**Семинарское занятие 1**

**Значение и область применения дисциплины.**

**Нуклеотидные и аминокислотные последовательности.**

**Генетический код.**

*Цель занятия:* Ознакомление обучающихся со значением и областью применения дисциплины. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности. Генетический код.

У всех живых систем, включая доклеточные и клеточные формы жизни, наследственная, или генетическая, информация содержиится в геноме, представленном молекулами нуклеиновых кислот.

У подавляющего большинства форм жизни генетическая информация передается от поколения к поколению в виде молекул дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК). Ряд вирусов является исключением из этого правила и передает генетическую информацию в виде рибонуклеиновых кислот (РНК) —РНК-содержащие вирусы.

# Контрольные вопросы:

1. Цели, задачи и область применения дисциплины.
2. Нуклеотидные последовательности.
3. Аминокислотные последовательности.
4. Генетический код.

**Семинарское занятие 2**

**Структура и функции генов и белков.**

*Цель занятия:* Ознакомление обучающихся с единицами наследственнности, со структурой и функцией генов и белков.

Ген (др.-греч. γένος — род) — в классической генетике — наследственный фактор, который несёт информацию об определённом признаке или функции организма, и который является структурной и функциональной единицей наследственности. В таком качестве термин «ген» был введён в 1909 году датским ботаником, физиологом растений и генетиком Вильгельмом Йоханнсеном.

После открытия нуклеиновых кислот в качестве носителя наследственной информации определение гена изменилось, и ген стали определять как участок ДНК (у некоторых вирусов — участок РНК), задающий последовательность полипептида либо функциональной РНК.

По мере накопления сведений о строении и работе генов определение понятия «ген» продолжало изменяться, однако в настоящее время не существует универсального определения гена, которое удовлетворило бы всех исследователей. Одно из современных определений гена звучит следующим образом: ген представляет собой последовательность ДНК, составляющие сегменты которой не обязательно должны быть физически смежными. Эта последовательность ДНК содержит информацию об одном или нескольких продуктах в виде белка или РНК. Продукты гена функционируют в составе генетических регуляторных сетей, результат работы которых реализуется на уровне фенотипа.

Совокупность генов организма составляют генотип. Генотип наряду с факторами окружающей среды и развитием определяют, каким будет фенотип. Передача генов потомству является основой наследования фенотипических признаков. Большинство биологических признаков являются полигенными, то есть находятся под влиянием многих генов. Гены могут изменяться в результате мутаций, изменяющих последовательность ДНК. Вследствие мутаций в популяции гены существуют в различных вариантах, называемых аллелями. Разные аллели гена могут кодировать различающиеся версии белка, что может проявляться фенотипически. Гены наряду с участками ДНК, не содержащими генов, входят в состав генома, представляющего собой весь наследственный материал организма.

# Контрольные вопросы:

1. Что такое гены?
2. Геном.
3. Роль наследственности.
4. Структура и функции генов и белков.

**Семинарское занятие 3**

**Синонимичные и несинонимичные замены.**

*Цель занятия –* ознакомление обучающихся с синонимичными и несинонимичными заменами.

ДНК-полимераза — фермент, участвующий в репликации ДНК. Ферменты этого класса катализируют полимеризацию дезоксирибонуклеотидов вдоль цепочки нуклеотидов ДНК, которую фермент «читает» и использует в качестве шаблона. Тип нового нуклеотида определяется по принципу комплементарности с шаблоном, с которого ведётся считывание. Собираемая молекула комплементарна шаблонной моноспирали и идентична второму компоненту двойной спирали.[1]

Выделяют ДНК-зависимую ДНК-полимеразу (КФ 2.7.7.7), использующую в качестве матрицы одну из цепей ДНК, и РНК-зависимую ДНК-полимеразу (другое название обратная транскриптаза, КФ 2.7.7.49), способную также к считыванию информации с РНК (обратная транскрипция)[2].

ДНК-полимеразу считают холоферментом, поскольку для нормального функционирования она требует присутствия ионов магния в качестве кофактора. В отсутствие ионов магния о ней можно говорить как об апоферментe.

