

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
для обучающихся по организации и проведению лабораторных работ
по дисциплине «Генетическая инженерия»
для студентов Направления подготовки 06.04.01 Биология

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1
Выделение нуклеиновых кислот
Выделение геномной ДНК прокариот
Выделение РНК прокариот и вирусов
Выделение плазмид из бактериальных клеток

Цель работы:

- Освоить основные методы выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов
- Изучить особенности работы с разными типами нуклеиновых кислот
- Оценить качество и количество полученных препаратов

I. Теоретическая часть

1.1. Основные принципы выделения нуклеиновых кислот

Ключевые этапы:

1. **Лизис клеток** (механический, химический или ферментативный)
2. **Денатурация белков** (детергентами или протеазами)
3. **Сепарация нуклеиновых кислот** (экстракция, осаждение, сорбция)
4. **Очистка** (от белков, полисахаридов, солей)
5. **Концентрация и растворение**

Различия в выделении разных типов нуклеиновых кислот:

Характеристика	Геномная ДНК	РНК	Плазмиды
Основная угроза	ДНКазы	РНКазы	ДНКазы
Метод лизиса	Жесткий (SDS)	Щадящий (TRIzol)	Щелочной
Очистка	Фенол-хлороформ	Сорбционные колонки	Осаждение

II. Практическая часть

2.1. Выделение геномной ДНК прокариот

Оборудование и реактивы:

- Культура *E. coli*
- Буфер для лизиса (Tris-HCl, EDTA, SDS)
- Протеиназа К
- Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1)
- 96% и 70% этанол

Протокол:

1. **Лизис клеток:**
 - 1 мл культуры центрифугировать (5 000 g, 5 мин)
 - Ресуспендировать в 500 мкл буфера для лизиса
 - Добавить 10 мкл протеиназы К, инкубировать 1 ч при 56°C
2. **Очистка ДНК:**
 - Добавить 500 мкл фенол-хлороформа, центрифугировать (12 000 g, 10 мин)
 - Водную фазу перенести в чистую пробирку
 - Осадить ДНК 2 объемами 96% этанола
3. **Концентрация:**
 - Осадок промыть 70% этанолом
 - Растворить в 50 мкл ТЕ-буфера

Контроль качества:

- Измерение A260/A280 (оптимально 1.8-2.0)
- Электрофорез в 0.8% агарозном геле

2.2. Выделение РНК прокариот и вирусов

Особенности:

- Работа в RNase-free условиях (обработка поверхностей DEPC-водой)
- Использование ингибиторов РНКаз

Протокол (метод TRIzol):

1. Лизис:

- К 1 мл культуры добавить 1 мл TRIzol, встряхивать 15 сек

2. Сепарация:

- Добавить 200 мкл хлороформа, центрифугировать (12 000 g, 15 мин)

3. Осаждение РНК:

- Водную фазу смешать с 500 мкл изопропанола
- Центрифугировать (12 000 g, 10 мин)

4. Очистка:

- Осадок промыть 75% этанолом
- Растворить в 30 мкл DEPC-воды

Контроль качества:

- Электрофорез с денатурирующим формальдегидным гелем
- Измерение RIN (RNA Integrity Number)

2.3. Выделение плазмид

Метод щелочного лизиса (минипреп):

1. Получение клеточного осадка (1.5 мл культуры)
2. Ресуспендирование в 100 мкл буфера P1 (с RNазой)
3. Лизис 200 мкл буфера P2 (NaOH + SDS) – 5 мин
4. Нейтрализация 150 мкл буфера P3 (ацетат калия)
5. Очистка:
 - Центрифугирование (13 000 g, 10 мин)
 - Осаждение из супернатанта изопропанолом

Варианты очистки:

- Сорбционные колонки (Qiagen)
- Осаждение полиэтиленгликолем

III. Анализ результатов

3.1. Количественная оценка

- Спектрофотометрия:
 - ДНК: A260/A280 ≥ 1.8
 - РНК: A260/A280 ~ 2.0
 - Плазмиды: A260/A230 > 2.0

3.2. Качественная оценка

- Электрофорез:
 - Геномная ДНК: четкая полоса > 10 kb
 - РНК: четкие полосы 16S/23S рРНК
 - Плазмиды: разделение на суперскрученную и линейную формы

IV. Вопросы для самоконтроля

1. Почему для выделения РНК необходима DEPC-вода?
2. Как отличить плазмидную ДНК от геномной при электрофорезе?
3. Какие меры предосторожности нужны при работе с фенолом?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

Синтез целевого фрагмента ДНК для клонирования методом ПЦР

Подбор праймеров

Подготовка реакционной смеси

Подбор протокола ПЦР, постановка реакции

Контроль результатов ПЦР

Цель работы:

- Освоить методику подбора праймеров для амплификации целевого фрагмента ДНК
- Научиться готовить реакционную смесь для ПЦР
- Оптимизировать условия амплификации
- Провести электрофоретический анализ продуктов ПЦР

I. Теоретическая часть

1.1. Основные принципы ПЦР

Этапы ПЦР:

1. Денатурация (94–98°C) – разделение цепей ДНК
2. Отжиг праймеров (50–65°C) – специфическое связывание с матрицей
3. Элонгация (72°C) – синтез новой цепи ДНК полимеразой

Ключевые компоненты реакционной смеси:

Компонент	Концентрация	Функция
ДНК-матрица	0.1–100 нг/мкл	Шаблон для амплификации
Праймеры	0.1–1.0 мкМ	Инициация синтеза
dNTPs	200 мкМ	Субстрат для полимеразы
Taq-полимераза	0.5–2.5 ед./50 мкл	Катализ синтеза ДНК
Буфер	1X	Оптимальные условия для фермента
MgCl ₂	1.5–3.0 мМ	Кофактор полимеразы

II. Практическая часть

2.1. Подбор праймеров

Требования к праймерам:

- Длина: 18–25 п.н.
- Температура плавления (T_m): 50–65°C
- GC-состав: 40–60%
- Отсутствие самокомплементарности

Инструменты для дизайна:

- Программы: Primer-BLAST, OligoCalc
- Базы данных: NCBI Nucleotide

Пример праймеров для гена *lacZ*:

- F: 5'-ATGACCATGATTACGGATTC-3'
- R: 5'-CTTAATCGCCTTGCAGCACA-3'

2.2. Подготовка реакционной смеси

Состав стандартной смеси (50 мкл):

Компонент	Объем (мкл)
Вода	36.5
10X буфер	5.0
dNTPs (10 мМ)	1.0
F-праймер (10 мкМ)	2.5
R-праймер (10 мкМ)	2.5
ДНК-матрица	1.0
Taq-полимераза	0.5

Порядок приготовления:

1. Смешать все компоненты (кроме полимеразы) на льду
2. Добавить полимеразу последней
3. Кратковременно центрифугировать

2.3. Подбор протокола ПЦР

Типовые условия для Taq-полимеразы:

Этап	Температура	Время	Циклы
Инициальная денатурация	95°C	3 мин	1
Денатурация	95°C	30 сек	30–35
Отжиг	55°C*	30 сек	
Элонгация	72°C	1 мин/кб	
Финальная элонгация	72°C	5 мин	1

Оптимизация:

- *Температура отжига:* рассчитывается по формуле:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$$
- *Длительность элонгации:* 1 мин на каждые 1 000 п.н.

2.4. Контроль результатов ПЦР

Электрофорез в агарозном геле:

1. Приготовление 1.5% геля:
 - 1.5 г агарозы на 100 мл ТАЕ-буфера
2. Нанесение образцов:
 - 5 мкл ПЦР-продукта + 1 мкл loading dye
3. Электрофорез:
 - 100 V, 30–40 мин
4. Визуализация:

- Окрашивание бромистым этидием или SYBR Safe
- Анализ под УФ-лампой

Ожидаемые результаты:

- Четкая полоса ожидаемого размера
- Отсутствие неспецифических продуктов

III. Анализ результатов

3.1. Интерпретация данных

Типичные проблемы и решения:

Проблема	Возможная причина	Решение
Нет полос	Неправильные праймеры	Проверить дизайн праймеров
Множество полос	Низкая специфичность	Увеличить температуру отжига
Слабый сигнал	Мало матрицы	Увеличить количество циклов

IV. Вопросы для самоконтроля

1. Почему важно подбирать праймеры с близкими T_m ?
2. Как влияет концентрация Mg^{2+} на эффективность ПЦР?
3. Какие контроли необходимо включать в каждый эксперимент?

Объединение вектора и целевого фрагмента ДНК рестриктазно-лигазным методом

Цель работы:

1. Освоить методику рестрикции и лигирования ДНК
2. Изучить классификацию и механизм действия рестриктаз
3. Научиться строить рестрикционные карты
4. Провести контроль эффективности лигирования

1.1. Рестриктазы: классификация и номенклатура

Класс	Характеристика	Пример
I	Требуют АТФ, разрезают ДНК случайно	EcoKI
II	Распознают палиндромы, режут в сайте	EcoRI, HindIII
III	Резут на расстоянии от сайта	EcoP15I

- **EcoRI** = *Escherichia coli* (штамм R), первая открытая рестриктаза

1. Связывание с палиндромным сайтом (напр., GAATTC для EcoRI)
2. Разрыв фосфодиэфирных связей
3. Образование «липких» (5'-AATT) или тупых концов

Алгоритм:

1. Провести рестрикцию разными ферментами
2. Определить размер фрагментов электрофорезом
3. Сопоставить перекрывающиеся участки

Пример карты плазмиды pBR322:

2.1. Реакция рестрикции

Компонент	Объем
ДНК (вектор/вставка)	1–2 μg
10X буфер	5 мкл
Рестриктаза 1	1 мкл
Рестриктаза 2 (если нужно)	1 мкл

Компонент	Объем
Вода	До 50 мкл

Протокол:

1. Инкубация при оптимальной температуре (обычно 37°C) 1–2 ч
2. Инактивация (65°C, 20 мин для термолабильных ферментов)

Контроль:

- Электрофорез в 1% агарозном геле

2.2. Подготовка фрагментов к лигированию

Очистка от ферментов:

- Наборы типа QIAquick PCR Purification Kit
- Осаждение этанолом

Определение концентрации:

- Спектрофотометр (A260)
- Электрофорез с маркерами

2.3. Реакция лигирования

Состав смеси (20 мкл):

Компонент	Объем
Вектор (линейный)	50–100 нг
Вставка	3:1 молярное соотношение
T4 ДНК-лигаза	1 мкл
10X буфер	2 мкл
АТР (если нужно)	1 мкл
Вода	До 20 мкл

Условия:

- 16°C, 4 ч или ночь
- Для тупых концов – увеличение лигазы в 2–5 раз

III. Анализ результатов

3.1. Контроль лигирования

Методы:

1. Электрофорез: сдвиг полосы вектора
2. ПЦР с праймерами на вектор + вставку
3. Трансформация в бактерии с последующим отбором

