

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:
04c19ed8bfb98f3b6cb77a486b9a8788b8322323



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

Фонд оценочных средств для промежуточной аттестации по дисциплине (модулю) "Генная инженерия" 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)

Генная инженерия

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.



Содержание

1. Паспорт фонда оценочных средств
2. Перечень формируемых компетенции
3. Содержание оценочных средств по дисциплине
 - 3.1. Виды оценочных средств
 - 3.2. Содержание оценочных средств
4. Порядок проведения и критерии оценивания промежуточной аттестации
 - 4.1. Порядок проведения промежуточной аттестации
 - 4.2. Критерии оценивания промежуточной аттестации по видам оценочных средств
 - 4.3. Результаты промежуточной аттестации и уровни сформированности компетенций



1. ПАСПОРТ ФОНДА ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

Специальность: 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика.

Специализация: Биоинженерия и биоинформатика.

Дисциплина: Генная инженерия.

Семестр изучения: 7.

Форма промежуточной аттестации: экзамен.

2. ПЕРЕЧЕНЬ ФОРМИРУЕМЫХ КОМПЕТЕНЦИЙ

Коды компетенции (по ФГОС)	Содержания компетенций согласно ФГОС	Коды и содержания индикаторов	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине
ПК-1	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 ПК-1.2 Анализирует нормативные документы, регламентирующие организацию и методику	Для достижения ПК-1.1 знать: современные методы, используемые для решения теоретических и прикладных задач генетической инженерии; молекулярные основы наследственности, способы введения чужеродной ДНК в клетку. Для достижения ПК-1.2 знать: основные понятия, термины



		проведения научно-исследовательских и производственно-технологических работ в области биоинженерии биоинформатики ПК-1.3 Планирует организацию и проведение научных исследований по актуальным биомедицинским проблемам	генетической инженерии; основные понятия, термины генетической инженерии. Для достижения ПК-1.1 уметь: формулировать и решать практические и научные задачи, предполагающие знание генетики. Для достижения ПК-1.2 уметь: пользоваться справочной и научной литературой, а также каталогами оборудования и реактивов. Для достижения ПК-1.3 владеть: - навыками выделения ДНК из крови и тканей; - навыками работы в молекулярно-генетической лаборатории;
--	--	---	---



			- навыками работы с основными лабораторными приборами (весы, рН-метр, центрифуга, прибор для электрофореза, автоматические пипетки и т.д.); - навыками работы в молекулярно-генетической лаборатории.
--	--	--	---

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 Для достижения ПК-1.1 знать: современные методы, используемые для решения	1. Введение 2. Работа в молекулярно-генетической лаборатории. Основные	Устный опрос Реферативные сообщения	Опрос по билетам № 1-12.



теоретических и прикладных задач генетической инженерии; молекулярные основы наследственности, способы введения чужеродной ДНК в клетку. Для достижения ПК-1.2 знать: основные понятия, термины генетической инженерии; основные понятия, термины генетической инженерии. Для достижения ПК-1.1 уметь: формулировать и решать практические и научные задачи, предполагающие знание генетики. Для достижения ПК-1.2 уметь: пользоваться справочной и научной литературой, а так же каталогами оборудования и реактивов.	лабораторные методы 3. Общие принципы и методы генетической инженерии 4. Генно-инженерные системы 5. Анализ генов и геномов.		
---	--	--	--



Для достижения ПК-1.3 владеть: - навыками выделения ДНК из крови и тканей; - навыками работы в молекулярно-генетической лаборатории; - навыками работы с основными лабораторными приборами (весы, рН-метр, центрифуга, прибор для электрофореза, автоматические пипетки и т.д.); - навыками работы в молекулярно-генетической лаборатории.			
---	--	--	--

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

3.2 Содержание оценочных средств для промежуточной аттестации

Оценочные средства промежуточной аттестации по дисциплине «Генная инженерия» представлены вопросами к экзамену по дисциплине.



Теоретические вопросы к зачету по дисциплине «Генная инженерия»

1. Введение в предмет. История возникновения, развития генной инженерии и клонирования.

Генная инженерия относится к новому разделу экспериментальной молекулярной биологии и направлена на конструирование *in vitro* функционально-активных генетических структур - рекомбинантных ДНК. Появление новой методологии расширило экспериментальные границы молекулярной биологии, поскольку позволило манипулировать с чужеродной ДНК и исследовать ее функционирование в гетерологичных системах. Такой подход обогатил теорию знаниями о закономерностях механизма передачи генетической информации и послужил основой для создания принципиально новых биотехнологий. По сути, генно-инженерные методы совершили революцию в биологической науке.

Цель генной инженерии – выяснение механизмов функционирования генетического аппарата. Практические задачи - создание генно-инженерных штаммов бактерий для получения лекарственных средств, диагностикумов, вакцин; создание трансгенных растений с заданными свойствами; создание трансгенных животных для практических целей; разработка методов генной терапии человека.

Фундаментом для развития генной инженерии служат достижения в молекулярной биологии, микробиологии, биохимии и генетике. Достижения в этих базисных областях науки позволили изолировать дискретные участки ДНК – гены. До создания методологии рекомбинантных ДНК все рассуждения о природе гена, генетическом коде были теоретическими. Можно было выделить ДНК практически из любых организмов, но невозможно было выделить отдельный ген. Гены идентифицировали наблюдением за корреляцией специфических мутаций (наблюдение фенотипа).

Технология получения рекомбинантной ДНК позволила впервые в практике научных исследований выделить из организма индивидуальный ген. Это стало точкой отсчета для развития науки генной инженерии.

Почему изолировать ген так важно? Выделение гена дает возможность исследовать его структуру, выяснить закономерности организации и строения,



сравнить с другими генами и определить последовательность аминокислот белка, который этот ген кодирует. Знание белкового продукта позволяет сделать заключение о функции гена. И, наконец, знание структуры гена дает возможность его целенаправленной модификации.

Теоретические предпосылки для генной инженерии:

1. К началу развития науки генной инженерии был установлен механизм информационного взаимодействия между основными макромолекулами, участвующими в передаче наследственной информации от одного организма другому. Это – репликация, матричный синтез ДНК, при котором цепочка ДНК расплетается, и на каждой образуются новые, комплиментарные. По такому же механизму на ДНК синтезируются комплиментарные ей РНК – транскрипция. На матрице РНК на рибосомах осуществляется синтез белка, структура которого соответствует структуре мРНК – трансляция.

2. Следующий шаг на пути к генной инженерии – открытие внехромосомной самореплицирующейся ДНК или мини-хромосом, которые получили название плазмиды.

3. Выделение и получение ферментов рестриктаз, которые специфически расщепляют ДНК, позволило манипулировать с фрагментами ДНК и привело к возможности изолировать индивидуальный ген.

Приемы генной инженерии позволяют проводить рекомбинацию ДНК *in vitro* и только затем вводить целевую конструкцию в клетку, где происходит экспрессия гена.

История молекулярного клонирования начинается в 1972 г, когда впервые *in vitro* была получена рекомбинантная молекула ДНК из фрагментов разных ДНК. Вирусная ДНК SV40 и ДНК фага лямбда были объединены в лаборатории П.Берга (Станфордский университет, США). В 1973 г. Коэн и Бойер использовали для получения рекомбинантной ДНК плазмидную ДНК и получили первую гибридную плазмиду, которую можно ввести в бактериальные клетки и получить экспрессию чужеродной ДНК *in vivo*. Стало очевидным, что новый метод открывает неограниченные возможности. Далее следует 35- летняя истории развития науки о молекулярном клонировании. В итоге, осуществлен прорыв в понимании структуры гена, получены качественно новые знания об



организации наследственной информации. К ним можно отнести открытие мозаичного строения генов эукариот в отличие от генов прокариот, идентификацию мобильных элементов, разработку информационных технологий, создание мировых баз данных для анализа и сравнения генов. Более того, появилась возможность искусственно создавать гены, кодирующие химерные полипептиды, обладающие свойствами двух или более природных белков. Впечатляющие успехи генной инженерии в практических достижениях. Данный подход открыл перспективы создания принципиально новых микробных продуцентов биологически активных веществ, а также животных и растений, несущих функционально активные чужеродные гены.

2. Объекты генной инженерии. Важнейшие открытия в биохимии и молекулярной биологии, лежащие в основе методов генной инженерии.

Генетическая инженерия – ветвь молекулярной генетики, исследующая возможности и способы создания лабораторным путем (*in vitro*) генетических структур и наследственно измененных организмов, т. е. создания искусственных генетических программ (рекомбинантные ДНК), с помощью которых направленно конструируются молекулярные генетические системы вне организма с последующим их введением в живой организм. Технология рекомбинантной ДНК является важной составной частью биотехнологии, поэтому ее часто называют молекулярной биотехнологией. Рекомбинантные ДНК – молекулы ДНК, полученные вне живой клетки путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами, способными реплицироваться в клетке

Молекулярная биология изучает основы жизнедеятельности организмов на уровне макромолекул. Целью молекулярной биологии является установление роли и механизмов функционирования этих макромолекул на основе знаний об их структурах и свойствах.

Исторически молекулярная биология сформировалась в ходе развития направлений биохимии, изучающих нуклеиновые кислоты и белки. В то время как биохимия исследует обмен веществ, химический состав живых



клеток, организмов и осуществляемые в них химические процессы, молекулярная биология главное внимание сосредоточивает на изучении механизмов передачи, воспроизведения и хранения генетической информации. А объектом изучения молекулярной биологии являются сами нуклеиновые кислоты

— дезоксирибонуклеиновые (ДНК), рибонуклеиновые (РНК) — и белки, а также их макромолекулярные комплексы — хромосомы, рибосомы, мультиферментные системы, обеспечивающие биосинтез белков и нуклеиновых кислот. Молекулярная биология также граничит по объектам исследования и частично совпадает с молекулярной генетикой, вирусологией, биохимией и рядом других смежных биологических наук.

В 1940 году колоссальным достижением стало установление Джорджем Бидлом и Эдуардом Тэйтемом причинно-следственной связи между генами и белками. Гипотеза ученых «Один ген — один фермент» легла в основу концепции о том, что специфичное строение белка регулируется генами. Полагается, что генетическая информация закодирована специальной последовательностью нуклеотидов в ДНК, которая регулирует первичную структуру белков. Позже было доказано, что многие белки имеют четвертичную структуру. В образовании таких структур принимают участие различные пептидные цепи. Исходя из этого, положение о связи между геном и ферментом было несколько преобразовано, и теперь звучит как «Один ген — один полипептид».

В 1944 году американский биолог Освальд Эвери с коллегами (Колином Маклеодом и Маклином Маккарти) доказал, что веществом, вызывающим трансформацию бактерий, является ДНК, а не белки. Эксперимент послужил доказательством роли ДНК в передаче наследственной информации, перечеркнув устаревшие знания о белковой природе генов. В начале 50-х годов Фредерик Сенгер показал, что белковая цепь — уникальная последовательность аминокислотных остатков. В 1951 и 1952 годах ученый определил полную последовательность двух полипептидных цепей — бычьего инсулина В (30 аминокислотных остатков) и А (21 аминокислотный остаток) соответственно.