ДНК-полимераза начинает репликацию ДНК, связываясь с отрезком цепи нуклеотидов. Среднее количество нуклеотидов, присоединяемое ферментом ДНК-полимеразой за один акт связывания/диссоциации с матрицей, называют процессивностью.

РНК-полимераза — фермент, осуществляющий синтез молекул РНК. В узком смысле, РНК-полимеразой обычно называют ДНК-зависимые РНК-полимеразы, осуществляющие синтез молекул РНК на матрице ДНК, то есть осуществляющие транскрипцию. Ферменты класса РНК-полимераз очень важны для функционирования клетки, поэтому они имеются во всех организмах и во многих вирусах. Химически РНК-полимеразы являются нуклеотидил-трансферазами, полимеризующими рибонуклеотиды на 3'-конце цепи РНК.

# Контрольные вопросы:

1. ДНК-полимераза.

2.Транскрипция.

3. Синонимичные и несинонимичные замены.

**Семинарское занятие 4**

**Организация геномов различных групп организмов.**

**Содержание геномов, принципы геномики и протеомики.**

*Цель занятия –* ознакомление обучающихся со плазмидами и векторами, используемыми в генной инженерии.

Плазми́ды (англ. plasmids) — небольшие молекулы ДНК, физически обособленные от хромосом и способные к автономной репликации. Главным образом плазмиды встречаются у бактерий, а также у некоторых архей и эукариот (грибов и высших растений). Чаще всего плазмиды представляют собой двухцепочечные кольцевые молекулы. Несмотря на способность к размножению, плазмиды, как и вирусы, не рассматриваются в качестве живых организмов[1].

Размеры плазмид варьируют от менее чем 1 тысячи до 400—600 тысяч пар оснований (п. о.)[2]. Некоторые плазмиды содержатся в клетке в количестве одной-двух копий, другие — в количестве нескольких десятков. Плазмиды разных классов могут сосуществовать в клетке.

В природе плазмиды обычно содержат гены, повышающие приспособленность бактерий к окружающей среде (например, обеспечивают устойчивость к антибиотикам). Нередко они могут передаваться от одной бактерии к другой того же вида, рода, семейства и даже между клетками бактерий и растений, являясь таким образом средством горизонтального переноса генов. Перенос плазмиды в клетку может осуществляться двумя путями: либо при непосредственном контакте клетки-хозяина с другой клеткой в процессе конъюгации, либо путём трансформации, то есть захвата экзогенной ДНК из внешней среды.

Искусственные плазмиды используются как векторы в клонировании ДНК, причём благодаря их способности к репликации обеспечивается возможность репликации рекомбинантной ДНК[en] в клетке-хозяине.

Вектор (в генетике и молекулярной биологии) — молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала внутрь клетки, в том числе в клетку живого многоклеточного организма in vivo[1].

Существующие векторы:

-плазмиды

-фазмиды

-векторы на основе вируса SV40

-векторы на основе аденовирусов

-векторы на основе герпесвирусов

-векторы на основе ретровирусов

-векторы на основе аденоассоциированного вируса

# Контрольные вопросы:

1. Плазмиды.
2. Векторы.
3. Организация геномов различных групп организмов.
4. Содержание геномов, принципы геномики и протеомики.

**Семинарское занятие 5**

**Проект «Геном человека».**

*Цель занятия –* ознакомление обучающихся с результатами Проекта «Геном человека».

Клонирование ДНК (клонирование генов) — процесс выделения заданной последовательности ДНК и получения многих её копий *in vitro*. Клонирование ДНК часто применяют для амплификации фрагментов, содержащих гены, а также любые другие последовательности — например, промоторы, некодирующие последовательности, химически синтезированные олигонуклеотиды и случайные участки ДНК.

*Рестрикция — лигирование*

В классических методиках рестрикции и лигирования, клонирование фрагмента ДНК включает четыре стадии: разрезание ДНК эндонуклеазами рестрикции, лигирование ДНК с вектором, трансфекция и последующий скрининг (отбор).