3.2. Расчет эффективности лигирования

Формула:

Copy

Download

Эффективность (%) = (число колоний с рекомбинантами / общее число колоний) × 100

Ожидаемые результаты:

- Для «липких» концов – 70–90%
- Для тупых концов – 10–30%

IV. Вопросы для самоконтроля

1. Почему для клонирования предпочтительны рестриктазы II типа?
2. Как подобрать оптимальное соотношение вектор:вставка?
3. Какие методы используют для повышения эффективности лигирования тупых концов?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

Трансформация клеток *E. coli* рекомбинантными плазмидными векторами

Получение компетентных клеток *E. coli*

Трансформация клеток *E. coli* рекомбинантными плазмидными векторами

Цель работы:

1. Освоить методы приготовления компетентных клеток бактерий.
2. Изучить механизм и условия трансформации *E. coli* плазмидной ДНК.
3. Отработать технику отбора трансформантов.

I. Теоретическая часть

1.1. Компетентные клетки: принцип подготовки

Определение: Способность бактериальных клеток поглощать экзогенную ДНК.

Методы индукции компетентности:

Метод	Механизм	Эффективность (трансформантов/мкг ДНК)
Химический (CaCl ₂)	Нарушение клеточной мембраны	10 ⁶ –10 ⁷
Электропорация	Электрический шок	10 ⁸ –10 ⁹
Термический шок	Кратковременный нагрев	10 ⁵ –10 ⁶

Критические параметры:

- Фаза роста клеток (оптимум – середина логарифмической фазы, OD600 ≈ 0.4–0.6).
- Температура (0–4°C для CaCl₂-метода).

II. Практическая часть

2.1. Приготовление компетентных клеток (CaCl₂-метод)

Оборудование и реактивы:

- Штамм *E. coli* DH5α
- LB-бульон
- Раствор CaCl₂ (0.1 М, стерильный, охлажденный)
- Глицерин (15%, стерильный)

Протокол:

1. **Культивирование:**
 - Инокуляция 5 мл LB-бульона колонией *E. coli*, инкубация 12–16 ч при 37°C.
 - Разведение 1:100 в 50 мл свежего LB, выращивание до OD600 = 0.4–0.6.
2. **Обработка CaCl₂:**
 - Охлаждение культуры на льду 15 мин.
 - Центрифугирование (4,000 g, 5 мин, 4°C).
 - Ресуспендирование осадка в 10 мл холодного CaCl₂.
 - Инкубация на льду 30 мин.
3. **Криоконсервация:**
 - Повторное центрифугирование.
 - Ресуспендирование в 2 мл CaCl₂ + 15% глицерина.
 - Аликвотирование по 100 мкл, хранение при –80°C.

Контроль качества:

- Трансформация контрольной плазмидой (например, pUC19).

2.2. Трансформация плазмидной ДНК

Реактивы:

- Компетентные клетки *E. coli*
- Плазмида (например, pET-28a(+), 10–100 нг)
- LB-агар с антибиотиком (например, канамицин 50 мкг/мл)

Протокол:**1. Смешивание:**

- 50 мкл клеток + 1–5 мкл плазмиды на льду.

2. Термический шок:

- Инкубация на льду 30 мин → 42°C, 45 сек → обратно на лед 2 мин.

3. Выращивание:

- Добавление 500 мкл LB-бульона, инкубация 1 ч при 37°C (200 об/мин).

4. Посадка на чашки:

- Нанесение 100–200 мкл суспензии на селективную среду.
- Инкубация 16–18 ч при 37°C.

Расчет эффективности трансформации:

Copy

Download

Эффективность (КОЕ/мкг) = (число колоний × объем посева (мл)) / (объем плазмы (мкг) × объем трансформации (мл))

III. Анализ результатов**3.1. Ожидаемые результаты**

- **Успешная трансформация:** Рост колоний только на чашках с антибиотиком.
- **Контроль:**
 - **Отрицательный** (без ДНК): отсутствие роста.
 - **Положительный** (известная плазмида): стандартное число колоний.

3.2. Типичные проблемы

Проблема	Причина	Решение
Нет колоний	Некачественные клетки	Проверить компетентность на pUC19
Фон (на контроле)	Загрязнение антибиотиком	Приготовить свежую среду
Мелкие колонии	Недоконъюгация	Увеличить время восстановления

IV. Вопросы для самоконтроля

1. Почему для трансформации используют середину логарифмической фазы?
2. Как влияет концентрация CaCl₂ на эффективность?
3. Для чего нужен этап "восстановления" после шока?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

Подготовка эксплантов для трансформации. Получение компетентных клеток *Agrobacterium tumefaciens*

Стерилизация и прекультивирование на среде MS.
Трансформация *Agrobacterium* плазмидой pCambia.
Отбор на средах с антибиотиками.