Примерно в то же время, в 1951–1953 гг., Эрвин Чаргафф сформулировал правила о соотношении азотистых оснований в ДНК.



Согласно правилу, вне зависимости от видовых различий живых организмов в их ДНК количество аденина (А) равно количеству тимина (Т), а количество гуанина (G) равно количеству цитозина (С).

В 1953 году доказана генетическая роль ДНК. Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик на основе рентгенограммы ДНК, полученной Розалинд Франклин и Морисом Уилкинсом, установили пространственную структуру ДНК и выдвинули подтвердившееся позднее предположение о механизме ее репликации (удвоении), лежащем в основе наследственности.

1958 год — формирование центральной догмы молекулярной биологии Фрэнсисом Криком: перенос генетической информации идет в направлении ДНК → РНК → белок.

Суть догмы состоит в том, что в клетках имеется определенный направленный поток информации от ДНК, которая, в свою очередь, представляет собой исходный генетический текст, состоящий из четырех букв: А, Т, G и С. Он записан в двойной спирали ДНК в виде последовательностей этих букв — нуклеотидов.

Этот текст транскрибируется. А сам процесс называется транскрипцией. В ходе данного процесса происходит синтез РНК, которая является идентичной генетическому тексту, но с отличием: в РНК вместо Т стоит U (урацил).

Данная РНК называется информационной РНК (иРНК), или матричной (мРНК). Трансляция иРНК осуществляется при помощи генетического кода в виде триплетных последовательностей нуклеотидов. В ходе этого процесса происходит перевод текста нуклеиновых кислот ДНК и РНК из четырехбуквенного текста в двадцатibuквенный текст аминокислот. обратная транскриптаза, которая синтезирует ДНК по РНК. Фермент был открыт в вирусах, у которых генетическая информация закодирована в РНК, а не в ДНК. Такие вирусы называют ретровирусами. Они имеют вирусную капсулу с заключенными в нее РНК и специальным ферментом. Фермент и есть обратная транскриптаза, которая синтезирует ДНК по матрице этой вирусной РНК, а эта ДНК потом уже служит генетическим материалом для дальнейшего развития вируса в клетке.

Конечно, данное открытие вызвало большой шок и множество споров среди молекулярных биологов, поскольку считалось, что, исходя из



центральной догмы, этого быть не может. Однако Крик сразу объяснил, что он никогда не говорил, что это невозможно. Он говорил лишь то, что никогда не может происходить поток информации от белка к нуклеиновым кислотам, а уже внутри нуклеиновых кислот любого рода процессы вполне возможны: синтез ДНК на ДНК, ДНК на РНК, РНК на ДНК и РНК на РНК.

После формулирования центральной догмы по-прежнему оставался ряд вопросов: как алфавит из четырех нуклеотидов, составляющих ДНК (или РНК), кодирует 20-буквенный алфавит аминокислот, из которых состоят белки? В чем состоит сущность генетического кода?

Первые идеи о существовании генетического кода сформулировали Александр Даунс (1952 г.) и Георгий Гамов (1954 г.). Ученые показали, что последовательность нуклеотидов должна включать в себя не менее трех звеньев. Позднее было доказано, что такая последовательность состоит из трех нуклеотидов, названных кодоном (триплетом). Тем не менее вопрос о том, какие нуклеотиды ответственны за включение какой аминокислоты в белковую молекулу, оставался открытым до 1961 года.

А в 1961 году Маршалл Ниренберг вместе с Генрих Маттеи использовали систему для трансляции *in vitro*. В роли матрицы взяли олигонуклеотид. В его состав входили только остатки урацила, а пептид, синтезированный с него, включал только аминокислоту фенилаланин. Таким образом впервые было установлено значение кодона: кодон UUU кодирует фенилаланин. Позже Хар Корана выяснил, что последовательность нуклеотидов UCUCUCUCUCUC кодирует набор аминокислот серин—лейцин—серин—лейцин. По большому счету, благодаря работам Ниренберга и Кораны, к 1965 году генетический код был полностью разгадан. Выяснилось, что каждый триплет кодирует определенную аминокислоту. А порядок кодонов определяет порядок аминокислот в белке.

Главные принципы функционирования белков и нуклеиновых кислот сформулировали к началу 70-х годов. Было зафиксировано, что синтез белков и нуклеиновых кислот осуществляется по матричному механизму. Молекула-матрица несет закодированную информацию о последовательности аминокислот или нуклеотидов. При репликации или транскрипции матрицей служит ДНК, при трансляции и обратной транскрипции — иРНК.



Так были созданы предпосылки для формирования направлений молекулярной биологии, в том числе и генной инженерии. А в 1972 году Пол Берг с коллегами разработал технологию молекулярного клонирования. Ученые получили первую рекомбинантную ДНК *in vitro*. Эти выдающиеся открытия легли в основу нового направления молекулярной биологии, а 1972 год с тех пор считается датой рождения генной инженерии.

3. Основные понятия биохимической инженерии.

Биохимическая инженерия, Биотехнология— дисциплина, изучающая возможности использования живых организмов, их систем или продуктов их жизнедеятельности для решения технологических задач, а также возможности создания живых организмов с необходимыми свойствами методом генной инженерии.

Биотехнологией часто называют применение генной инженерии в XX—XXI веках, но термин относится и к более широкому комплексу процессов модификации биологических организмов для обеспечения потребностей человека, начиная с модификации растений и животных путём искусственного отбора и гибридизации. С помощью современных методов традиционные

биотехнологические производства получили возможность улучшить качество пищевых продуктов и увеличить продуктивность живых организмов.

До 1971 года термин «биотехнология» использовался, большей частью, в пищевой промышленности и сельском хозяйстве. С 1970 года учёные используют термин в применении к лабораторным методам, таким, как использование рекомбинантной ДНК и культур клеток, выращиваемых *in vitro*.

Биотехнология основана на генетике, молекулярной биологии, биохимии, эмбриологии и клеточной биологии, а также прикладных дисциплинах — химической и информационной технологиях и робототехнике.

Разработка методов генной инженерии, основанных на создании рекомбинантных ДНК, привела к тому «биотехнологическому буму», свидетелями которого мы являемся. Однако, современное состояние биотехнологии это лишь ростки дерева, созревание которого ожидается в нынешнем тысячелетии. Биотехнология многолика. Она использует



достижения различных отраслей науки, таких как микробиология, биохимия, генетика, электроника, химическая, биохимическая и механическая технологии, научные основы получения пищевых продуктов и пищевые технологии.

Таким образом, в получение биотехнологических продуктов вносят вклад одновременно несколько научных отраслей, наиболее важные из которых:

- генная инженерия (техника рекомбинантных ДНК);
- биокатализ – выделение, иммобилизация и стабилизация ферментов;
- культивирование клеток микро- и макроорганизмов;
- технология ферментации – производство и переработка отходов;
- биоэлектрохимия.

Следовательно, биотехнология является многоотраслевым и чрезвычайно наукоемким производством. В научных и промышленных целях биотехнология использует биохимические, микробиологические, химико-аналитические и другие методы исследований, разработанные и применяемые в фундаментальных науках, лежащих в основе биотехнологии. Формирование биотехнологии как самостоятельного научного направления привело к развитию собственных методов. Это методы культивирования биообъектов, ферментации биомассы, изоляции и очистки получаемых продуктов.

Объектами биотехнологии служат различные живые организмы: вирусы, бактерии, грибы, клетки, ткани растений и животных, которые являются продуцентами разнообразных веществ. В зависимости от вида объекта различают микробиотехнологию, фитобиотехнологию и зообиотехнологию. Современная биотехнология является преимущественно микробиотехнологией, так как наиболее часто в качестве ее объектов применяются микроорганизмы. При определенных условиях они, как правило, легко размножаются в питательных средах. Относительная простота строения генетического аппарата и наличие плазмид у бактерий позволяет использовать их в генной инженерии.

Микроскопические грибы, характеризующиеся высоким разнообразием видов и форм, широко применяются для производства кормовых добавок,



богатых белками и витаминами, а также для получения антибиотиков. В ряде стран из грибов получают белки пищевого назначения – микопротеины.

Интенсивно развивающаяся фитобиотехнология основана на культивировании каллусных тканей или клеток растений. В генной инженерии используют также протопласты – клетки растений, лишенные стенок. Растительные клетки служат источниками многих лекарственных препаратов и других биологически активных веществ.

Самостоятельной ветвью биотехнологии является зообиотехнология, в которой используются клетки животных и человека. Культивирование клеток животных – наиболее трудоемкий и сложный процесс. Тем не менее, в настоящее время разработаны способы промышленного получения противовирусного белка интерферона из лимфобластов человека и моноклональных антител. Они основаны на том, что клетки-гибридомы образуются при слиянии лимфобластов человека (опухолевые клетки, способные к неограниченному росту) и моноклональных антител (которые вырабатывают лимфоциты). Именно такие гибридомы и способны синтезировать белок интерферон. Эмбриональные ткани используются для репродукции вирусов и в производстве противовирусных вакцин. Клетки и ткани животных являются также источниками высокоэффективных иммуномодуляторов, применяющихся для коррекции нарушений иммунитета.

4. Объекты генетической и генной инженерии

Генетическая инженерия состоит из двух разделов —генной и геномной инженерии.

Таблица 1- Генная инженерия

Содержание	Этапы	Инструментарий	Методы переноса генов
------------	-------	----------------	-----------------------



Конструирование организмов с несвойственными данному виду характеристиками	In vivo: извлечение генов, их Перенос и закрепление в новом генетическом окружении, экспрессия генов In vitro: синтез или выделение генов; их модификация, замена промоторов и терминаторов; локальный мутагенез; присоединение генов к векторным молекулам, введение их в клетки, клонирование и экспрессия	Вирусы, плазмиды и транспозоны Рестриктазы и др. нуклеазы, ДНК-лигаза, обратная транскриптаза и др. ферменты. Векторы, адаптеры, полилинкеры, зонды и др.	Трансдукция, конъюгация, транспозиция, слияние протопластов Трансформация, электропорация, микроинъекция в ядра эукариот
--	--	---	--

Генная инженерия методами *in vivo* и *in vitro* решает задачи введения в геном реципиентной клетки одного или нескольких (обычно чужеродных) генов либо создания в геноме новых типов регуляторных связей. В таких случаях *видовая принадлежность* реципиентных организмов не меняется, но появляются *несвойственные* им признаки.

Таблица 2 - Геномная инженерия

Содержание	Объект	Методы конструирования
------------	--------	------------------------



Конструирование организмов новых видов	Вирусы Клетки прокариот Клетки эукариот	Рекомбинация <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> Межвидовая конъюгация и слияние протопластов Слияние растительных протопластов и животных клеток; введение изолированных метафазных хромосом в клетки; микроинъекция хромосом в ядра; перенос изолированных митохондрий и хлоропластов
--	---	--

Перед геномной инженерией стоят задачи более глубокого вмешательства в геном, вплоть до создания новых видов организмов. Методы решения таких задач различны для вирусов и для про и эукариотических клеток.

