КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. аль-Фараби

Факультет Биологии и биотехнологии

Кафедра биотехнологии

Образовательная программа по специальности 6В05103 – «Биотехнология»

MMBT 7302 «Методы молекулярной биотехнологии»

*Лекция 1.*

Гибридизация нуклеиновых кислот. ДНК-зонды. Блоттинг, его виды. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК: метод Максама-Гилберта, метод Сэнгера, их модификации. Методы количественной детекции нуклеиновых кислот. Полимеразная цепная реакция. ОТПЦР. Количественная ПЦР. Спектрофотометрические и флуорометрические методы

определения концентрации нуклеиновых кислот.

*Лекция 2.*

Методы выделения фаговой ДНК. Методы выделения плазмидной и геномной ДНК из клеток бактерий. Методы выделения геномной ДНК из эукариотических клеток. Методы выделения РНК. Дифференциальное центрифугирование. Центрифугирование в градиенте плотности. Методы получения ступенчатых и непрерывных градиентов плотности.

*Лекция 3.*

Хроматография при низком давлении. Хроматография при высоком давлении. Гельфильтрация. Адсорбционная хроматография. Ионообменная хроматография. Аффинная хроматография. Электрофорез. Изоэлектрическое фокусирование. Иммунный электрофорез. Спектр электромагнитного излучения, его основные характеристики и способы их выражения (длина волны, частота, волновое число, поток излучения, интенсивность). Ультрафиолетовая, видимая и инфракрасная области спектра. Классификация спектроскопических методов. Рентгеноструктурный анализ.

*Лекция 4.*

Методы генетической инженерии: рекомбинантные ДНК. Ферменты генетической инженерии. Рестриктазы и их виды, свойства и особенности воздействия на ДНК. Клонирование ДНК. Плазмиды. Векторы для молекулярного клонирования. Методы исследования экспрессии эукариотических генов в клетках бактерий. Стабильность гибридных молекул ДНК в клетках бактерий. Направленный мутагенез молекул ДНК in vitro. Получение генов (кДНК) с использованием обратной транскрипции. Химико-ферментативный синтез генов.

*Лекция 5.*

Методы перенесения ДНК в клетки бактерий и эукариот. Трансформация, трансфекция, трансдукция, конъюгация. Перенесение ДНК в клетки эукариот, стабильная и транзиентная экспрессия генов (Са-фосфатная трансфекция, электропорация, баллистическая трансфекция, микроинъекции). Репортерные гены. Векторы для встраивания чужеродной ДНК в геном млекопитающих и дрозофилы. Векторные системы на основе вирусов животных. Вирусы насекомых как векторы высокоэффективной экспрессии чужеродных белков. Векторная система на основе транспозонов эукариот. Противовирусные вакцины.

*Лекция 6.*

Нокаут и нокдаун генов в эукариотических клетках. РНК-интерференция. Малые интерферирующие РНК (siRNA). Механизм образования siRNA. Подавление экспрессии генов с помощью РНК-интерференции (нокдаун генов). Векторы для РНК-интерференции. Особенности РНК-интерференции у разных организмов (растения, беспозвоночные, млекопитающие). Методы получения нокаута и нокдауна генов у млекопитающих. CRISPRсистема и ее применение. Способы разрушения бактериальных и эукариотических клеток. Растворы, используемые для экстракции. Буферные растворы и специальные добавки. Оптимизация и осветление экстракта. Особенности приготовления экстрактов растительных и животных тканей и микроорганизмов. Принципы выделения, очистки и количественного определения белков. Критерии чистоты ферментных препаратов. Денатурация белков и полипептидов. Специфические методы очистки белков (хроматография, электрофорез белков, иммунопреципитация, выявление и картирование эпитопов с помощью моноклональных антител, ультрафильтрация, избирательное осаждение, обратимая денатурация). Реакционная способность боковых цепей аминокислотных остатков в молекулах нативных и денатурированных белков.

*Лекция 7.*

Методы исследования посттрансляционных модификаций аминокислотных остатков в молекулах белков (фосфорилирование, гликозилирование, гидроксилирование, сумаилирование, и др.). Реакции на чужеродные антигены, механизмы этих реакций, их проявление, течение в норме и при патологии. Методы исследования, основанные на этих реакциях. Иммуноферментный анализ. Получение антител с требуемой специфичностью. Пришивание фермента к антителам. Варианты методик ИФА.

*Лекция 8.*

Методы исследования ДНК-белковых взаимодействий. Методы футпринтинга. Методы исследования белок-белковых взаимодействий. Вестерн-блоттинг. Коиммунопреципитация. Дрожжевая двугибридная система. Микроскопические методы изучения живой клетки. Флуоресцентная микроскопия. Источники света. Флуоресцентные фильтры. Детекторы. Конфокальный микроскоп. Цифровое изображение. Обработка и анализ изображения.

*Лекция 9.*

Технология микрочипов. Принципы организации. ДНК-микрочипы, белковые микрочипы. Современные методы геномики: иммунопреципитация хроматина (X-ChIP), DamID, chromosome conformation capture (3C, Hi-C), RIP, CLIP, ChIA-PET, анализ в единичных клетках. Современные методы массированного определения нуклеотидной последовательности ДНК (NextGenerationSequencing): преимущества и недостатки разных технологических платформ.

*Лекция 10.*

Современные методы протеомики. Хроматография, двумерный электрофорез. Методы массспектрометрии.