Цель работы:

1. Освоить методы подготовки растительных эксплантов для генетической трансформации
2. Приготовить компетентные клетки *A. tumefaciens*
3. Провести трансформацию агробактерий плазмидной ДНК
4. Отработать технику отбора трансформантов

I. Теоретическая часть

1.1. *Agrobacterium*-опосредованная трансформация

Принцип:

- *A. tumefaciens* переносит T-ДНК из Ti-плазмиды в геном растения
- Вектор pCambia содержит:
 - Гены устойчивости к антибиотикам (*kanR*, *rifR*)
 - Репортерный ген *gusA* (β-глюкуронидаза)

1.2. Критические этапы

Этап	Условия	Оптимизация
Подготовка эксплантов	Стерильность	Отбор молодых тканей
Индукция компетентности	Температура, фаза роста	OD600 = 0.5–0.8
Трансформация	Состав среды	Ацетосирингон (200 мкМ)

II. Практическая часть

2.1. Подготовка растительных эксплантов

Материалы:

- Листья *Nicotiana tabacum* (3–4 недельные)
- 70% этанол, 2% NaClO (гипохлорит натрия)
- Среда MS (Murashige & Skoog) без гормонов

Протокол:

1. **Стерилизация:**
 - Погружение в 70% этанол (30 сек) → 2% NaClO (10 мин) → 3× промывка стерильной водой
2. **Прекультивирование:**
 - Размещение листовых дисков (Ø 5 мм) на MS + 0.5 мг/л BAP
 - Инкубация 24 ч при 25°C, 16/8 ч (свет/темнота)

2.2. Приготовление компетентных клеток *A. tumefaciens*

Реактивы:

- Штамм LBA4404 (pCambia2301)
- Среда YEP (г/л): пептон – 10, дрожжевой экстракт – 10, NaCl – 5
- 20 mM CaCl₂ (стерильный, охлажденный)

Метод:

1. Культивирование в 50 мл YEP при 28°C до OD600 = 0.6

2. Охлаждение на льду 15 мин → центрифугирование (5,000 g, 5 мин)
3. Ресуспендирование в 10 мл холодного CaCl₂
4. Хранение аликвот по 100 мкл при –80°C

2.3. Трансформация *Agrobacterium*

Состав смеси:

Компонент	Объем
Компетентные клетки	100 мкл
Плазмида pCAMBIA	1–5 мкл (100 нг)
YEP-бульон	500 мкл

Условия:

1. Инкубация на льду 30 мин → 37°C, 5 мин → лёд 2 мин
2. Добавление 1 мл YEP, инкубация 2–4 ч при 28°C (200 об/мин)
3. Посев на YEP-агар с:
 - Канамицином (50 мкг/мл)
 - Рифампицином (100 мкг/мл)

2.4. Отбор трансформантов

Анализ:

- Рост колоний через 48–72 ч при 28°C
- ПЦР-верификация с праймерами к *virG* (F: 5'-GCTCGCAAGACCCTTCCT-3', R: 5'-GCGTGTAAGGATCGGTGT-3')

III. Анализ результатов

3.1. Контроль качества

Параметр	Ожидаемый результат
Стерильность эксплантов	Отсутствие контаминации
Эффективность трансформации	10 ³ –10 ⁴ КОЕ/мкг ДНК
Специфичность отбора	Рост только на YEP+Kan+Rif

3.2. Устранение проблем

Проблема	Решение
Нет роста колоний	Проверить активность антибиотиков
Фоновый рост	Увеличить концентрацию Rif до 150 мкг/мл
Низкая эффективность	Оптимизировать фазу роста бактерий

IV. Вопросы для самоконтроля

1. Почему для трансформации *Agrobacterium* используют CaCl₂?
2. Какую роль играет ацетосирингон в процессе трансформации?
3. Почему в среде отбора нужны два антибиотика?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

Кокультивирование культур растительных клеток с *Agrobacterium* и отбор трансгенных каллусов

Оптимизация времени инкубации
Оценка эффективности трансформации

Отбор трансгенных каллусов на среде МС с антибиотиками.

Цель работы:

1. Освоить технику кокультивирования растительных эксплантов с *Agrobacterium tumefaciens*.
2. Оптимизировать время инкубации для максимальной эффективности трансформации.
3. Провести отбор трансгенных каллусов на селективных средах.

I. Теоретическая часть

1.1. Принцип *Agrobacterium*-опосредованной трансформации

- **Механизм:** Перенос Т-ДНК из плазмиды (например, pCAMBIA) в геном растительной клетки.
- **Ключевые этапы:**
 - Индукция *vir*-генов ацетосирингоном.
 - Прикрепление бактерий к раневым поверхностям эксплантов.
 - Отбор трансформированных клеток на средах с антибиотиками (канамицин, цефотаксим).

1.2. Факторы, влияющие на эффективность:

Фактор	Оптимальные условия
Время кокультивирования	2–3 суток
Плотность культуры бактерий	OD600 = 0.5–0.8
Состав среды	MS + 200 мкМ ацетосирингон

II. Практическая часть

2.1. Подготовка эксплантов и бактерий

Материалы:

- Экспланты: листовые диски табака (*Nicotiana tabacum*) или каллусная культура.
- Штамм *A. tumefaciens* (например, LBA4404 с pCAMBIA2301).

Протокол:

1. Стерилизация эксплантов:

- Обработка 70% этанолом (1 мин) → 2% NaClO (10 мин) → промывка стерильной водой.

2. Активация *Agrobacterium*:

- Культивирование в среде YEP + антибиотики (28°C, 24 ч).
- Ресуспендирование в MS + ацетосирингон (OD600 = 0.5).

2.2. Кокультивирование

1. Инокуляция эксплантов бактериальной суспензией (10 мин).
2. Перенос на фильтровальную бумагу в чашках Петри с MS + ацетосирингон.
3. Инкубация в темноте при 25°C:
 - **Варианты времени:** 24, 48, 72 ч (для оптимизации).

2.3. Отбор трансгенных каллусов

1. Удаление бактерий:

- Промывка эксплантов в MS + цефотаксим (500 мг/л).

2. Селекция:

- Перенос на MS + канамицин (100 мг/л) + цефотаксим (300 мг/л).

3. Культивирование:

- 25°C, 16/8 ч (свет/темнота), 4 недели.