*Выделение вставки*

Первоначально необходимо выделить участок ДНК для клонирования. Часто препарат ДНК для клонирования получают при помощи полимеразной цепной реакции, а также разрезания ДНК рестриктазами, обработкой ДНК ультразвуком, фракционированием при помощи агарозного электрофореза ДНК. Выделение вставки может быть сделано технологией клонирования шотган, комплементарной ДНК, искусственным химическим синтезом.

*Трансформация*

После лигирования плазмидой трансформируют бактерии для наращивания. Бактерии далее выращивают на селективной среде для отбора колоний, содержащих встройку. Индивидуальные колонии отбирают и изучают на наличие встройки.

*Трансфекция*

После лигирования реакционную смесь со встроенным в требуемой ориентации вектором помещают в клетки. В зависимости от типа клеток используют химическую сенситизацию клеток, электропорацию или генные пушки. Для химической сенситизации не требуется специальное оборудование. Электропорацию используют в случае необходимости высокой эффективности трансфекции. Генные пушки применяют в случае растительных клеток и тканей, так как клеточная стенка растений не дает чужеродной ДНК проникать в цитоплазму и ядро.

*Отбор*

Получают культуры трансфицированных клеток. Так как описанные выше процедуры часто имеют низкую эффективность, требуются способы выявления клеток, содержащих требуемую вставку в правильной ориентации и отделение таких клеток от не содержащих вставки. Современные векторы для клонирования содержат селективные маркеры (как правило, гены устойчивости к антибиотикам) которые дают возможность расти только клеткам с правильной вставкой расти на селективной среде (с антибиотиком). Векторы для клонирования также часто содержат маркеры, обуславливающие окраску колоний, например при выращивании на среде, содержащей X-gal. Для точного подтверждения успешного клонирования, требуется проверка при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) или секвенирования ДНК.

*Генная терапия*

Генная терапия подразумевает введение работающего гена в клетки, в которых он отсутствует, что приводит к излечению болезни, связанной с отсутствием или неправильным функционированием гена. Генную терапию классифицируют на две категории. В первом случае мутации содержатся в стволовых или половых клетках, тогда весь организм и все потомки имеют дефект. Во втором случае мутация возникает в соматических клетках, возможна пересадка модифицированных клеток или тканей. Клинические испытания генной терапии соматическими клетками начались в конце 1990-х, для лечения рака крови, печени и легких.

**Контрольные вопросы:**

1. Методы клонирования генов.
2. Рестрикция — лигирование
3. Выделение вставки, выделить участок ДНК для клонирования..
4. Трансформация.
5. Проект «Геном человека».

**Семинарское занятие 6**

**Методы филогенетического анализа.**

*Цель занятия –* ознакомление обучающихся с методами филогенетического анализа.

Генная инженерия — это современное направление биотехнологии, объединяющее знания, приемы и методики из целого блока смежных наук — генетики, биологии, химии, вирусологии и так далее — чтобы получить новые наследственные свойства организмов.

*Технологии генной инженерии.*

Генная инженерия за короткий срок оказала огромное влияние на развитие различных молекулярно-генетических методов и позволила существенно продвинуться на пути познания генетического аппарата.

Генная инженерия, также называемая генетической модификацией или генетической манипуляцией, это прямая манипуляция генами организма с помощью биотехнологии. Это набор технологий, используемых для изменения генетического материала клеток, включая перенос генов внутри и за пределы видов для создания улучшенных или новых организмов. Использование методов генной инженерии значительно расширило возможности модификации геномов и в растительном царстве, поскольку сделало возможным перенос генов между таксономически удаленными видами растений, принадлежащими, например, к классам однодольных и двудольных растений. Новую ДНК получают либо путем выделения и копирования интересующего генетического материала с использованием методов рекомбинантной ДНК, либо путем искусственного синтеза ДНК.

Обычно создается конструкция, которая используется для вставки этой ДНК в организм-хозяин.

Для этого используются следующие методы:

- выделение гена, кодирующего интересующий белок;

- клонирование (то есть перенос) этого гена в соответствующий продуцирующий хозяин;

- улучшение экспрессии генов и белков за счет использования более сильных промоторов, улучшения условий ферментации и т. д. (Gellisen, 2005).

Вместе эти методы известны как технология рекомбинантной ДНК.