Часто генетическую инженерию сводят лишь к операциям с молекулами ДНК методами *in vitro*. Такое сужение области генетической инженерии вряд ли оправдано, поскольку ее конечным результатом является конструирование рекомбинантных молекул ДНК и метод здесь не имеет значения. Нет, например, никакой принципиальной разницы между трансдуцирующими фагами, полученными методами *in vivo* и *in vitro*: в обоих случаях целенаправленно конструируются или отбираются фаги с заданными свойствами. Во многих экспериментах с клетками высших эукариот результат достигается только последовательными операциями *in vivo* и *in vitro*.

5. Структура генома человека. Структурно-функциональная роль транспозонов.

Геном человека, равно также как и геном любого другого вида животных, состоит из двух геномов – сложного ядерного генома и менее сложно организованного генома митохондрий. Ядерный геном человека содержит огромный объем генетической информации – около 3000 мегабаз (Мб), – часть из которой кодирует первичную структуру белков, синтезируемых на свободных цитоплазматических или мембраносвязанных рибосомах. Митохондриальный геном имеет относительно небольшой размер – около 16,6 килобаз (Кб), – и кодирует все митохондриальные рибосомальные и



транспортные РНК, а так же часть белков, которые необходимы для нормального функционирования митохондрий. Наиболее общие представления о геноме человека могут быть получены с помощью анализа кинетики реассоциации молекул ДНК.

Динамика плавления геномной ДНК обнаруживает присутствие, по крайней мере, трех различающихся по химической сложности фракций. Быстро ренатурирующая фракция ДНК (около 10%) состоит из относительно коротких высокоповторяющихся последовательностей. В промежуточную фракцию (около 30%) входит множество умеренно повторяющихся ДНК – более протяженных, но представленных меньшим числом копий. Наконец медленно ренатурирующая фракция (около 60%) объединяет в себе уникальные последовательности ДНК, которые встречаются в геноме не более двух раз. Более детальный анализ геномной ДНК, проведенный с помощью методов генетического и физического картирования, показал, что лишь около 30% ядерного генома организовано в гены и геноподобные последовательности, остальные же 70% составляют внегенную (или экстрагенную) ДНК. В свою очередь последняя примерно на 80% состоит из уникальной и низкоповторяющейся ДНК и на 20% – из умеренно- и высокоповторяющихся последовательностей. Фракция умеренно- и высокоповторяющейся ДНК включает тандемные или кластеризованные повторы и диспергированные генетические элементы. Что касается генов и геноподобной ДНК, то эта фракция лишь на 10% является кодирующей, а остальные 90% состоят из псевдогенов, генных фрагментов, интронов и других геноподобных нетранслируемых последовательностей. Следовательно, из всего объема геномной ДНК только 3% несет информацию о первичной структуре клеточных белков, рибосомальных, транспортных и других видах РНК, а 97% такой информации не содержит.

К сегментам ДНК, составляющим ген, относятся: единица транскрипции, промотор, левые и правые регуляторные элементы. Кодирующая область большинства транскрипционных единиц генома человека имеет прерывистое или мозаичное строение: кодирующие последовательности, или экзоны, разделены между собой вставочными некодирующими последовательностями, или интронами. Количество экзонов, приходящихся на один ген, как правило, коррелирует с размером



самого гена. Промотор – это специальная регуляторная последовательность гена размером около 75 пар оснований, которая локализована, как правило, в его 5'-фланкирующей области и обеспечивает точное взаимодействие РНК-полимеразы с молекулой ДНК перед началом транскрипции. Промотор не является единственной последовательностью, регулирующей работу гена. К дополнительным элементам, контролирующим экспрессию генов, относятся энхансеры, сайленсеры и аттенуаторы. Энхансер, или усилитель, - это группа коротких (200-300 пар оснований) последовательностей, которые, взаимодействуя с регуляторными белками (убиквитиновыми и/или тканеспецифическими транскрипционными факторами), способны повышать эффективность работы промотора или РНК-полимеразы, и, тем самым, увеличивать транскрипционную активность гена. В отличие от промотора, функционирование энхансера не зависит от его ориентации и удаления по отношению к точке начала транскрипции. Сайленсеры – это негативные регуляторные элементы, подавляющие транскрипционную активность гена. Сайленсеры располагаются, как правило, перед промотором или после него, а так же внутри интронов. К сожалению, механизм работы этих регуляторных элементов не достаточно изучен. То же самое можно сказать и о третьем дополнительном элементе контроля экспрессии генов – аттенуаторе. Аттенуатор, или ослабитель, – это последовательность, лежащая между сайтом инициации транскрипции и кодирующей областью гена. Она способна блокировать продвижение РНК-полимеразы, обеспечивая тем самым снижение транскрипционной активности гена.

6.Биохимическая основа методов генной инженерии-- ферменты.

Генетическая инженерия - потомок молекулярной генетики, но своим рождением обязана успехам генетической энзимологии и химии нуклеиновых кислот, так как инструментами молекулярного манипулирования являются ферменты. Если с клетками и клеточными органеллами мы подчас можем работать микроманипуляторами, то никакие, даже самые мелкие микрохирургические инструменты не помогут при работе с макромолекулами ДНК и РНК. Что же делать? В роли «скальпеля», «ножниц» и «ниток для сшивания» выступают ферменты. Только они могут найти определенные последовательности нуклеотидов, «разрезать» там молекулу или, наоборот, «заштопать» дырку в цепи ДНК. Эти ферменты издавна работают в клетке, выполняя работы по репликации



(удвоению) ДНК при делении клетки, репарации повреждений, в процессах считывания и переноса генетической информации из клетки в клетку или в пределах клетки. Задача генного инженера - подобрать фермент, который выполнил бы поставленные задачи, то есть смог бы работать с определенным участком нуклеиновой кислоты. Следует отметить, что ферменты, применяемые в генной инженерии, лишены видовой специфичности, поэтому экспериментатор может сочетать в единое целое фрагменты ДНК любого происхождения в избранной им последовательности. Это позволяет генной инженерии преодолевать установленные природой видовые барьеры и осуществлять межвидовое скрещивание. Ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК, можно разделить на несколько групп: ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (рестриктазы); ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (обратные транскриптазы); ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (лигазы); ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК.

Рестриктазы (рестрицирующие эндонуклеазы, эндонуклеазы рестрикции) - это ферменты, узнающие и атакующие определенные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК (сайты рестрикции).

ДНК- полимеразы. Впервые ДНК-полимераза была выделена Корнбергом с сотрудниками в 1958 году из *E. coli*. ДНК-полимераза I *E. coli* (Pol I) не связывается с молекулами двухцепочечной кольцевой ДНК. Однако, если такие молекулы денатурировать и получить одноцепочечные формы, то с последними полимеразы связывается в количествах, пропорциональных длине этих участков — примерно одна молекула на 300 нуклеотидных остатков. Pol I связывается с одноцепочечными участками двойной спирали ДНК, в местах одноцепочечных разрывов с 3-гидроксильной группой и 5- фосфатом, а также с концами двухцепочечных молекул ДНК.

Обратная транскриптаза используется для транскрипции мРНК в комплементарную цепь ДНК. Наиболее детально изучена ревертаза ретровирусов птиц. Каждый вирион содержит около 50 молекул этого фермента. Обратная транскриптаза состоит из двух субъединиц — а (65 кДа) и b (95 кДа), присутствующих в полимере в эквимольном количестве и обладает, по крайней мере, тремя ферментативными активностями: 1) ДНК-полимеразной, использующей в качестве матрицы как РНК, так и ДНК; 2)



активностью РНКазы H, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК—ДНК, но не одно- или двухцепочечную РНК; 3) ДНК-эндонуклеазной активностью.

Создание фосфодиэфирных связей в одноцепочечных разрывах двухцепочечной ДНК с помощью ДНК-лигаз является наряду с рестрикцией 29 одним из важнейших этапов получения рекомбинантных ДНК *in vitro*. ДНКлигазы разделяют на два семейства в зависимости от используемого ими кофактора в качестве донора АМР: 1) АТР-зависимые лигазы обнаруживают у бактериальных и эукариотических вирусов, архей, дрожжей, млекопитающих и эубактерий. 2) NAD⁺-зависимые ДНК-лигазы имеются почти исключительно у эубактерий. Единственное известное исключение в этом отношении составляют энтомопоксвирусы насекомых *Melanoplus sanguinipes* и *Amsacta moorei*. Наибольшее применение в генно-инженерных исследованиях сегодняшнего дня находит АТР-зависимая ДНК-лигаза бактериофага Т4. Среди других многочисленных ферментов, используемых в генной инженерии, прежде всего следует упомянуть полинуклеотидкиназы, которые осуществляют перенос g-фосфатных групп АТР на 5'-ОН группы ДНК или РНК. Полинуклеотидкиназа бактериофага Т4 широко используется для введения радиоактивной метки в ДНК или РНК с целью получения радиоактивно меченых зондов или секвенирования нуклеиновых кислот.

Терминальная трансфераза Осуществляет последовательное присоединение АМР из пула дезоксирибонуклеозидтрифосфатов к 3'-ОН-группам молекул ДНК, используется для введения радиоактивной метки в составе меченых нуклеотидов в 3'-концы ДНК, а также присоединения к 3'-концам фрагментов ДНК (особенно кДНК) протяженных гомополимерных последовательностей нуклеотидов (коннекторов) для последующего их клонирования.

Щелочные фосфатазы. Применение для повышения эффективности клонирования катализируют удаление 5'-фосфатных групп ДНК или РНК, а также расщепление макроэргических связей рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Их используют при подготовке фрагментов нуклеиновых кислот к введению 5'-концевой радиоактивной метки ³²P, а также для предотвращения лигирования векторных молекул ДНК самих на себя.



Нуклеазы в генной инженерии. Экзонуклеаза III E.coli. Экзонуклеаза фага λ . S1- нуклеаза. РНКаза А. ДНКаза I Экзонуклеаза III E. coli катализирует последовательное отщепление 5'- нуклеотидов из дцДНК в направлении 3'→5'. Фермент обладает эндонуклеазной активностью по отношению к апуринизированной ДНК, активностью РНКазы H (гидролиз РНК в РНК-ДНК-гибридах) и 3'- фосфатазной активностью. Экзонуклеаза фага λ катализирует последовательное отщепление 5'- мононуклеотидов в дцДНК при наличии в них 5'-концевых фосфатных групп. Ее используют для получения молекул оцДНК с целью их последующего секвенирования.

7. Стратегия клонирования генов прокариот и эукариот.

