильно применить теоретические положения и владеет необходимыми навыками при выполнении практических задач. |
| Удовлетворительно | Студент усвоил только основной материал, но не знает отдельных деталей, допускает неточности, не достаточно правильные формулировки, нарушает последовательность в изложении материала и испытывает затруднения в выполнении практических заданий. Ответ отличается низким уровнем самостоятельности. |
| Неудовлетворительно | Студент не знает значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, отсутствует логика в изложении материала, с большими затруднениями выполняет практические задания, отсутствуют межпредметные связи. |

06.03.01 Биология, ОПОП Биология, ФОС РПД Основы генетической инженерии, год набора 2025, форма обучения очная

Проректор по учебной работе утверждено 24.02.2025 А.А. Саламатов

Ученым советом биологического факультета

Протокол заседания № 6 от 21.02.2025

Председатель Ученого совета

биологического факультета согласовано Д.С. Сташкевич

Заседанием кафедры радиационной биологии

Протокол заседания № 7 от 21.02.2025

Заведующий кафедрой согласовано А.В. Аклеев

Автор (составитель) Н.И. Атаманюк

Структура рабочей программы соответствует приказу ректора ФГБОУ ВО «ЧелГУ» от «13» апреля 2021 г. № 247-1