***Контрольные вопросы:***

1. Методы генной инженерии.
2. Аспекты использования трансгенных растений
3. Методы филогенетического анализа

**Семинарское занятие 7**

**Концепция молекулярных часов.**

*Цель занятия –* ознакомление обучающихся с Концепцией молекулярных часов.

Образование растительных опухолей, например корончатых галлов, индуцируется бактериями Agrobacterium tumefacienc в результате внедрения в клетку Ту-плазмиды — кольцевой ДНК с молекулярной массой порядка 1000 kDa. В плазмиде Т, идентифицирован сайттДНК, конкретно ответственный за трансформацию растительной клетки. тДНК внедряется в се хромосому и изменяет многие стороны клеточного метаболизма. Раковые клетки приобретают способность к неконтролируемому росту даже на минимальной питательной среде, лишенной фитогормонов, которые они, в отличие от интактных клеток, синтезируют в достаточном количестве. Другим примером генетической трансформации в природных условиях является заболевание растений, связанное с разрастанием корней. Причиной этого является внедрение в растительную клетку R-плазмиды из бактерий Agrobacterium rhizogenes. В этой плазмиде также имеется фрагмент ДНК, способный встраиваться в хромосому растительной клетки, подобно транспозону. Приведенные примеры инициировали многих ученых формировать сообщества всевозможных микробных и растительных клеток с целью получения новых полезных свойств у последних. Спонтанное воздействие на геном растительных клеток не увенчалось серьезными успехами (за исключением некоторых вариантов ассоциации растений с цианобактериями). Гораздо перспективнее представляется генно-инженерная трансформация клеток растений. Для этого необходимо получить жизнеспособный протопласт, из которою затем возможно было бы образование сначала трансформированной клетки, а затем и растения-регенеранта.

Для решения этой задачи следует:

- выбрать растение, протопласты клеток которого способны к регенерации. В настоящее время таких растений не так много, однако их количество из года в год увеличивается;

- сконструировать вектор для внесения чужеродного генетического материала в растительную клетку. Эта задача облегчается наличием природных Т,- и Rj-плазмид, которые спонтанно внедряются в растительную клетку. Кроме того, можно использовать растительные вирусы, а также химерные структуры, состоящие из бактериальных плазмид, соединенных с ДНК митохондрий или хлоропластов растения;

- защитить вектор от разрушающего действия эндонуклеаз растительной клетки.

Введение вектора в растительную клетку возможно при помощи липосом, причем для введения в протопласт растения наиболее эффективны липосомы, состоящие из фосфотидилсерина и холестерина.

***Контрольные вопросы:***

1. Трансформация растительных клеток.
2. Трансформация растительных протопластов.
3. Метод трансформации растительных клеток при помощи микроорганизмов рода Agrobacterium.

**Семинарское занятие 8**

**Теория направленного мутационного давления (N. Sueoka).**

*Цель занятия –* ознакомление обучающихся с теорией направленного мутационного давления (N. Sueoka).

Генетическая трансформация растений с помощью методов генетической инженерии может быть осуществлена векторным способом (с использованием агробактерий и вирусов) и путем прямого переноса генов.

Наиболее изученным примером работы плазмидных векторов служит введение чужеродных генов в геном растений с помощью Ti- и Ri-плазмид почвенных бактерий рода Agrobacterium. С помощью этих плазмид бактерии могут интегрировать свой генетический материал в клетки двудольных растений.

Ti-плазмида (от англ, tumor inducing — индуцирующая опухоль) обнаружена в клетках некоторых штаммов Agrobacterium tumefaciens. Выделенная в чистой культуре, эта бактерия может приводить к образованию опухолей у двудольных растений, что, по существу, может рассматриваться как природная генно-инженерная система, индуцирующая корни) присутствует в штаммах Agrobacterium rhizogenes.