Стратегия молекулярного клонирования

Универсального метода получения рекомбинантной ДНК не существует. Принцип метода:

- получают фрагменты ДНК из организма донора, которые могут содержать от одного до нескольких генов;
- каждый из фрагментов лигируют с векторной ДНК с образованием рекомбинантной молекулы, векторная ДНК несет маркер устойчивости к антибиотику;
- смесь рекомбинантных ДНК используют для трансформации в клетки- реципиенты, где плазида реплицируется и передается потомству;
- рекомбинантные клетки отбирают на селективных средах;
- если рекомбинантные клетки продуцируют белок, идентичный донорной ДНК, это является подтверждением молекулярного клонирования.

Таким образом, стратегия молекулярного клонирования заключается в том, чтобы изолировать индивидуальный ген или гены из большого и сложного генома и «переселить» его (их) в маленький и очень простой геном.

Для клонирования генов может служить геномная ДНК, кДНК, которая синтезируется с помощью обратной транскриптазы на матрице РНК, амплифицированная ДНК, полученная с помощью полимеразной цепной реакции, а также синтетическая ДНК, синтезированная *in vitro* из нуклеотидов.

Если в качестве исходной ДНК используется геномная ДНК, то сначала проводят клонирование случайных участков ДНК (Shotgun-клонирование).



Когда на одном из больших фрагментов обнаружен ген, проводят субклонирование, т.е. расщепляют фрагмент мелкощеплящими рестриктазами.

Присоединение ДНК к клонирующему вектору проводят с помощью ДНК-лигазы. Векторы последнего поколения содержат мультиклонирующий сайт (полилинкер) – сегмент ДНК, содержащий различные сайты рестрикции (обычно они перекрываются друг с другом).

Процесс введения рекомбинантных векторов в клетки-хозяева называется трансфекцией. Трансфекция может осуществляться несколькими способами в зависимости от природы вектора: трансформацией, конъюгацией и трансдукцией гетерологичной ДНК.

Трансформация – способность бактериальной клетки поглощать молекулы ДНК из раствора. Выход трансформантов низкий и составляет 10-5, зависит от штамма, размера ДНК и условий эксперимента. Существует несколько способов для увеличения эффективности трансформации. Клетки подвергают температурному воздействию и обрабатывают раствором CaCl_2 . В результате такой обработки происходит локальное разрушение клеточной стенки, что облегчает проникновение ДНК в клетку. Такая обработка дает максимальную частоту трансформации, примерно 10-3. Такой же эффект достигается при использовании для трансформации протопластов и сферопластов, в результате чего мембрана становится более доступной. К увеличению частоты трансформации приводит также обработка клеток полиэтиленгликолем в результате частичного повреждения цитоплазматической мембраны. Для увеличения частоты трансформации используют физический метод – электропорацию, что приводит к увеличению мембранной проницаемости. Смесь клеток и ДНК подвергают электрическому разряду 2-4 тыс в, при этом в мембране образуются каналы и через них внутрь клетки проникает ДНК. Клоны, несущие рекомбинантные плазмиды, легко отобрать за счет идеального селективного маркера – антибиотикоустойчивости.

Конъюгация – перенос ДНК из клетки-донора в клетку-реципиент. Большинство плазмид, которые используются в работе с рекомбинантными ДНК, не конъюгативные и не способны самостоятельно переходить в клетки путем конъюгации. Поэтому их вводят в клетки вместе с конъюгативными плазмидами, предназначенными для переноса по механизму мобилизации.



Трансдукция – инъекция ДНК бактериофага в бактериальную клетку. В процессе инфекции бактериофаги адсорбируются на поверхности клетки и проникают в нее с частотой близкой 100% в отличие от низкоэффективной трансформации. Таким образом, если *in vitro* упаковать рекомбинантную ДНК в головки фага, то можно ожидать ее эффективный перенос в клетку хозяина. Хранение. Первичное клонирование ДНК обычно дает набор клонов, соответствующих полному геному. Такая смесь клонов, полученных в результате расщепления индивидуального генома, называется ДНК-библиотекой или библиотекой генов. ДНК может храниться в виде клонов на векторах, каждый из которых при необходимости может быть востребован.

Идентификация клона. Процедура направлена на поиск необходимого клона в смеси, иногда из тысяч клонированных фрагментов. Эта задача сложная, но существующая техника позволяет успешно провести идентификацию даже в случае очень больших геномов (иммунологический скрининг, пульс- электрофорез, ДНК-гибридизация, ДНК- микрочипы, скрининг по активности белка).

После клонирования ДНК ее секвенируют, проводят поиск открытой рамки считывания, затем конвертируют последовательность нуклеотидов в белковый продукт, при необходимости проводят сайт-специфический мутагенез и изучают продукты экспрессии. Если сиквенс показал, что клон содержит неполную рамку считывания, то процедуру клонирования повторяют, применяя другую рестриктазу для расщепления исходной ДНК.

8. Плазмида. Понятие вектор. Векторы: плазмиды, фаговые векторы, искусственные конструкции (космиды), фазмиды, челночные векторы

Вектор - молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Задача вектора – донести выбранную ДНК в клетку-реципиент. Такие молекулы переносчики фрагментов нуклеиновых кислот были созданы. Идеальная векторная молекула должна обладать несколькими обязательными свойствами: 40 1) любой 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. 3) структура векторной молекулы должна допускать встраивание в нее чужеродной последовательности нуклеотидов без нарушения ее функциональной целостности. Функциональная классификация векторов: экспрессирующие векторы, челночные (бинарные) векторы. Векторы, способные реплицироваться в клетках-хозяевах разных биологических видов, называют челночными, или бинарными векторами. Необходимость использования челночных векторов в генной инженерии связана с тем, что наработку в препаративном количестве векторной ДНК для проведения генно-инженерных манипуляций удобнее проводить в бактериальных клетках. А получение биологически активных продуктов клонированных генов высших организмов во многих случаях возможно только в клетках своего или близкого вида, в которых эти гены экспрессируются в природных условиях, т.е. в своем обычном генетическом окружении. При конструировании высокоэффективных экспрессирующих векторов необходимо, прежде всего, учитывать особенности структуры регуляторной части рекомбинантного гена, исходя из того, в каких генетических условиях клонированный ген предполагается экспрессировать. Особенности строения плазмидных векторов на примере полифункционального вектора Bluescript. Итак, способность к автономной репликации является важнейшим биологическим свойством любой плазмиды, обеспечивающим ее независимое (в определенных пределах) существование. Автономная репликация обеспечивается наличием области начала репликации, на котором происходит сборка макромолекулярного комплекса, осуществляющего инициацию и продолжение синтеза плазмидной ДНК. Для своей репликации различные плазмиды имеют разную потребность в ферментах клетки-хозяина. Существование плазмид, независимое от хромосомы клетки-хозяина, невозможно без осуществления контроля числа копий плазмидной ДНК в клетке, осуществляемого самими плазмидами. Все плазмиды осуществляют негативный контроль синтеза ДНК с использованием специфических ингибиторов репликации. Одним из распространенных механизмов негативного контроля является синтез на матрице плазмидной ДНК антисмысловой РНК (контртранскрипта), который может быть комплементарен или мРНК белка-инициатора репликации Rep, или РНК-



праймеру (в том числе, его предшественнику), необходимому для инициации синтеза плазмидной ДНК. Итероны конкурируют с областью начала репликации за связывание Rep-белка, присутствующего в клетке в небольшом количестве, и связывают его полностью при достижении числа копий плазмиды определенного уровня, что полностью блокирует инициацию репликации. Еще одним важным свойством плазмид является консервативность их размера. Минимальный размер плазмиды диктуется необходимостью расположения в ее молекуле всех генов и регуляторных последовательностей, необходимых для поддержания ее внутриклеточной автономии. Другое требование – это близкое друг к другу расположение взаимозависимых регуляторных участков молекулы. Это необходимо для обеспечения высокой вероятности их совместной передачи в дочерние клетки. Повышение размера плазмиды сверх оптимального будет отрицательно сказываться на ее стабильности. Различные близкородственные плазмиды, как правило, не могут длительное время сосуществовать друг с другом в клетках потомства исходной их содержащей бактериальной клетки. Причина несовместимости близкородственных плазмид в бактериальных клетках проста

- все они обладают одним и тем же (или очень похожим) механизмом контроля числа их копий. Плазмиды серии Bluescript. Полилинкер. Селектируемые маркеры. Ген *lacZ* в качестве селектируемого маркера. Вектор Bluescript M13+ представляет собой кольцевую ковалентно замкнутую молекулу ДНК длиной около 3 т.п.о. Он включает в себя ген устойчивости к ампициллину *Amp^r*, ген *b*-галактозидазы *lacZ*, в N-концевую часть которого встроен полилинкер, содержащий уникальные сайты рестрикции для 21 рестриктазы, промоторно-операторную область *lacZ*, а также ген *lac*-репрессора *lacI*. В результате встраивания клонируемого фрагмента ДНК в полилинкер происходят разрыв кодирующей части гена *lacZ* и инактивация *b*-галактозидазы, что, как и в случае вектора pUC18, можно обнаружить по исчезновению окраски колоний бактерий, содержащих этот вектор со вставкой клонированной ДНК. Кроме того, встроенный в полилинкер фрагмент ДНК попадает под контроль промоторно-операторной регуляторной последовательности гена *lacZ* и в присутствии индуктора IPTG может быть экспрессирован в клетках *E. coli*. В дополнение к этому полилинкер в



векторной плазмиде содержит на одном конце промотор для T7-, а на другом – для T3-РНК-полимераз, которые ориентированы навстречу друг другу, что позволяет транскрибировать любую из цепей клонированного фрагмента ДНК *in vitro* с помощью той или другой РНК-полимеразы и получать препаративные количества мРНК или же комплементарной ей антисмысловой РНК. Кроме того, вектор Bluescript M13+ обладает межгенной областью (IG) фага f1, родственного фагу M13. Эта область детерминирует все cis-действующие функциональные последовательности нуклеотидов фага, необходимые для репликации его хромосомы и упаковки ее в фаговые частицы. В присутствии фагапомощника M13 происходит преимущественная упаковка образовавшейся в результате репликации одноцепочечной плазмиды в фаговые частицы M13. Одноцепочечная ДНК Bluescript M13+ после очистки может быть использована непосредственно для секвенирования клонированной ДНК или проведения сайт- специфического мутагенеза. Векторы типа Bluescript M13+ , способные существовать либо в виде плазмиды, либо в составе фаговых частиц нитевидных бактериофагов, называют фагмидами. Векторы на основе фага f1. Основным недостатком плазмидных векторов для клонирования является их малая емкость в отношении клонируемых фрагментов ДНК. Емкость клонирующих векторов была значительно повышена с появлением векторов, сконструированных на основе хромосомы бактериофага f1. Векторы на основе ДНК фага f1 обладают значительно большей емкостью, в них можно клонировать фрагменты ДНК длиной от 5 до 25 т.п.о. Фаговые частицы, содержащие упакованную ДНК, способны проходить литический цикл развития внутри бактериальных клеток и поэтому образовывать стерильные пятна (бляшки) на газоне бактерий. Такие бляшки содержат в концентрированном виде как самифаговые частицы с упакованными в них рекомбинантными молекулами ДНК, так и все продукты метаболизма зараженных бактериальных клеток, включая белки и ферменты, которые появляются в результате экспрессии клонированных бактериальных генов. Основой конструирования фаговых векторов служат несколько простых принципов (рис. 14). Рис. 14. Упрощённая генетическая карта фага-f1 (зачерченный участок соответствует генам, несущественным для размножения фага) В середине молекулы f1-ДНК длиной ~45 т.п.о. расположен участок хромосомы (~15 т.п.о.), который не является необходимым для литического



