

Программа спецкурса «Биоинженерия»

(Лекции – электив, 8 лекций, 18 часов)

Доктор биологических наук, чл.-корр. РАН Лукьянов Сергей Анатольевич –

руководитель лаборатории флуоресцентного биоимиджинга
ГБОУ ВПО НижГМА Минздравсоцразвития России,

руководитель [лаборатории молекулярных технологий, инновационного центра «технопарк ИБХ»](#), [центра коллективного пользования Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН](#)

- 1. Современная концепция гена.** Структурные элементы гена. Модули, контролирующие транскрипцию, в эукариотических генах, кодирующих белки. Понятие о коровом промоторе, энхансерах, сайленсерах, инсуляторах и проксимальной промоторной области. Центральная догма молекулярной биологии. Пост-транскрипционная модификация РНК. Альтернативный сплайсинг. Эндонуклеазы рестрикции. Эндонуклеазы рестрикции II типа, их номенклатура и субстратная специфичность. Формы разрывов ДНК, образующихся под действием рестриктаз II типа. Понятие о векторе. Основные компоненты вектора. Использование бактериальных плазмид в качестве векторов. Полилинкер. Бело-голубая селекция. Введение чужеродной ДНК в клетку: химическая трансформация и электропорация. ДНК лигазы. Лигирование фрагментов ДНК. Продукты лигирования вектора и вставки. Использование щелочной фосфатазы и полинуклеотидкиназы при лигировании. Создание сайтов рестрикции на концах молекул ДНК с помощью линкеров, адапторов и ПЦР – 2 часа.
- 2. Сложность генома.** Размеры геномов. Определение термина «Геном», «Генотип» и «Фенотип». Корреляция между размером эукариотического генома и биологической сложностью видов. Повторяющиеся элементы в геноме. Подходы к изучению генов, белков и геномов. Отбор клонов из библиотек ДНК. Использование изотопов для мечения нуклеотидов. Приготовление гибридных зондов (ник-трансляция, амплификация со случайного праймера, достраивание концов с помощью фрагмента Кленова). Векторы на основе хромосомы фага λ. Космиды и их емкость. Использование космид и векторов на основе хромосомы фага λ. Искусственные хромосомы ВАС и УАС. Их емкость и применение. Приготовление библиотеки геномной ДНК. Виды геномных библиотек. Репрезентативность библиотеки ДНК. Упорядоченные библиотеки ДНК. Секвенирование ДНК по методу Сэнгера. Дидезоксинуклеотиды. Ферменты, используемые для секвенирования по методу Сэнгера. Стратегия секвенирования больших геномов методом shotgun – 2 часа.
- 3. Полимеразная цепная реакция.** Основные компоненты ПЦР. Типичная программа ПЦР. Температура отжига праймеров. Влияние различных компонентов на эффективность ПЦР. Контроли, используемые при постановке ПЦР. Основные проблемы, возникающие при постановке ПЦР. Термостабильные ДНК полимеразы. Специфичность ПЦР: ПЦР с «горячим стартом», Nested PCR, Step-out PCR. Амплификация длинных фрагментов ДНК с использованием смесей термостабильных полимераз – 2 часа.
- 4. Стратегия поиска генов** в случаях, когда известна частичная последовательность белка или известен ряд гомологов из других организмов. ПЦР с вырожденным

- праймером. Амплификация фрагментов ДНК фланкирующих участков с известной последовательностью. Inverse PCR. Vectorsite PCR. Селективная супрессия ПЦР (ССП). Параметры, влияющие на ССП-эффект. Введение инвертированных концевых повторов в структуру ДНК с помощью лигирования. Регуляция средней длины сложных продуктов ПЦР с помощью ССП. Схема метода амплификации концевых фрагментов ДНК с использованием селективной супрессии ПЦР – 2 часа.
5. **Обратные транскриптазы.** Синтез кДНК обратной транскриптазой. Обратная транскрипция-ПЦР. Схема приготовления двухцепочечной кДНК. Обогащение полноразмерными последовательностями кДНК. Приготовление кДНК по технологии SMART. Амплификация образцов кДНК. Регуляция длины амплифицированной кДНК. Источники фоновой амплификации при приготовлении кДНК по технологии SMART. Репрезентативность образцов кДНК. Амплификация фрагментов кДНК фланкирующих участков с известной последовательностью (RACE). RACE по технологии SMART. Step-Out PCR. Регуляция длины продукта RACE – 2 часа.
 6. **Использование чипов и микрочипов для анализа профилей экспрессии генов.** Типы твердых носителей. Способы прикрепления ДНК на твердый носитель. Достоинства и недостатки технологий анализа дифференциальной экспрессии генов с помощью чипов и микрочипов. «Tissue arrays». Достоинства и недостатки метода. Серийный анализ генной экспрессии (SAGE). Стратегия вычитающей гибридизации. Супрессионная вычитающая гибридизация кДНК – 2 часа
 7. **Пиросеквенсинг.** Современные платформы секвенирования. Технология секвенирования 454. Технология секвенирования Solexa. Технология секвенирования SoLid. Проблемы секвенирования полных геномов. Методы отбора последовательностей экзонов (Methylation filtration и «High Cot » анализ).
 8. **Плавление и гибридизация ДНК.** Факторы, влияющие на температуру плавления и скорость гибридизации ДНК. Кинетика гибридизации нуклеиновых кислот в растворе. Проблемы секвенирования транскриптомов. Стратегия нормализации кДНК, основанной на кинетике гибридизации нуклеиновых кислот. Нормализация кДНК с помощью дуплекс-специфической нуклеазы.