Строение Ti-плазмид хорошо изучено. Они включают в себя:

— Т-ДНК — область ДНК, где содержатся гены, ответственные в итоге за морфологию опухоли и синтез фитогормонов, вызывающих неконтролируемый рост опухолевых клеток, а также гены, ответственные за синтез опинов — источников углерода и азота для питания бактерий. Именно все эти гены передаются в ядерный геном растительной клетки;

— у/г-область — содержит гены, ответственные за вырезание, перенос и интеграцию Т-ДНК в хромосомы растений. Индукция этих генов обратима, что очень важно для бактериальных клеток. Если зараженное растение уже больно и является нежизнеспособным организмом, то переноса Т-ДНК не происходит;

— ori-область — содержит гены, продукты которых обеспечивают репликацию Ti-плазмиды;

— fra-область — содержит гены, ответственные за конъюгацию бактерий.

Ti-плазмида оказалась идеальным природным вектором для введения чужеродных генов в клетки растения. Проще всего было бы заменить Т-ДНК на чужеродные (полезные) гены, ввести их в плазмиды агробактерий и заразить ими растения, так как гены, ответственные за индукцию опухоли, синтез опинов и подавление дифференциации клеток поражаемого растения, расположены близко друг от друга в Т-ДНК. В то же время гены, ответственные за перенос и интеграцию Т-ДНК в хромосомы растений, находятся в другой области Ti-плазмиды — в uir-области.

*Способы прямого введения генов в клетку*

Прямое введение гена в клетку осуществляют несколькими способами:

Трансфекция

Микроинъекция

Электропорация

Метод «мини-клеток»

Упаковка в липосомы

Электронная пушка.

***Контрольные вопросы:***

1. Трансформация растительного генома
2. Теория направленного мутационного давления (N. Sueoka).

**Семинарское занятие 9**

**Эволюционная систематика.**

*Цель занятия –* ознакомление обучающихся с эволюционной систематикой.

Метод биологической баллистики (биолистики) заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, диаметром 0,6—1,2 мкм, напыляется ДНК вектора, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию. Вольфрамовые частички, несущие ДНК, наносятся на целлофановую подложку и помещаются внутрь биолистической пушки. Каллус или суспензия клеток наносится в чашку Петри с агаризированной средой и помещается под биолистическую пушку на расстоянии 10—15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые частички с огромной скоростью выбрасываются из биолистической пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток.

Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления вольфрамовых частиц, в то время как в зоне 0,6—1 см от центра находятся наиболее удачно протрансформированные клетки. Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации. http://www.biotechnolog.ru/ge/ge9\_4.htm

***Контрольные вопросы:***

1. Метод биолистической трансформации растений.
2. Суть метода биологической баллистики.

**Семинарское занятие 10**

**Гомологичные и сходные признаки, конвергенция.**

*Цель занятия –* ознакомление обучающихся с гомологичными и сходными признаками и конвергенцией.

Клони́рование (англ. cloning от др.-греч. κλών — «веточка», «побег», «отпрыск») — в самом общем значении — точное воспроизведение какого-либо объекта любое требуемое количество раз. Объекты, полученные в результате клонирования (каждый по отдельности и вся их совокупность), называются клоном.

*Клонирование млекопитающих*

Клонирование млекопитающих возможно с помощью экспериментальных манипуляций с яйцеклетками (ооцитами) и ядрами соматических клеток животных in vitro и in vivo. Клонирование взрослых животных достигается в результате переноса ядра из дифференцированной клетки в неоплодотворённую яйцеклетку, у которой удалено собственное ядро (энуклеированная яйцеклетка) с последующей пересадкой реконструированной яйцеклетки в яйцевод приёмной матери. Однако долгое время все попытки применить описанный выше метод для клонирования млекопитающих были безуспешными. Одними из первых успешное клонирование млекопитающего (домовой мыши) осуществили советские исследователи[5] в 1987 г. Они использовали метод электропорации для слияния энуклеированной зиготы и клетки эмбриона мыши с ядром.