развития бактериофага (зачерченный участок). Поэтому, в принципе, его можно заменить на любой фрагмент ДНК аналогичного размера и осуществить клонирование фрагмента путем размножения рекомбинантного бактериофага. Поскольку механизм упаковки хромосомной ДНК в фаговые частицы основан на включении ДНК строго определенного размера, рекомбинантные ДНК, содержащие фрагменты клонируемой ДНК, которые не соответствуют оптимальному размеру, не упаковываются и не клонируются. Это позволяет легко освобождаться от фаговых частиц, не содержащих вставки клонируемой ДНК, и оптимизировать процесс клонирования путем снижения в упаковочных экстрактах доли нежизнеспособных фаговых частиц. Космиды и фазмиды (фагмиды). Как уже упоминалось выше, фаговые векторы позволяют клонировать фрагменты ДНК длиной 15–25 т.п.о. Однако этого явно недостаточно, чтобы клонировать целиком многие гены животных и растений, длина которых зачастую превышает 35–40 т.п.о. Требуемой емкостью обладают векторные молекулы, называемые космидами. Космиды представляют собой небольшие плазмиды, в которые *in vitro* введены *cot*-сайты ДНК фага λ . В ДНК нормальных фаговых частиц *cot*-сайты расположены на концах молекул, они разделяют мономеры фаговой ДНК в конкатемерах, объединяющих несколько соединенных «голова к хвосту» мономеров, которые являются предшественниками зрелых фаговых ДНК перед упаковкой в фаговые частицы. В таких конкатемерах соседние *cot*-сайты располагаются на расстоянии 35–45 т.п.о. друг от друга и заключают между собой весь фаговый геном. Таким образом, наличие *cot*-сайтов в ДНК является, по существу, единственным необходимым условием упаковываемости ДНК в фаговые частицы. Это означает, что последовательность нуклеотидов λ -ДНК, расположенная между двумя *cot*-сайтами, которая заключает в себе весь фаговый геном (35–45 т.п.о.), может быть замещена *in vitro* на аналогичный по длине (38–52 т.п.о.) фрагмент чужеродной ДНК и эффективно упакована в фаговые частицы (такова максимальная емкость головки фага). Естественно, что такая искусственная фаговая частица оказывается нежизнеспособной. Стадия упаковки ДНК космид в фаговые частицы используется лишь для облегчения процесса введения рекомбинантных ДНК большого размера внутрь бактериальных клеток. Такой процесс имитирует проникновение фаговой хромосомы в



бактерии во время фаговой инфекции. В случае космид сходство между их 44 проникновением в бактериальные клетки и фаговой инфекцией на этом заканчивается. Однако сходство является более глубоким в случае векторов, называемых фазмидами. Фазмиды представляют собой векторные молекулы ДНК, которые содержат в себе генетические элементы плазмид и хромосом бактериофагов. Они могут обладать емкостью в отношении клонируемой ДНК, характерной для λ -векторов, и существовать в определенных условиях в бактериальных клетках в виде плазмиды или же упаковываться в фаговые частицы *in vivo* при изменении этих условий. Сверхъемкие векторы γ AC, γ AC и γ AC. Мини-хромосомы дрожжей γ AC представляют собой кольцевые молекулы ДНК, содержащие большинство вышеупомянутых генетических элементов, которые позволяют им стабильно существовать во внехромосомном состоянии в клетках дрожжей. Векторы семейства γ AC являются челночными, т.е. обладают последовательностями нуклеотидов, необходимыми для их репликации в бактериальных клетках. Векторы γ AC, содержащие клонируемые последовательности, существуют в среднем в виде одной копии на клетку, и даже в отсутствие селективирующих условий утрачиваются с очень низкой частотой (10^{-3} – 10^{-5} за клеточную генерацию). При увеличении общего размера вектора до 140 т.п.о. и выше, частота потери его молекул не превышает таковую, характерную для обычных хромосом дрожжей. Следует упомянуть о семействе векторов γ AC (γ 1-derived artificial chromosome), также часто используемых в современных исследованиях. Векторы этой серии содержат гены умеренного бактериофага γ 1, обеспечивающие репликацию фаговой хромосомы в зараженных бактериальных клетках. Рекомбинантные ДНК на их основе (размер вставки 150–200 т.п.о.) вводятся в бактериальные клетки с помощью электропорации. Однако, в отличие от бактериофага λ , который во время скрытого (лизогенного) состояния встраивает свою хромосому в хромосому бактериального хозяина, фаг γ 1 поддерживает хромосому в цитоплазме бактериальных клеток в виде кольцевой ковалентно-замкнутой молекулы, напоминающей плазмиду, размер которой составляет 100 т.п.о. Размер репликона, который способен обеспечивать репликацию хромосомы γ 1 в лизогенном состоянии, составляет всего 1,5 т.п.о. Для преодоления



трудностей, возникающих при использовании искусственных хромосом дрожжей, были

сконструированы альтернативные векторные системы, среди которых наиболее популярными в настоящее время являются системы, основанные на искусственных хромосомах бактерий – ВАС (bacterial artificial chromosome). В векторных системах ВАС 45 используется ДНК полового фактора (F-фактора) *E. coli* – гигантской плазмиды мужских бактериальных клеток, которые являются донорами бактериальной ДНК при конъюгации с женскими клетками. Типичный F-фактор содержит гены *oriS*, *repE*, *parA* и *parB*, регулирующие его собственную репликацию и контролирующие число его копий в бактериальных клетках. В частности, гены *oriS* и *repE* обеспечивают однонаправленную репликацию F-фактора, а гены *parA* и *parB* поддерживают число его копий на уровне одной-двух на бактериальную клетку. Классический вектор ВАС (pBAC108L) включает в себя все эти гены, а также ген устойчивости к хлорамфениколу, используемый в качестве селективируемого маркера. Вектор содержит также фрагмент ДНК, по которому производится клонирование. В этом фрагменте имеются типичный полилинкер, а также два уникальных сайта рестрикции *HindIII* и *BamHI*, фланкированные промоторами T7- и Sp6-РНК-полимераз. Такие промоторы могут быть использованы для получения РНК-зондов, необходимых для осуществления «прогулок по хромосомам», а также прямого секвенирования клонированной ДНК в месте стыковки с вектором. Искусственные хромосомы животных (МАС) и человека (НАС). Конструирование МАС методом «сверху вниз». Данная стратегия основана на последовательном укорачивании природных хромосом с сохранением их элементов, обеспечивающих репликацию и митотическую сегрегацию. Эта группа методов известна как фрагментация хромосом, с использованием теломерных последовательностей (telomere-associated chromosome fragmentation – TACF) или укорачивание с помощью теломер (telomere directed truncation – TDT). Метод основан на гомологичной рекомбинации между вектором (YAC) и укорачиваемой хромосомой, в результате которой происходит замена большей части последовательностей плеч хромосомы на последовательности вектора. Такой вектор исходно содержит последовательности, гомологичные таковым изменяемой хромосомы, по которым происходит кроссинговер,



селектируемый маркер (обычно ген устойчивости к антибиотику нео или *gpt*, кодирующий гуанинфосфорибозилтрансферазу) и теломерные последовательности. Конструирование МАС методом «снизу вверх». При этом подходе искусственную минихромосому собирают из отдельных последовательностей, соответствующих теломерам, центромерам и областям начала репликации природных хромосом, с которыми объединяют требуемую рекомбинантную ДНК. Теломерные последовательности животных представляют собой tandemно повторяющиеся последовательности вида (TTAGGG)_n, которые, будучи объединенными в повторы длиной ~1 т.п.о., 46 эффективно функционируют в клетках человека. В качестве областей начала репликации могут быть использованы различные последовательности, среди которых наиболее изучены соответствующие последовательности βглобинового гена человека.

9. Рекомбинантная ДНК.

Под рекомбинантными понимают ДНК, образованные объединением *in vitro* (в пробирке) двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников. Ключевыми в этом определении являются слова «фрагмент ДНК» и «объединение *in vitro*», что указывает на сущность генетической инженерии и ее отличие от всех остальных методов получения гибридных (или химерных) организмов, таких как генетическая селекция, эмбриональная инженерия и т.д. Фрагменты ДНК, в том числе и фрагменты, содержащие гены, получают с использованием ферментов рестриктаз. Рестриктазы могут образовывать фрагменты как с тупыми, так и с липкими концами.

Сшивка фрагментов ДНК производится тремя основными методами, зависящими от того, какие концы имеют фрагменты сшиваемых ДНК.

Рестрикционно-лигазный метод Сшивка по одноименным «липким» концам. Этот метод является самым распространенным и популярным. Впервые этим способом гибридная ДНК была получена С. Коэном с сотрудниками в 1973 году. Некоторые рестриктазы, например Pst I, внося в цепи ДНК симметричные, расположенные наискось друг от друга разрывы на равных расстояниях от центра сайта узнавания и образующие



«ступеньку». Эти комплементарные друг другу участки имеют тенденцию к ассоциации за счет спаривания оснований, и поэтому их называют комплементарными или липкими концами.

Коннекторный метод. Сшивка по "тупым" концам. Липкие концы не абсолютно необходимы для связывания фрагментов ДНК. Тупые концы также могут быть соединены за счет действия ДНК-лигазы, если и лигаза, и тупые концы присутствуют в реакционной смеси в высоких концентрациях. В этом случае реакция лигирования имеет свои особенности и ее эффективность ниже, чем при сшивке по липким концам.

10. Клонотеки. Основы клонирования: дрожжей, растений, животных и человека

После того, как ДНК сшита в пробирке, ее необходимо размножить. Существует два подхода к клонированию ДНК. Первый подход предполагает использование бактериальных или дрожжевых клеток для размножения введенной в них чужеродной ДНК. Второй способ представляет собой амплификацию ДНК *in vitro*. Клонирование ДНК *in vivo*

Понятие библиотеки (клонотеки) нуклеотидных последовательностей. Уникальные гены, представленные в гаплоидном геноме только одной копией, затеряны среди других последовательностей генома, и для работы с индивидуальными рекомбинантными ДНК требуется их очистка от ненужного генетического материала. Такая задача в генной инженерии 56 решается через создание репрезентативных (представительных) клонотек последовательностей нуклеотидов ДНК или, иначе говоря, клонотек генов. Клонотека генов представляет собой набор разных последовательностей нуклеотидов ДНК, клонированных в составе векторных молекул, которые в сумме составляют весь геном исследуемого организма или какую-либо известную его часть. При этом репрезентативная клонотека должна заключать в себе с высокой долей вероятности любую последовательность нуклеотидов изучаемого генома. Экспериментальная оценка качества библиотеки последовательностей. Оценку качества клонотеки осуществляют путем определения среднего размера вставок в случайно выбранных клонах.