2.4. Оценка эффективности

1. Расчет частоты трансформации:

Copy

Download

Эффективность (%) = (число эксплантов с каллусом / общее число эксплантов) × 100

2. Гистохимический анализ GUS (для pCAMBIA с *gusA*):

- Инкубация в X-Gluc буфере (12 ч, 37°C).
- Визуализация синего окрашивания под микроскопом.

III. Анализ результатов

3.1. Ожидаемые результаты

Параметр	Норма
Появление каллуса	Через 2–3 недели
Эффективность трансформации	20–40%
Контроль (без <i>Agrobacterium</i>)	Отсутствие роста

3.2. Устранение проблем

Проблема	Решение
Гибель эксплантов	Уменьшить концентрацию антибиотиков
Бактериальная контаминация	Увеличить дозу цефотаксима
Низкая эффективность	Оптимизировать время кокультивирования

IV. Вопросы для самоконтроля

1. Почему ацетосирингон добавляют на этапе кокультивирования?
2. Как цефотаксим влияет на *Agrobacterium*?
3. Какие альтернативные репортерные гены используют вместо *gusA*?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7
Молекулярный скрининг трансформантов
Выделение ДНК, ПЦР с генами-маркерами
Гистохимический анализ GUS-активности
Оценка экспрессии трансгена (qRT-PCR)
Выделение РНК, синтез кДНК, анализ данных.

Цель работы:

1. Освоить методы молекулярного анализа трансгенных растений.
2. Провести ПЦР-скрининг, гистохимический анализ GUS и оценку экспрессии генов методом qRT-PCR.

I. Теоретическая часть

1.1. Этапы молекулярного скрининга

1. **Выделение ДНК** – получение матрицы для ПЦР.
2. **ПЦР с генами-маркерами** (например, *nptII*, *gusA*).
3. **Гистохимический анализ GUS** – визуализация активности β-глюкуронидазы.
4. **Оценка экспрессии** – выделение РНК, синтез кДНК, qRT-PCR.

II. Практическая часть

2.1. Выделение ДНК из трансгенных растений

Реактивы:

- СТАВ-буфер (2% СТАВ, 100 мМ Tris-HCl, 20 мМ EDTA, 1.4 М NaCl).
- Хлороформ-изоамиловый спирт (24:1).

Протокол:

1. Гомогенизация 100 мг листьев в СТАВ-буфере.
2. Инкубация при 65°C, 30 мин.
3. Добавление хлороформа, центрифугирование (12,000 g, 10 мин).
4. Осаждение ДНК из супернатанта изопропанолом.

Контроль качества:

- Электрофорез в 0.8% агарозном геле.
- Спектрофотометрия ($A_{260}/A_{280} \geq 1.8$).

2.2. ПЦР с генами-маркерами

Праймеры:

Ген	Последовательность (5'→3')	Размер ампликона
<i>nptII</i>	F: GAGGGCTATTCGGCTATGAC	700 п.н.
	R: ATCGGGAGCGGCGATACCGTA	
<i>gusA</i>	F: GCTGTAGAAACCCCAACCCG	500 п.н.
	R: TTCGTTTGTGGAATTGTGAGC	

Параметры ПЦР:

- Денатурация: 95°C, 3 мин → 30 циклов (95°C/30 сек, 60°C/30 сек, 72°C/1 мин).
- Электрофорез: 1.5% агарозный гель, 100 V, 40 мин.

2.3. Гистохимический анализ GUS

Реактивы:

- X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-глюкуронид).

Протокол:

1. Инкубация тканей в X-Gluc буфере (1 мг/мл, 37°C, 12 ч).
2. Фиксация в 70% этаноле.
3. Визуализация синего окрашивания под микроскопом.

2.4. Оценка экспрессии (qRT-PCR)

2.4.1. Выделение РНК

- TRIzol-метод (см. предыдущие методические указания).
- Контроль качества: RIN ≥ 7.0 (Agilent Bioanalyzer).

2.4.2. Синтез кДНК

- Использование M-MLV обратной транскриптазы и олиго(dT)-праймеров.

2.4.3. qRT-PCR

Праймеры для референсного гена (*EF1a*):

- F: CTGGAGGTTTTGAGGCTGGT
- R: CCAAGGGTCAAAGCAAGAAC

Программа:

1. Денатурация: 95°C, 10 мин → 40 циклов (95°C/15 сек, 60°C/1 мин).
2. Анализ данных методом $\Delta\Delta C_t$.

III. Анализ результатов

3.1. Интерпретация данных

Метод	Ожидаемый результат
ПЦР	Четкие полосы целевых генов
GUS-анализ	Синее окрашивание в трансгенных тканях
qRT-PCR	Кратность изменения экспрессии $\geq 2x$

3.2. Устранение проблем

Проблема	Решение
Нет ПЦР-продукта	Оптимизировать температуру отжига
Фоновое окрашивание GUS	Уменьшить время инкубации
Низкое качество РНК	Использовать RNase-free условия

IV. Вопросы для самоконтроля

1. Почему для qRT-PCR необходим референсный ген?
2. Как отличить истинно-трансгенные растения от ложноположительных?
3. Какие контроли включают в ПЦР?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8

Работа с эмбрионами и приготовление конструкций для редактирования

Получение зигот

Культивирование *in vitro*

Дизайн gRNA для CRISPR

Подготовка плазмидных векторов

Цель работы:

1. Освоить методы получения и культивирования зигот *in vitro*.
2. Научиться проектировать gRNA для системы CRISPR-Cas9.
3. Приготовить плазмидные векторы для редактирования генома.