Значительный вклад в решение этой проблемы был сделан шотландской группой исследователей из Рослинского института и компании «PPL Therapeuticus» (Шотландия) под руководством Яна Вильмута (Wilmut). В 1996 году появились их публикации по успешному рождению ягнят в результате трансплантации ядер, полученных из фибробластов плода овцы, в энуклеированные ооциты.[6] В окончательном виде проблема клонирования животных была решена группой Вильмута в 1996 г., когда родилась овца по кличке Долли — первое млекопитающее, полученное из ядра взрослой соматической клетки: собственное ядро ооцита было заменено на ядро клетки из культуры эпителиальных клеток молочной железы взрослой лактирующей овцы[7]. В дальнейшем были проведены успешные эксперименты по клонированию различных млекопитающих с использованием ядер, взятых из взрослых соматических клеток животных (мышь, коза, свинья, корова), а также взятых у мёртвых, замороженных[8] на несколько лет, животных. Появление технологии клонирования животных вызвало не только большой научный интерес, но и привлекло внимание крупного бизнеса во многих странах. Подобные работы ведутся и в России, но целенаправленной программы исследований не существует. В целом технология клонирования животных ещё находится в стадии развития. У большого числа полученных таким образом организмов наблюдаются различные патологии, приводящие к внутриутробной гибели или гибели сразу после рождения, хотя при клонировании овец в 2007 году выжил каждый 5-й эмбрион (в случае с Долли — понадобилось 277).

***Контрольные вопросы:***

1. Клонирование.
2. Клонирование амфибий.
3. Клонирование млекопитающих
4. Гомологичные и сходные признаки, конвергенция.

**Семинарское занятие 11**

**Метод построения филогенетического древа UPGMA.**

*Цель занятия –* ознакомление обучающихся с методом построения филогенетического древа UPGMA.

*Способы проверки на наличие ГМО*

Как правило, проверка на наличие ГМО проводится при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Такой тест предусматривает три основных действия:

*Пробоподготовка,* состоящая в выделении ДНК из тестируемого пищевого продукта;

Постановка ПЦР с выделенной ДНК и с парой праймеров, которые комплементарны участку встроенного гена. Иногда один из праймеров может быть комплементарен пограничному участку между хромосомной ДНК «хозяина» и встроенной ДНК. В ходе ПЦР многократно амплифицируется участок ДНК, специфичный для встроенного гена или для события-вставки.

*Выявление амплифицированного ПЦР-продукта* при помощи разных устройств. Если продукт обнаруживается, это является свидетельством, что в пробе выявлена ДНК генно-модифицированного организма.

*Количественное определение на наличие ГМО*: точное количество ГМО в продукте определить невозможно. Долгое время определялось только наличие ГМО в продукте: содержит продукт ГМО или нет. Относительно недавно были разработаны способы количественного определения — ПЦР в режиме реального времени, когда амплифицированный продукт помечается флуоресцентным красителем и интенсивность излучения сравнивается с откалиброванными стандартами. Однако, даже самые лучшие устройства все ещё имеют значительную погрешность.

В каждой стране путь к коммерциализации ГМО разный. Допуск к продаже и культивированию предусматривает разные процедуры, однако они основаны на одинаковых принципах.

*Безопасность:* продукт должен быть безопасным и не представлять угрозы здоровью людей или животных. Также он должен быть безопасным для окружающей среды. Безопасность определяется согласно разработанным испытаниям, которые основываются на новейших научных знаниях и применяются с использованием современных технологических средств. Если продукт не подходит под вышеозначенные требования — он не получает разрешения на культивирование или распространение. Если с течением времени в продукте выявляются опасные свойства, он исключается с рынка.

***Контрольные вопросы:***

1. Генетически модифицированная пища.
2. Метод построения филогенетического древа UPGMA.

**Семинарское занятие 12**

**Генетический анализ по митохондриальной ДНК: особенности, преимущества.**

*Цель занятия –* ознакомление обучающихся с генетическим анализом по митохондриальной ДНК: особенности, преимущества.

Повышение качества и продолжительности жизни человека — ключевые приоритеты развитых экономик мира. Для более эффективной профилактики, диагностики и лечения социально значимых заболеваний, а также реабилитации пациентов необходимы технологические прорывы в области биомедицины. Они прежде всего связаны с созданием принципиально новых лекарств, продуктов для клеточной и генной терапии, инструментов высокоспецифичной молекулярной диагностики. Технологии генетической инженерии — конструирование функционально активных генетических структур, введение их в организм человека, интеграция в геном — позволяют выработать новые, в некоторых случаях уникальные генетические, биохимические и физиологические свойства. Создание новых биофармпрепаратов, культур клеток-продуцентов биологически активных молекул в перспективе обеспечит отечественный рынок доступными инновационными лекарствами и средствами диагностики.