Методы синтеза кДНК. При конструировании клонотек кДНК прежде всего проводят очистку мРНК хроматографией на олиго-dT-целлюлозе,



которую используют в качестве матрицы при обратной транскрипции (см. рис. 9). Обратная транскриптаза, также как и ДНК-зависимая ДНКполимераза, для своего функционирования требует затравки в виде олигонуклеотида, как правило олиго(dT), который отжигают с 3'-концевой поли(А)-последовательностью мРНК. Элонгируя этот праймер, обратная транскриптаза синтезирует первую цепь кДНК. Удаление РНК-матрицы из гибрида проводят с помощью РНКазы Н или путем щелочного гидролиза мРНК. Образовавшиеся молекулы оцДНК имеют тенденцию самопроизвольно формировать вторичную структуру, что приводит к образованию структуры типа «стебель-петля» на 3'-конце оцДНК. Этот конец в свою очередь используется в качестве затравки при синтезе второй цепи кДНК ДНК-полимеразой I. В итоге образуется дцДНК, обе цепи которой на одном конце соединены между собой петлей из оцДНК. Петлю удаляют инкубацией с S1-нуклеазой, специфически гидролизующей одноцепочечные нуклеиновые кислоты. Альтернативно в цепи мРНК, использованной в качестве матрицы при синтезе первой цепи кДНК, спомощью РНКазы Н делают одноцепочечные разрывы. Образовавшиеся в итоге фрагменты мРНК далее используются ДНК-полимеразой I E. coli в качестве затравок при синтезе второй цепи кДНК. Повторная инкубация кДНК с ДНК-полимеразой приводит к окончательному «затуплению» ее концов, а концы кДНК фосфорилируют с помощью полинуклеотидкиназы, что необходимо для проведения последующего клонирования этих макромолекул. Для клонирования к концам кДНК присоединяют с помощью ДНК-лигазы олигонуклеотидные адаптеры, содержащие сайты рестрикции, необходимые для соединения с линеаризованным вектором. После этого кДНК фракционируют по размерам, очищают от оставшихся молекул адаптера и 5' клонируют по липким концам. В качестве вектора обычно используют плазмиды или инсерционные векторы на основе фага λ. Методы отбора требуемых последовательностей из клонотек ДНК. Способы получения требуемых последовательностей нуклеотидов из клонотек генов можно разделить на три группы. При использовании первой группы методов рекомбинантные бактерии или фаговые частицы исследуют на присутствие в них искомым последовательностей нуклеотидов путем последовательного перебора случайных клонов. При таком подходе, получившем название скрининга, творческие усилия исследователя



направлены только на облегчение самого процесса анализа клонов, например, на его автоматизацию. · Во втором случае, присутствие нужных последовательностей обнаруживают косвенно, по появлению в бактериальных клетках или фаговых лизатах бляшек продуктов экспрессии искомым генов – РНК, белков или ферментативной активности, т.е. определенного фенотипа, который отличает такие клоны от соседних, не содержащих соответствующих последовательностей. В этом случае исследователь среди большого количества суммарных клонов осуществляет выбор тех, которые резко отличаются от соседних по своему фенотипу, например, цвету колоний. При таком подходе производится выбор требуемого фенотипа среди большого числа других фенотипов. · Реализация третьего подхода требует создания селективных условий, при которых преимущество в размножении получают те клоны, которые отвечают требованиям отбора, например, приобрели способность к росту на селективных питательных средах в присутствии антибиотика или в отсутствие аминокислоты в случае исходно ауксотрофного штамма. Последний подход, кроме своего необыкновенного изящества в замысле, демонстрирует и самую высокую эффективность, так как позволяет «в одно касание» освободиться от всех нежелательных примесей в виде ненужных клонов. Гомологичные зонды. Использование гомологичных зондов, т.е. зондов, последовательность которых полностью соответствует исследуемому гену, становится возможным в том случае, если известна (например, из литературы или базы данных) первичная структура последовательности, которую пытаются обнаружить в клонотеке. Такая задача часто возникает, когда определенный ген или кДНК хотят использовать в прикладных целях, например, в биотехнологических разработках или для генотерапии наследственных заболеваний. Та же самая задача может возникнуть и при необходимости получения последовательности целого гена, если 5' предварительно клонирована его часть. Подход с использованием гомологичных зондов может быть применен и при исследовании популяционного полиморфизма исследуемых последовательностей. Сложнее обстоит дело в том случае, если на момент клонирования последовательность нуклеотидов исследуемого участка хромосомы совершенно неизвестна. Такие задачи иногда могут быть решены с использованием гетерологичных зондов. Гетерологичные зонды. Гетерологичные олигонуклеотидные зонды получают



на основании предположения о наличии гомологии в последовательностях у генов организмов разных биологических видов, которые выполняют аналогичные функции. При гибридизации гетерологичных зондов с ДНК исследуемой клонотеки используют более низкие температуры их отжига для того, чтобы даже при наличии нескольких неправильно спаренных оснований в гибриде, он оказался достаточно стабильным для обнаружения. Понижение температуры отжига зонда значительно ниже его температуры плавления будет почти неизбежно сопровождаться получением ложноположительных результатов, то есть гибридизацией зондов с неродственными последовательностями, которые обладают определенной гомологией с искомой. Во многих случаях этот результат не опасен, поскольку после такого предварительного отбора, круг поиска нужной последовательности существенно сужается. Проведение повторной гибридизации в других условиях среди предварительно отобранных клонов может привести к положительному результату. Ситуация становится угрожающей в том случае, если число ложноположительных клонов, выявленных на первом этапе отбора, становится слишком большим. В этом случае цена повторного скрининга может оказаться слишком высокой. Используя микроорганизмы, можно создавать два типа библиотек ДНК: геномную и клоную (кДНК). Геномная библиотека. 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. Принципы создания плазмидных и вирусных векторов общие, поэтому рассмотрим их на примере плазмидных. Следует отметить, что из вирусных ДНК лучше использовать ДНК фагов, так как они имеют большую емкость и позволяют вставлять более крупные куски генома. 59 Очищенные кольцевые молекулы ДНК обрабатывают рестриктазой, получая линейную ДНК. Клеточную ДНК обрабатывают той же рестриктазой, добавляют к плазмидной, добавляют лигазы. Таким образом, получают рекомбинантную плазмидную ДНК, которую вводят в бактериальные или дрожжевые клетки. Плазида реплицируется с образованием многих копий. Многие плазмиды



несут ген устойчивости к антибиотикам, и если в рекомбинантной плазмиде есть такой ген, то клетки легко выявлять, выращивая на среде с антибиотиком. Каждая такая колония представляет собой клон или потомство одной клетки. Плазмиды одной колонии содержат клон геномной ДНК, а совокупность плазмид можно назвать библиотекой геномной ДНК. Недостаток такого метода в том, что 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. Библиотека кДНК. Как описывали выше, создание кДНК начинается с синтеза на матрице РНК с помощью обратной транскриптазы комплементарной нити ДНК. Затем создают щелочные условия, разрушают цепь РНК на нуклеотиды, после чего с помощью ДНК-полимеразы синтезируют комплементарную цепь ДНК. При этом образуется фрагмент ДНК с тупыми концами. Такую ДНК встраивают в плазмиды и вводят в клетки бактерий. При амплификации плазмиды образуется клон комплементарной копии ДНК (кДНК). Преимущества клоновой ДНК перед клонами геномной ДНК в том, что кодирующая белок нуклеотидная последовательность гена ничем не прерывается. Гены эукариот содержат интроны, которые должны удаляться из транскриптной РНК перед превращением ее в матричную, после чего следует сплайсинг (сращивание). Бактериальные клетки не могут осуществлять такую модификацию РНК, образовавшуюся путем транскрипции гена эукариотической клетки. Поэтому если преследуют получение белка путем экспрессии клонированного гена, то лучше использовать банк кДНК, полученной на основе матричной РНК. В 1985 году К. Мюллис с сотрудниками разработали метод клонирования последовательностей ДНК *in vitro*, который получил название полимеразной цепной реакции (ПЦР). К анализируемому образцу ДНК добавляют в избытке 2 синтетических олигонуклеотида - праймера размером около 20 нуклеотидов. Каждый из них комплементарен одному из 3'-концов фрагмента ДНК. ДНК нагревают для разделения цепей двойной спирали, а при охлаждении происходит гибридизация праймеров с комплементарными участками фрагментов ДНК. В результате в растворе будут находиться одонитевые ДНК с короткими двухцепочечными участками - затравками (праймерами). Реакция



останавливается и ДНК снова денатурируется прогреванием. В процессе охлаждения праймеры, находящиеся в избытке, вновь эффективно гибридизуются, но уже не только с цепями исходной ДНК, но и с вновь синтезированными. Внесение в систему ДНК-полимеразы инициирует второй цикл полимеразной реакции. Многократное повторение описанной процедуры позволяет провести 30 и более циклов ферментативного удлинения праймеров. При этом число сегментов ДНК, ограниченных с обоих концов используемыми праймерами, с каждым циклом ПЦР увеличивается экспоненциально (приближается к зависимости 2^n , где n — число циклов). Выход всех других продуктов реакции увеличивается по линейной зависимости.

11. Клонирование эмбрионов и стволовые клетки: свойства стволовых клеток, методы получения стволовых клеток. Трансплантация и клонирование.

Терапевтическое клонирование. Технология предполагает получение эмбриональных стволовых клеток для научных экспериментов и возможного применения в терапии разных заболеваний человека. В процессе терапевтического клонирования эмбрион не будет переноситься для дальнейшего роста и развития в женскую матку, как в репродуктивном клонировании, вместо этого он применяется в качестве объекта для исследования учеными и экспериментальных анализов. Такая зигота отипотентная, то есть из любой клетки можно развить зародыш при определенных условиях. На стадии бластоцисты появляются плюрипотентные клетки, из них в будущем формируются все ткани и органы живого существа. Во время терапевтического способа клонирования эмбрион уничтожается неизбежно, когда будет образована первичная полоска клеток – ствол. Ведь их дальнейшее развитие осуществляется в искусственной среде, в зависимости от того, какую ткань нужно получить.

Репродуктивное клонирование - тип клонирования, которое выполнено с целью создания дубликата другого организма. Это достигнуто, используя процесс, названный соматической клеткой ядерная передача. В 1996, шотландские исследователи объявили, что они успешно клонировали первое млекопитающее, овцу, которая стала известной как Долли. Многочисленные



другие млекопитающие были клонированы с тех пор, и клонирование стало спорной этической и научной проблемой в некоторых частях мира.

Репродуктивное клонирование человека — предполагает, что индивид, родившийся в результате клонирования, получает имя, гражданские права, образование, воспитание, словом — ведёт такую же жизнь, как и все «обычные» люди. Репродуктивное клонирование встречается со множеством этических, религиозных, юридических проблем, которые сегодня ещё не имеют очевидного решения. В некоторых государствах работы по репродуктивному клонированию запрещены.