I. Теоретическая часть

1.1. Основные этапы геномного редактирования

1. Получение зигот:

- Суперовуляция и оплодотворение *in vivo/in vitro*.

2. Дизайн gRNA:

- Подбор 20-нуклеотидной последовательности, комплементарной целевой ДНК.

3. Подготовка векторов:

- Клонирование gRNA и Cas9 в плазмиды (например, pX330).

1.2. Критические параметры

Параметр	Оптимальные условия
Время культивирования зигот	24–48 ч (до стадии 2-клеточного зародыша)
Длина gRNA	20 нт + PAM (NGG)
Концентрация ДНК для микроинъекции	50–100 нг/мкл

II. Практическая часть

2.1. Получение зигот мыши

Материалы:

- Самки мышей (4–6 недель).
- Гормоны: PMSG (5 ME), hCG (5 ME).

Протокол:

1. Стимуляция суперовуляции:

- Инъекция PMSG → через 48 ч hCG → спаривание.

2. Выделение зигот:

- Изоляция из яйцеводов через 20 ч после hCG.
- Обработка гиалуронидазой (0.1% в M2-среде).

2.2. Культивирование *in vitro*

Среды:

- M16 (для культивирования при 37°C, 5% CO₂).
- KSOM (для длительного культивирования).

Контроль качества:

- Оценка морфологии зигот под микроскопом (40×).
- Отбраковка зигот с фрагментацией или дегенерацией.

2.3. Дизайн gRNA

Инструменты:

- Программы: CRISPRdirect, Benchling.

- Базы данных: UCSC Genome Browser.

Требования:

- Отсутствие офф-таргет эффектов (<3 несовпадения).
- Высокий показатель эффективности (CFD score ≥ 0.8).

Пример для гена *Tyr* (меланин):

Copy

Download

Целевая последовательность: 5'-GCTGGTGCTCCTGGTAACCA-NGG-3'

gRNA: 5'-GCTGGTGCTCCTGGTAACCA-3'

2.4. Подготовка плазмидных векторов

Протокол клонирования (Golden Gate Assembly):

1. Лигирование:

- Смешать:
 - 50 нг плазмиды pX330
 - 10 нг синтезированной gRNA-вставки
 - T4 ДНК-лигаза (1 ед.)
- Инкубация: 37°C, 1 ч → 16°C, 4 ч.

2. Трансформация:

- Введение в *E. coli* DH5 α , отбор на LB + ампициллин (100 мкг/мл).

3. Верификация:

- ПЦР с праймерами U6-F (5'-GAGGGCCTATTTCCCATGAT-3') и gRNA-R.

III. Анализ результатов

3.1. Ожидаемые результаты

Этап	Критерии успеха
Получение зигот	≥ 30 зигот на 1 самку
Культивирование	Развитие до 2-клеточной стадии (24 ч)
gRNA-дизайн	Отсутствие офф-таргетов в базе данных
Клонирование	Рост $\geq 50\%$ колоний с правильной вставкой

3.2. Устранение проблем

Проблема	Решение
Низкий выход зигот	Оптимизировать дозы гормонов
Гибель эмбрионов	Проверить pH среды (7.2–7.4)
Отсутствие клонов	Увеличить время лигирования

IV. Вопросы для самоконтроля

1. Почему PAM-сайт (NGG) обязателен для Cas9?
2. Как проверить специфичность gRNA?
3. Какие альтернативы микроинъекции для доставки CRISPR?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9

Доставка вектора в клетку.

Микроинъекция в пронуклеус

Техника микроинъекции

Контроль качества инъекций

Электропорация эмбриональных клеток

Оптимизация параметров трансфекции

Оценка эффективности трансфекции

1. Цель работы

1. Освоить технику микроинъекции в пронуклеус
2. Изучить метод электропорации эмбриональных клеток
3. Оценить эффективность доставки генетического материала

2. Теоретическая часть

2.1. Методы доставки ДНК

Метод	Преимущества	Недостатки
Микроинъекция	Высокая эффективность (до 50%)	Требует дорогостоящего оборудования
Электропорация	Подходит для массовой трансфекции	Может повреждать клетки

2.2. Критические параметры

- Для микроинъекции:
 - Диаметр иглы: 0.5-1 мкм
 - Концентрация ДНК: 1-5 нг/мкл
- Для электропорации:
 - Напряжение: 800-1200 В/см
 - Длительность импульса: 1-5 мс

3. Оборудование и материалы

1. Для микроинъекции:
 - Инвертированный микроскоп с микроманипуляторами
 - Капилляры для инъекций (диаметр 1 мкм)
 - Плазмидная ДНК (например, pEGFP-N1)
2. Для электропорации:
 - Электропоратор (например, Bio-Rad Gene Pulser)
 - Кюветы с электродами (4 мм)
 - Буфер для электропорации (PBS с 10% глицерина)

4. Методика выполнения

4.1. Микроинъекция в пронуклеус

Этапы:

1. Подготовка зигот (мышинные эмбрионы на 0.5 день развития)
2. Загрузка ДНК в инъекционную иглу
3. Фиксация зигот с помощью удерживающей пипетки
4. Введение 1-2 пл ДНК в мужской пронуклеус
5. Контроль качества под фазовым контрастом

Критерии успешной инъекции:

- Отсутствие повреждения мембраны
- Видимое увеличение пронуклеуса

4.2. Электропорация эмбриональных клеток

Протокол:

1. Приготовление суспензии клеток (1×10^6 кл/мл)
2. Добавление 10 мкг плазмидной ДНК
3. Электропорация при параметрах:
 - 1000 В/см
 - 1 импульс, 5 мс
4. Инкубация 10 мин при 37°C

5. Оценка результатов

5.1. Контроль качества микроинъекций

Показатель	Норма
------------	-------

Выживаемость зигот	$\geq 70\%$
--------------------	-------------

Частота трансгеноза	20-50%
---------------------	--------

5.2. Анализ эффективности электропорации

1. Флуоресцентная микроскопия (для GFP) через 24 ч
2. Проточная цитометрия (для количественной оценки)

6. Требования к отчету

1. Протокол выполнения работы
2. Фото микроинъекции с пояснениями
3. Расчет эффективности трансфекции (%)
4. Анализ возможных ошибок

7. Вопросы для самоконтроля

1. Почему для микроинъекции выбирают мужской пронуклеус?
2. Как влияет концентрация ДНК на эффективность электропорации?
3. Какие методы контроля качества инъекций вы знаете?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10

Генетическое редактирование культуры клеток животных методом CRISPR/Cas9

Подготовка культуры клеток

Нокаут гена CRISPR-конструкциями.

Оценка эффективности редактирования

Цель работы:

1. Освоить технологию генетического редактирования клеточных культур с использованием системы CRISPR/Cas9.
2. Провести нокаут целевого гена в культивируемых клетках.
3. Оценить эффективность редактирования генома.

I. Теоретическая часть

1.1. Принцип CRISPR/Cas9

- **CRISPR/Cas9** – система адаптивного иммунитета бактерий, адаптированная для редактирования генома эукариот.
- **Компоненты системы:**
 - **Cas9** – эндонуклеаза, разрезающая ДНК.
 - **gRNA** (guide RNA) – направляет Cas9 к целевой последовательности.
 - **PAM-сайт** (NGG) – обязательный элемент для связывания Cas9.

1.2. Этапы генетического редактирования

1. **Дизайн gRNA** – подбор последовательности, комплементарной целевому гену.
2. **Доставка CRISPR-компонентов** в клетки (липофекция, электропорация).
3. **Анализ редактирования** – ПЦР, секвенирование, вестерн-блоттинг.

II. Практическая часть

2.1. Подготовка культуры клеток

Материалы:

- Клеточная линия (например, HEK293, HeLa).
- Среда DMEM/F12 + 10% FBS + антибиотики.

Протокол:

1. Культивирование клеток при 37°C, 5% CO₂ до 70–80% конфлюэнтности.
2. Пассирование с использованием трипсина-EDTA.
3. Подсчет клеток и посев в 24-луночный планшет (5×10⁴ клеток/луночка).

2.2. Нокаут гена CRISPR-конструкциями

Реактивы:

- Плазмиды: pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgene #48138) + gRNA-конструкция.
- Трансфекционный реагент (Lipofectamine 3000).

Протокол:

1. **Приготовление трансфекционной смеси:**
 - 1 µg плазмиды Cas9 + 0.5 µg gRNA + 2 µl Lipofectamine 3000 в Opti-MEM.
2. **Трансфекция:**
 - Замена среды на смесь с липидными комплексами.
 - Инкубация 6 ч при 37°C, затем замена на свежую среду.
3. **Отбор трансфицированных клеток:**
 - Через 48 ч – сортировка GFP-позитивных клеток (при использовании pSpCas9-2A-GFP).

2.3. Оценка эффективности редактирования

2.3.1. Выделение геномной ДНК

- Использование набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).

2.3.2. ПЦР-амплификация целевого локуса

Праймеры:

- F: 5'-GCTGGTGCTCCTGGTAACCA-3'
- R: 5'-CAGTCGGTGAGTACGGTAGC-3'

Программа ПЦР:

- 95°C, 3 мин → 35 циклов (95°C/30 сек, 60°C/30 сек, 72°C/1 мин).

2.3.3. Анализ продуктов ПЦР

1. Электрофорез в 2% агарозном геле:

- Ожидаемые результаты:
 - Дикий тип: 1 полоса.
 - Гетерозиготный нокаут: 2 полосы.
 - Гомозиготный нокаут: 1 полоса со сдвигом.

2. Секвенирование (опционально):

- Подтверждение наличия делеций/инсерций.

III. Анализ результатов

3.1. Расчет эффективности редактирования

Copy

Download

Эффективность (%) = (число клеток с редактированием / общее число клеток) × 100

Методы оценки:

- ПЦР + электрофорез.
- T7E1-анализ (для гетеродуплексов).

3.2. Возможные проблемы

Проблема	Решение
Низкая эффективность трансфекции	Увеличить концентрацию ДНК, оптимизировать время
Отсутствие редактирования	Проверить дизайн gRNA, наличие PAM-сайта
Токсичность Cas9	Использовать индуцибельные системы (например, pX330)

IV. Вопросы для самоконтроля

1. Почему PAM-сайт (NGG) критичен для работы Cas9?
2. Какие методы доставки CRISPR/Cas9 в клетки вы знаете?
3. Как отличить гетерозиготный нокаут от гомозиготного?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11
Генотипирование и фенотипирование трансгенных животных
Выделение ДНК
ПЦР-анализ
Анализ экспрессии трансгена
Выделение РНК и ОТ-ПЦР
Методы оценки фенотипа
Интерпретация результатов

Цель работы:

1. Освоить методы молекулярного анализа трансгенных животных (ПЦР, ОТ-ПЦР).
2. Провести оценку фенотипических изменений у генетически модифицированных организмов (ГМО).
3. Научиться интерпретировать комплексные данные генотипирования и фенотипирования.