*Генно-инженерное конструирование лекарств.*

Для эффективного лечения многих болезней, в первую очередь иммунной природы, требуются точечные воздействия, иногда на уровне отдельных клеток. Создание мишень-ориентированных препаратов, в том числе конъюгированных и ДНК-вакцин, повысит эффективность лечения онкологических, ревматических, инфекционных заболеваний, а также болезней нервной системы.

Первое направление развития тренда связано с применением рекомбинантной ДНК для получения биологических продуктов с заданными терапевтическими свойствами и высокими показателями биодоступности и специфичности действия. В результате появятся новые лекарства, эффективные при заболеваниях, вызванных нарушениями иммунной системы.

Создание диагностических биосенсоров — другое направление использования терапевтических клеточных продуктов и специфических молекулярных фрагментов, получаемых на основе технологий генетической инженерии. Эти решения могут повысить диагностическую ценность портативных тестов, выводимых на рынок медицинских изделий для «домашней медицины».

*Перепрограммирование клеток человека*

Технологии направленного перепрограммирования стволовых и модификации дифференцированных клеток дают возможность исследовать их свойства, получать клетки с новыми функциональными характеристиками. На этой основе разрабатываются технологии регенеративной медицины, нацеленные на восстановление травмированных или пораженных болезнью тканей и утраченных физиологических функций.

***Контрольные вопросы:***

1. Генно-инженерное конструирование лекарств.
2. Перепрограммирование клеток человека
3. Технологии терапевтического применения РНК-интерференции
4. Генетический анализ по митохондриальной ДНК: особенности, преимущества.

**Семинарское занятие 13**

**Этапы построения филогенетического дерева.**

*Цель занятия –* ознакомление обучающихся с этапами построения филогенетического дерева.

*Проект Человеческий Геном* (англ. The Human Genome Project, HGP) — международный научно-исследовательский проект, начался в 1990 году, под руководством Джеймса Уотсона под эгидой Национальной организации здравоохранения США. В 2000 году был выпущен рабочий черновик структуры генома, полный геном — в 2003 году, однако и сегодня дополнительный анализ некоторых участков ещё не закончен. Частной компанией Celera Corporation был запущен аналогичный параллельный проект, завершённый несколько ранее международного. Основной объём секвенирования был выполнен в университетах и исследовательских центрах США, Канады и Великобритании. Кроме очевидной фундаментальной значимости, определение структуры человеческих генов является важным шагом для разработки новых медикаментов и развития других аспектов здравоохранения.

*Целями проекта* являлись:

-идентификация 20 000–25 000 генов ДНК;

-определение последовательности 3 млрд. пар химических оснований, составляющих ДНК человека, и сохранение этой информации в базе данных;

-усовершенствование приборов для анализа данных;

-внедрение новейших технологий в область частного использования;

-исследование этических, правовых и социальных вопросов, возникающих при расшифровке генома.

В 1998 г. аналогичный проект был запущен д-ром Крейгом Вентером и его фирмой «Celera Genomics». Д-р Вентер поставил перед своей командой задачу более быстрого и дешевого секвенирования человеческого генома (в отличие от трехмиллиардного международного проекта, бюджет проекта д-ра Вентера ограничивался 300 млн долл.). Кроме того, фирма «Celera Genomics» не собиралась открывать доступ к своим результатам.

6 июня 2000 г. президент США и премьер-министр Великобритании объявили о расшифровке человеческого генетического кода, и таким образом соревнование закончилось. На самом деле, был опубликован рабочий черновик человеческого генома, и лишь к 2003 г. он был расшифрован практически полностью, хотя и сегодня все еще проводят дополнительный анализ некоторых участков генома.