Генная терапия - это лечение наследственных, мультифакториальных и ненаследственных (инфекционных, злокачественных и др.) заболеваний путем введения

генов в соматические клетки пациентов с целью направленного изменения генных дефектов или придания клеткам новых свойств. Существует несколько способов введения новой генетической информации в клетки. Это позволяет разрабатывать прямые методы лечения наследственных болезней.

Используют два основных подхода: фетальная генотерапия, при которой чужеродную ДНК вводят в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития; при этом ожидается, что введенный материал попадет во все клетки реципиента (и даже в половые клетки, обеспечив тем самым передачу следующему поколению); соматическая генотерапия, при которой генетический материал вводят только в соматические клетки и он не передается половым клеткам. Спектр заболеваний, при которых проводятся клинические испытания по генной терапии, также чрезвычайно широк. Независимо от нозологии, в области соматической генной терапии имеются общие задачи. Это: — выбор наиболее эффективного для лечения гена; — разработка способов доставки требуемого гена в нужные клетки; — изучение и обеспечение эффективных подходов и способов нужной регуляции гена; — вопросы длительности существования и экспрессии введенного гена;

— обеспечение безопасности больного. Проблемы: Доставка требуемого гена в нужные ткани при минимизации его контакта с биологическими средами организма додостижения клетки-мишени Обеспечение доставки гена в нужную клетку с целью его эффективной и



безопасной работы в ней. Генетический материал доставляется в клетку либо в виде «голой» ДНК («naked DNA»)/плазмиды, в том числе в составе наночастиц и липосом, либо с использованием векторов вирусной и невирусной природы, защищающих ДНК от разрушения и имеющих тропность к определенным тканям. Самым простым способом доставки трансгенов является доставка «голой» ДНК/плазмиды. При этом для целей доставки генетического материала в ядро клетки используется арсенал различных средств. Это может быть физический метод доставки ДНК с применением таких приемов, как прямая инъекция «голой» ДНК, электропорация клеток и доставка ДНК через поры в обработанных мембранах, бомбардировка частицами с ДНК с использованием гидродинамической пушки.

12. Сочетание методов адаптивной системы селекции и генетической инженерии растений.

Современные подходы к управлению генотипической изменчивостью в селекции растений основаны на положениях экологической генетики об особенностях формирования и функционирования адаптивного потенциала высших организмов. В числе таковых принципиально новые взгляды на роль мутаций и рекомбинаций у цветковых растений; на генетическую природу структурной организации и функционирования количественных признаков; на растение как интегрированную систему генетических детерминантов ядра и цитоплазмы (всего идиотипа), а не мешка горошин-генов менделирующих признаков; роль абиотических и биотических условий внешней среды, выступающих не только в качестве факторов отбора (функция сепарации), но и индукторов мутационной и рекомбинационной изменчивости организмов.

Сочетание методов адаптивной системы селекции и генетической инженерии растений

Рекомбинационная селекция обеспечивает непрерывное расширение спектра доступной отбору генетической изменчивости хозяйственно ценных и адаптивно значимых признаков, в том числе постоянное увеличение числа идентифицированных генетических доноров потенциальной урожайности и экологической устойчивости. Для этого широко применяют методы эндогенного и экзогенного индуцирования генетической изменчивости,



преодоления половой несовместимости между видами одного семейства, гаметофитного отбора, позволяющего на основе больших популяций пыльцы идентифицировать на искусственных фонах генотипы, функционально эквивалентные искомым спорофитам и т.д. Рассматривая возможности интеграции адаптивной системы селекции и генетической инженерии следует прежде всего определить принципиально новые приоритеты самой селекции растений, вытекающие из современного понимания: - роли интегрированности генома и всего идиотипа у высших эукариот, проявляющейся в формировании блоков коадаптированных генов и сохранении их status quo при передаче наследственной информации от одного поколения другому; - необходимости перехода от управления изменчивостью моногенных признаков к комбинаторике количественных (полигенных) признаков, многие из которых относятся к хозяйственно ценным; - первостепенной роли мейотической рекомбинации (а не мутаций) в формировании потенциальной, свободной и доступной отбору генетической изменчивости у цветковых растений; - роли абиотических и биотических факторов внешней среды, определяющих не только направление и темпы естественного отбора ("формирующее" влияние биоценотической среды), но и выступающих в качестве индукторов генетической изменчивости (мутационной, рекомбинационной, репарационной, транспозиционной); - необходимости сочетания в сортах и гибридах высокой потенциальной продуктивности, устойчивости к действию абиотических и биотических стрессоров, а также продукционных и средообразующих (почвоулучшающих, фитомелиоративных, фитосанитарных, ресурсовосстанавливающих, дизайно-эстетических и др.) функций; - важности развития новых направлений селекции, включая фито-(био)ценотическое, биоэнергетическое, экотипическое, экологическое, симбиотическое, а также апомиктическое, гаметное и др. ; - возможности использования "доместикационного синдрома" с целью введения в культуру новых видов и экотипов растений (экологическая и экотипическая селекция). В то же время современная селекция характеризуется целым рядом трудностей и нерешенных проблем, к числу важнейших из которых можно отнести следующие: 1. Чем больше признаков селекционер стремится объединить в одном сорте или гибриде, тем ниже темпы искусственного отбора, тем больше времени требуется для создания нового сорта. Наличие отрицательных



генетических и биоэнергетических по своей природе корреляций между признаками существенно снижает темпы создания новых сортов. 2. Возможности традиционной селекции особенно ограничены при использовании зародышевой плазмы таксономически неродственных и отдаленных видов. Основным препятствием при этом являются генетически детерминированные презиготические и постзиготические барьеры. При использовании в качестве доноров ценных признаков диких родичей культурных растений продолжительность и масштабы селекционного процесса резко возрастают. 3. Дальнейший рост урожайности по важнейшим культурам сдерживается уже достигнутым высоким индексом урожая (0,5-0,8). 4. Усиление зависимости вариабельности величины и качества урожая от нерегулируемых факторов внешней среды, доля которых по основным зерновым культурам превышает 60 %. 5. При внесении больших доз минеральных удобрений и мелиорантов, использовании полного набора пестицидов и средств механизации происходит экспоненциальный рост затрат исчерпаемых ресурсов на каждую дополнительную единицу урожая, в том числе пищевую калорию, усиливается зависимость продуктивности агроэкосистем от техногенных факторов, ускоряются процессы и возрастают масштабы загрязнения и разрушения окружающей среды. 6. Антиэволюционные тенденции в селекции и конструировании агроэкосистем, проявляющиеся в увеличении генетической однородности сортов и однотипности агроценозов в противовес их агроэкологической специализации, гетерогенности и дизайно-эстетической привлекательности. 7. При интеграции селекционно-агротехнических и генно-инженерных программ в большинстве случаев оказывается неизвестной генетическая природа хозяйственно ценных количественных признаков, а также эффектов их взаимодействия. 8. Как в традиционной селекции, так и при трансгенозе использование новых генетических доноров, как правило, требует значительной предварительной селекционной работы. Анализ достижений селекции в 50-80-х годах XX столетия свидетельствует также о том, что большинство улучшенных агрономических признаков, обусловивших рост урожайности, имеет полигенный, комплексный характер. Созданы сорта и гибриды с широкой агроэкологической адаптацией, более медленным старением листьев, устойчивостью к полеганию, толерантностью цветков к



абортированию в условиях жары и засухи, горизонтальной устойчивостью к болезням и др. Основное внимание в современных селекционных программах уделяется сочетанию высокой потенциальной продуктивности сортов и способности противостоять действию абиотических и биотических стрессоров. В числе основных причин такой ориентации - тенденции к увеличению разрыва между рекордной и средней урожайностью по важнейшим сельскохозяйственным культурам (обычное соотношение 4:1), повышению зависимости величины и качества урожая от применения техногенных средств, а также погодных флуктуаций (вариабельность урожайности по годам на 60-80 % обусловлена "капризами" погоды). Следовательно, дальнейшее успешное развитие селекции растений требует использования качественно новых методов, технологий и биологических концепций. Известно, что генетика количественных признаков, игнорируя реальную генетическую природу их структурной организации и функционирования, длительное время базировалась на методах, сводящих сложные признаки к простым ("главным факторам" и пр.). В дальнейшем была признана динамичность формирования количественных признаков в морфогенезе, обуславливающая многовариантность реализации матричных структур (на пути ген- признак), перераспределение экспрессии генов и блоков генов в процессе формирования сложного признака и т.д. В настоящее время количественные признаки обычно рассматривают как динамичную многовариантную целостность, выявить генетическую природу всех составляющих которой практически невозможно. Что же касается генетических маркеров (marker-assisted-selection - MAS), реализующих свой эффект в отношении количественных признаков, то их идентификация остается весьма сложной, а практическое использование в селекции ограниченным. Поскольку с помощью генетической инженерии не создают, а только улучшают уже адаптированные к определенным условиям внешней среды, а также технологиям возделывания сорта и гибриды, в комплексных селекционно-агротехнических программах должны быть изначально определены цели и этапы использования классических и биоинженерных методов управления наследственной изменчивостью при реализации той или иной морфофизиологической модели сорта (гибрида). Показано, например, что высокая адаптивность сорта озимой пшеницы Мироновская 808,



получившего широкое распространение в самых разных почвенно-климатических и погодных условиях возделывания, объясняется идеальной агроэкологической "подогнанностью" его генома и цитоплазмы (плазмона), что и определяет высокую зимостойкость и гомеостатическую способность колоса, а также выносливость при загущении стеблестоя (Хангильдин, 1996). Параллельно с использованием генетического потенциала окультуренных видов, а также с учетом многочисленных неудачных попыток повысить их морозоустойчивость и зимостойкость, соле- и кислотоустойчивость, скороспелость и фотосинтетическую производительность в предстоящий период особое внимание будет уделено введению в культуру новых видов (направление "смены вида"), обладающих большим потенциалом конститутивной адаптивности. В число первоочередных задач при этом выдвигается "приручение" новых видов бобовых культур, в том числе клубнеплодных, кустарниковых, пастбищных, фуражных и др. Перспективно также введение в культуру новых видов масличных, зерновых, зернобобовых, луковичных и корнеклубнеплодных, многие из которых не только устойчивы к действию экологических стрессоров, но и характеризуются высоким содержанием биологически ценных веществ. При этом повышение урожайности новых культур будет обеспечиваться за счет признаков, как усиливающих потенциальную продуктивность растений, так и снижающих отрицательное действие лимитирующих величину и качество урожая абиотических и биотических факторов. Особенно большие возможности генетической инженерии открываются, на наш взгляд, в плане использования методов трансгеноза для индукции мейотической рекомбинации на основе переноса в межвидовые гибриды растений эндогенных индукторов кроссинговера (Жученко, 1980, 1988, 2001). В последние годы доказано, что перенос гена *hcs A* в растения табака позволяет увеличить рекомбинационную изменчивость. В опытах Авдеева с соавт. (2000) установлено, что у регенерантов и гибридов трансгенных растений томата, несущих ген кристаллического белка дельта- эндотоксина, повышается частота выщепления "редких" мутаций. В наших опытах обнаружено изменение частоты рекомбинации между локусами *ful-e* у гибридов томата, полученных при участии трансгенной формы с *Ds*-элементом в 4-й хромосоме. Одновременно отмечены и изменения расщепления по фенотипическим