*Лекция 11.*

Методы масс-спектрометрии. Ионизация, масс – анализаторы, детекторы, анализ белковых комплексов.

*Лекция 12.*

Методы электрофореза. Матрица, электрофорез белков, электрофорез нуклеиновых кислот, каппилярный электрофорез, электрофорез микрочипах.

*Лекция 13.*

Методы масс-спектрометрии. Ионизация, масс-анализаторы, детекторы, анализ белковых комплексов.

*Лекция 14.*

Синтетические олигонуклеотиды. Мутагенез. Синтез олигонуклеотидов. Аптамеры. Неправильный мутагенез.

*Лекция 15.*

Методы спектроскопии. Спектроскопия

**Вопросы для самоконтроля**

1. Рестриктазы и метилазы. Рестриктазы I, II и III типа. Участки узнавания и расщепления рестриктаз. Изошизомеры.

2. ДНК лигазы. ДНК-лигаза фага Т4. ДНК-лигазаE. coli. Функции ДНК-лигаз in vivo. Использование в генетической инженерии.

3. ДНК-полимеразы. Свойства ДНК-полимераз. Применение в генетической инженерии.

4. Термостабильные ДНК-полимеразы. Полимеразная цепная реакция. Общие принципы и области применения.

5. Обратные транскриптазы (ревертазы). Синтез кДНК. Определение содержания мРНК с использованием ПЦР в режиме реального времени.

6. Секвенирование ДНК. Химический метод Максама-Гильберта. Энзиматический метод Сэнгера.

7. Сравнение разных технологий высокопродуктивного секвенирования ДНК.

8. Плазмидные векторы для бактерий, принципы организации, основные функциональные элементы, сферы применения.

9. Спектр электромагнитного излучения, его основные характеристики.

10. Векторы на основе бактериофагов (М13, лямбда). Космидные векторы. РАС- и ВАСвекторы. Преимущества и недостатки разных типов клонирующих векторов.

11. Экспрессия чужеродных генов в бактериях. Продукция рекомбинантных белков. Секреция белков. Принципы выделения и очистки рекомбинантных белков.

12. Ретровирусные векторы. Лентивирусные векторы. Сравнение ретро- и лентивирусных векторов.

13. Направленное встраивание генов в геном. Позитивно-негативная селекция. Рекомбиназы и их использование для генетических манипуляций. Нокаут генов с использованием сайт-специфичной рекомбинации.

14. Генная терапия. Векторы для генотерапии. Векторы на основе ретровирусов, лентивирусов, аденовирусов.CRISPR-система и ее использование.

15. Нокдаун генов. РНК-интерференция. Малые интерферирующие РНК (siRNA). Механизм образования siRNA. Подавление экспрессии генов с помощью РНКинтерференции, его особенности у разных организмов.

16. Перенос ДНК в клетки бактерий и млекопитающих. Неспецифические методы введения ДНК (Са-фосфатная трансфекция, электропорация, микроиньекции). Стабильная и транзиентная (временная) экспрессия генов в клетках млекопитающих. Репортерные гены.

17. Количественный анализ экспрессии генов. ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

18. Методы исследования структуры хроматина (ChIP, DamID).

19. Методы выделения плазмидных и геномных ДНК из бактериальных и эукариотических клеток.

20. Методы хроматографического разделения макромолекул.

21. Фракционирование макромолекул методом центрифугирования.

22. Методы экстракции.

23. Методы исследования посттрансляционных модификаций белков.

24. Методы очистки белков.

25. Антитела, их использование в молекулярной биологии.

26. Методы исследования ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействий.

27. Современные методы протеомики.

28. Методы анализа транскриптома в единичных клетках.

29. Hi-C и ChIA-PET методы анализа пространственных взаимодействий белков.

30. Микрочипы, их применение в молекулярной биологии.

31. Микроскопические методы изучения живой клетки

Литература

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М., Мир, 2002. – 589 с.

2. Уилсон К., Уолкер ДЖ. Принципы и методы молекулярной биологии. Бином, 2013. – 848 с.

3. Шмид Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия. М., Бином, 2014. – 324 с.

4. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы. Т.1. Генная и белковая инженерия. БЕН РАН, 2004. - 526 с.

5. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии. С-Петербург. Гос. Техн. Ун-т, 1999 – 521 с.

6. Тихов Г.Л. Основы биотехнологии: методические рекомендации. Альтаир: МГВАТ, 2009. – 133 с.

7. Кольман Я., Рем К.Г. Наглядная биохимия. М., Бином, 2011.

8. Захарова С.П., Евсеева Т.В., Ярош А.В.. Путеводитель по Интернет-ресурсам. Биотехнология: по состоянию на сентябрь 2018. Омск, 2018. – 39 с.

Интернет ресурсы:

1. <http://elibrary.kaznu.kz/ru>

2. <http://znanium.com/catalog/product>

3. [https://urait.ru/book/processy-i-apparaty-biotehnologii-fermentacionnye-apparaty](https://urait.ru/book/processy-i-apparaty-biotehnologii-fermentacionnye-apparaty-431495)

4. [https://urait.ru/book/processy](https://urait.ru/book/processy-i-apparaty-zaschity-okruzhayuschey-sredy-v-2-ch-chast-1-434568)

Лектор, и.о. доцента, к.б.н.: Ултанбекова Г.Д.