В результате исполнения проекта «Геном человека» был создан открытый банк генокода. Общедоступность полученной информации позволила многим исследователям ускорить свою работу. Ф. Коллинз привел в качестве иллюстрации такой пример: «Поиск гена фиброзно-кистозной дегенерации был успешно завершен в 1989 г., что стало результатом нескольких лет исследований моей лаборатории и еще нескольких других и стоило США около 50 млн долл. Сейчас это способен сделать смышленый выпускник университета за несколько дней, и все, что ему понадобится, — это Интернет, несколько недорогих реактивов, термоциклический аппарат для увеличения специфичности сегментов ДНК и доступ к ДНК-секвенатору, читающему ее по световым сигналам».

***Контрольные вопросы:***

1. Проект «Геном человека».
2. Цели проекта «Геном человека».
3. Результаты проекта «Геном человека».
4. Перспективы Проекта «Геном человека».
5. Этапы построения филогенетического дерева.

**Семинарское занятие 14**

**Биологичсские базы данных**

**по молекулярно-генетическому материалу.**

*Цель занятия –* ознакомление обучающихся с биологическими базами данных по молекулярно-генетическому материалу.

*Полимера́зная цепна́я реа́кция (ПЦР)* — метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в биологическом материале (пробе).

*Проведение ПЦР*

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (in vitro). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований (3 kbp[10]). С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20—40 тысяч пар нуклеотидов. Это всё равно значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки. Например, геном человека состоит примерно из 3 млрд пар оснований[11].

*Компоненты реакции*

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.

Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.

Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — Thermus aquaticus (Taq-полимераза), Pyrococcus furiosus[en] (Pfu-полимераза), Pyrococcus woesei (Pwo-полимераза), Thermus thermophilus (Tth-полимераза) и другие.

Дезоксирибо[fr]нуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

Ионы Mg2+, необходимые для работы полимеразы.

Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — рН, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

*Ход реакции*

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трёх стадий.[≡]

*Денатурация*

Двуцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96 °C (или до 98 °C, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5—2 минуты, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется плавлением (денатурацией[fr]), так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Обычно перед первым циклом проводят длительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 минут для полной денатурации матрицы и праймеров.

***Контрольные вопросы:***

1. Полимера́зная цепна́я реа́кция (ПЦР)
2. История открытия ПЦР метода.
3. Биологичсские базы данных по молекулярно-генетическому материалу.

**Семинарское занятие 15**

**Типы филогенетических деревьев.**

*Цель занятия –* ознакомление обучающихся с типами филогенетических деревьев.

Электрофорез (от электро- и др.-греч. φορέω — «переношу») —метод разделения макромолекул, различающихся по размеру, молекулярной массе, пространственной конфигурацией, вторичной структурой или электрическому заряду. Впервые было открыто профессорами Московского университета П. И. Страховым и Ф. Ф. Рейссом в 1809 году.

Принцип метода. Молекулы в буферном растворе обладают электрическим зарядом, величина и знак которого зависят от pH среды. При пропускании электрического тока через раствор в нем формируется направленное электрическое поле, напряженность которого измеряется разностью потенциалов по концам емкости, в которой производится электрофорез. Под действием поля молекулы начинают движение в направлении катода или анода. Скорость движения зависит от величины заряда, размеров и трения окружающей среды. С течением времени смесь разделяется на фракции, состоящие из молекул, движущихся с одинаковой скоростью. В современных экспериментах рабочий канал приборов для электрофореза заполняют гелем, имеющим структуру сетки. В этом случае основное влияние на подвижность молекул и их степень разделения оказывают их линейные размеры. В некоторых случаях может возникнуть ситуация, при которой особо крупные молекулы не проходят через поры геля.

Методика электрофореза в агарозном геле. Агароза. Электрофорез в агарозном геле в различных модификациях широко применяется для разделения молекул нуклеиновых кислот, белков и других макромолекул в биологии и медицине. На водяной бане или в лабораторной печи плавят смесь агарозы, буфера и воды. Затем ее охлаждают до 50-60 °C и заливают в форму. Лунки для нанесения делаются при помощи гребенки. Исследуемый образец наносят в лунку при помощи дозатора. Когда краситель, помещаемый в лунки в начале эксперимента, достигает конца геля, электрофорез останавливают. Затем гель окрашивают красителем, который связывается с исследуемыми молекулами.

***Контрольные вопросы:***

1. Электрофорез.
2. Принцип метода.
3. Типы филогенетических деревьев.