классам (Соловьев с соавт., отчет лаборатории рекомбиногенеза ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии за 2002 год). В процессе интеграции методов адаптивной системы селекции и трансгеноза первостепенное внимание должно быть уделено повышению устойчивости сортов и гибридов к болезням, вредителям и сорнякам. О важности этого направления селекции свидетельствует уже тот факт, что общее число потенциально вредоносных для агроэкосистем видов достигает 80-100 тыс., в том числе свыше 30 тыс. возбудителей грибных, бактериальных и вирусных заболеваний, около 10 тыс. членистоногих и др. Несмотря на увеличение количества применяемых в сельском хозяйстве пестицидов (например в США 400 тыс. т в год) к началу XXI столетия потери урожая составляют в среднем 33 %. Общая же цена потерь урожая сельскохозяйственных растений в мире, согласно имеющимся оценкам, только от болезней достигает 50 триллионов долларов в год. В этой связи большие перспективы представляет сочетание методов традиционной селекции и трансгеноза при создании сортов с вертикальной устойчивостью, а также многолинейных и синтетических сортов. Связано это с тем, что методы генной инженерии позволяют встраивать в растение-реципиент сразу несколько разных генов устойчивости, создавая, таким образом, "пирамиду генов", обеспечивающую комплексную резистентность сорта. Однако нет оснований утверждать, что генная инженерия якобы сокращает время выведения сортов с требуемыми характеристиками (Шеламова, 2001 и др.), так как для этого всегда используют уже приспособленные к местным условиям внешней среды (почве, климату, погоде, технологиям возделывания) сорта, для создания которых необходимо 5-10 лет и более. На многих объектах установлена корреляция между признаками, проявляющимися на гаметофитном и спорофитном уровнях (Мирюта, 1967; Жученко, 1980; Кравченко с соавт., 1988 и др.). Например, экспериментально показано, что устойчивость томата к повышенной температуре (жаростойкость) коррелирует с определенным спектром эстераз в пыльце, их активностью и термостабильностью, а также характером изменчивости морфоцитохимических признаков самой пыльцы (Кравченко, 2000). При этом на гаплоидном уровне могут экспрессироваться такие признаки, выявить которые у диплоидов обычно не удастся (Hollingshead, 1930; Muntzing, 1934; Katayama, 1954).



Однако с переходом к отбору на гаплоидном уровне, например у кукурузы, существенно изменяется отношение между признаками (Ротаренко, 2000), что в свою очередь усложняет прогноз их проявления у диплоидов. К настоящему времени доказана возможность введения экзогенной ДНК в растения посредством прорастающей пыльцы (Чесноков, 2000).

Таким образом, с помощью гаметной селекции и гаметофитного отбора можно успешно решать следующие селекционно-генетические задачи: - Улучшение показателей самих репродуктивных структур, и в частности пыльцы (изменение аэродинамических свойств и фертильности; повышение пыльцепроизводящей функции растений, а также способности пыльцы прорасти при пониженных или, наоборот, повышенных температуре, влажности, освещенности и других стрессовых ситуациях). - Изменение признаков спорофита за счет оценки и отбора генетически разнокачественных пыльцевых зерен, то есть на основе использования корреляций между признаками гаметофита и спорофита. - Оценка эндогенного (включая трансгеноз) и экзогенного индуцирования частоты и спектра рекомбинационной изменчивости, проявления признаков пыльцы у гибридов F₁, характера их наследования, а также дифференциального роста пыльцевых трубок *in vitro* и *in vivo*. - Исследование особенностей проявления признаков на гаплоидном уровне, в том числе с учетом того, что у диплоидов некоторые признаки не экспрессируются. Повышение точности гибридологического анализа за счет учета возможностей элиминации маркированных рекомбинантных микрогамет, а также изменения соотношений между фенотипическими классами растений в расщепляющихся поколениях. Поскольку гаметная селекция, базирующаяся на прямом (свойства самой пыльцы) и косвенном (корреляция между признаками гаметофита и спорофита) отборе пыльцы, позволяет значительно ускорить селекционный процесс, очевидна не только возможность, но и целесообразность сочетания методов гаметной селекции и трансгеноза. В основу такой интеграции может быть положена гибридизация трансгенных форм с сортами-реципиентами, а также использование самой пыльцы в качестве генетически модифицируемого объекта. Главные преимущества сочетания методов гаметной селекции и генной инженерии состоят, на наш взгляд, как в возможности оценки громадного числа гамет для прямого отбора искомых генотипов на специально



созданных и сравнительно легко регулируемых фонах, так и в увеличении вероятности идентификации ценных спорофитов на основе корреляционного анализа (косвенный гаметофитный отбор). В интеграции методов современной селекции и биоинженерии исключительно важную роль играет возможность с помощью последней решать две принципиально разные, но одинаково приоритетные для селекции и семеноводства растений задачи: различать генотипы растений и паспортизировать сорта, а также выявлять гены, контролируемые хозяйственно ценные и адаптивно значимые признаки (Хавкин, 2000). Благодаря достижениям молекулярной биологии и популяционной генетики в настоящее время генетическая гетерогенность растений и пыльцы может быть оценена не только по агрономическим и биохимическим признакам, как это было во времена Н.И. Вавилова, но и на молекулярном уровне (изоферментный анализ, одномерный и двумерный электрофорез, рестрикция ДНК и др.). При оценке генетического разнообразия особого внимания заслуживает учет новых аллелей, а также новых сочетаний генов (с указанием географического происхождения и генеалогии образцов, их географической отдаленности, степени генеалогического родства и т.д.). О биологическом разнообразии объектов исследования можно также судить по индикаторам расстояния или дивергенции между признаками (Masson, 1986). Выбор признаков и их число в каждом конкретном случае определяют с учетом поставленной задачи, а сами признаки, в том числе продуктивности и устойчивости, оценивают в потомстве отборов.

Итак, в XXI веке роль сочетания методов адаптивной системы селекции и трансгеноза в формировании величины и качества урожая, а также средоулучшающих и ресурсовосстанавливающих функций агроэкосистем может не только существенно возрасти, но и оказаться решающей при целенаправленном управлении наследственностью и изменчивостью культурных растений. При этом основополагающее значение селекции в дальнейшем наращивании производства сельскохозяйственной продукции обусловлено тем, что применение техногенных средств интенсификации в промышленно развитых странах уже достигло порога антропогенного насыщения агробиогеноценозов, а для большинства развивающихся стран остается недоступным. Поскольку уже практически полностью использованы резервы расширения площадей плодородных почв и запасов пресной воды, а



затраты невосполнимых ресурсов на каждую дополнительную единицу урожая и масштабы деградации природной среды имеют постоянную тенденцию к росту, будущее цивилизации зависит от возможностей биологизации и экологизации интенсификационных процессов в системе сельскохозяйственного природопользования.

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 окончании учебного семестра (промежуточная аттестация) является экспертная оценка преподавателя, учитывающая: текущую успеваемость в течение семестра (Устный опрос, реферативные сообщения). 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 зачета по билетам. Билет содержит два теоретических вопроса.

4.2 Критерии оценивания промежуточной аттестации по видам оценочных средств

Критерии оценивания теоретического вопроса

Зачтено

Студент глубоко и полно владеет содержанием учебного материала и понятийным аппаратом; умеет связывать теорию с практикой, иллюстрировать примерами, фактами, данными научных исследований; осуществляет межпредметные связи, предложения. Делает выводы; логично, четко. Ясно и кратко излагает ответы на поставленные вопросы; умеет обосновывать свои суждения и профессионально-личностную позицию по излагаемому вопросу. Ответ носит самостоятельный характер. Допущенные



ошибки исправляются студентом после дополнительных вопросов экзаменатора.

Не зачтено

Студент обнаруживает знание и понимание основных положений учебного материала, но излагает его неполно, непоследовательно, допускает неточности и существенные ошибки в определении понятий, формулировке положений, не привлекает для аргументации ответа основные положения исследовательских, концептуальных и нормативных документов, не умеет обосновать свои суждения; наблюдается нарушение логики изложения. Ответ отличается низким уровнем самостоятельности, не содержит собственной профессионально-личностной позиции.

Или, студент имеет разрозненные, бессистемные знания: не умеет выделять главное и второстепенное; допускает ошибки в определении понятий, формулировке теоретических положений, искажающие их смысл; не ориентируется в нормативно-концептуальных, программно-методических, исследовательских материалах, беспорядочно и неуверенно излагает материал; не умеет соединять теоретические положения с педагогической практикой; не умеет применять знания для обоснования и объяснения фактов, не устанавливает 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 зачета	Требования к знаниям
Зачтено	Студент глубоко и полно владеет содержанием учебного материала и понятийным аппаратом; умеет связывать теорию с практикой, иллюстрировать примерами, фактами, данными научных исследований; осуществляет межпредметные связи, предложения. Делает выводы; логично, четко. Ясно и кратко излагает ответы на поставленные вопросы; умеет обосновывать свои суждения и профессионально-личностную позицию по излагаемому вопросу. Ответ носит самостоятельный характер. Допущенные ошибки исправляются студентом после дополнительных вопросов экзаменатора.
Не зачтено	Студент обнаруживает знание и понимание основных положений учебного материала, но излагает его неполно, непоследовательно, допускает неточности и существенные ошибки в определении понятий, формулировке положений, не привлекает для аргументации ответа основные положения исследовательских, концептуальных и нормативных



документов, не умеет обосновать свои суждения; наблюдается нарушение логики изложения. Ответ отличается низким уровнем самостоятельности, не содержит собственной профессионально-личностной позиции. Или, студент имеет разрозненные, бессистемные знания: не умеет выделять главное и второстепенное; допускает ошибки в определении понятий, формулировке теоретических положений, искажающие их смысл; не ориентируется в нормативно-концептуальных, программно-методических, исследовательских материалах, беспорядочно и неуверенно излагает материал; не умеет соединять теоретические положения с педагогической практикой; не умеет применять знания для обоснования и объяснения фактов, не устанавливает межпредметные связи.



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

Фонд оценочных средств для промежуточной аттестации по дисциплине (модулю) "Генная инженерия" специальности 06.05.01 "Биоинженерия и биоинформатика" специализации
Биоинженерия и биоинформатика ФГБОУ ВО «ЧелГУ»

Стр. 52

**06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика специализация
Биоинженерия и биоинформатика, фонд оценочных средств для
промежуточной аттестации по дисциплине «Генная инженерия», 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.Р. Ахмадуллина

***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»***