I. Теоретическая часть

1.1. Основные этапы анализа трансгенных животных

Этап	Методы	Ключевые параметры
Генотипирование	Выделение ДНК, ПЦР	Чувствительность, специфичность
Анализ экспрессии	ОТ-ПЦР, вестерн-блоттинг	Уровень мРНК/белка
Фенотипирование	Морфометрия, гистология, поведенческие тесты	Статистическая значимость

1.2. Критические аспекты

- Контроль качества ДНК/РНК ($A_{260}/A_{280} \geq 1.8$).
- Подбор праймеров для трансгена и референсных генов (*Gapdh*, *Actb*).
- Стандартизация условий фенотипических тестов.

II. Практическая часть

2.1. Выделение ДНК из тканей

Материалы:

- Образцы тканей (хвост, печень).
- Буфер для лизиса (100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl).
- Протеиназа К (20 мг/мл).

Протокол:

1. Гомогенизация 20 мг ткани в 500 мкл буфера.
2. Инкубация с протеиназой К (56°C, 12 ч).
3. Осаждение ДНК изопропанолом.

Контроль качества:

- Электрофорез в 0.8% агарозном геле.

2.2. ПЦР-анализ трансгена

Праймеры для плазмиды pCX-EGFP:

Компонент	Последовательность (5'→3')	Размер ампликона
EGFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	720 п.н.

Компонент	Последовательность (5'→3')	Размер ампликона
EGFP-R	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	

Программа ПЦР:

- Денатурация: 95°C, 3 мин → 35 циклов (95°C/30 сек, 60°C/30 сек, 72°C/1 мин).

Визуализация:

- 1.5% агарозный гель, окрашивание SYBR Safe.

2.3. Анализ экспрессии (ОТ-ПЦР)

2.3.1. Выделение РНК

- TRIzol-метод (см. предыдущие методички).
- Контроль: RIN >7.0 (Agilent 2100 Bioanalyzer).

2.3.2. Синтез кДНК

- Использование M-MLV обратной транскриптазы и random hexamers.

2.3.3. qPCR

Референсные гены:

Ген	Праймеры	
<i>Gapdh</i>	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG, TG TAGACCATGTAGTTGAGGTCA	R:

Программа:

- 95°C, 10 мин → 40 циклов (95°C/15 сек, 60°C/1 мин).

2.4. Фенотипирование

Методы:

1. Морфометрия:

- Масса тела, размер органов.

2. Гистология:

- Окрашивание H&E, иммуногистохимия.

3. Поведенческие тесты:

- Открытое поле, водный лабиринт Морриса.

Пример для мышей с knockout *Tyr*:

- **Фенотип:** Альбинизм (отсутствие меланина).
- **Метод оценки:** Визуальный осмотр, спектрофотометрия меланина.

III. Анализ результатов

3.1. Интерпретация данных

Метод	Ожидаемый результат	Критерии
ПЦР	Четкая полоса трансгена	Отсутствие в контроле
ОТ-ПЦР	Кратность изменения ≥ 2 х	p < 0.05 (t-тест)
Фенотип	Статистические различия	ANOVA

3.2. Устранение проблем

Проблема	Решение
----------	---------

Проблема	Решение
Нет ПЦР-продукта	Проверить качество ДНК, оптимизировать праймеры
Высокий СТ в qPCR	Увеличить количество матрицы
Вариабельность фенотипа	Увеличить размер выборки ($n \geq 10$)

IV. Вопросы для самоконтроля

1. Почему для ОТ-ПЦР необходим референсный ген?
2. Как отличить гетерозиготных от гомозиготных трансгенных животных?
3. Какие артефакты возможны при гистологическом анализе?

Перечень основной литературы:

1. Якупов, Т. Р. Молекулярная биотехнология : учебник для вузов / Т. Р. Якупов, Т. Х. Фаизов. — 4-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2025. — 160 с. — ISBN 978-5-507-53208-7. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/478241>

2. Резяпкин, В. И. Генная инженерия: практикум : учебное пособие / В. И. Резяпкин. — 7-е изд., перераб. — Гродно : ГрГУ им. Янки Купалы, 2024. — 65 с. — ISBN 978-985-582-603-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/433241>

Перечень дополнительной литературы:

1. Тузова, Р. В. Молекулярно-генетические механизмы эволюции органического мира. Генетическая и клеточная инженерия / Р. В. Тузова, Н. А. Ковалев. — Минск : Белорусская наука, 2010. — 395 с. — ISBN 978-985-08-1186-8. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/90451>

2. Генетические основы селекции растений : монография : в 4 томах. — Минск : Белорусская наука, [б. г.]. — Том 4 : Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия — 2014. — 653 с. — ISBN 978-985-08-1791-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/90618>

3. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия : учебно-справочное пособие / С. Н. Щелкунов. — Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2017. — 514 с. — ISBN 978-5-379-02024-8. — Текст : электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART : [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/65273.html>

4. Кизиченко, Н. В. Молекулярная биология : учебник с упражнениями и задачами / Н. В. Кизиченко, А. Г. Жукова, Л. Г. Горохова. — Москва ; Берлин : Директ-Медиа, 2018. — 267 с. : ил., табл. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=488606>

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
для обучающихся по организации и проведению самостоятельной работы
по дисциплине «ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ»
для студентов Направление подготовки 06.04.01 Биология

Введение

Самостоятельная работа - планируемая учебная, учебно-исследовательская, научно-исследовательская работа студентов, выполняемая во внеаудиторное (аудиторное) время по заданию и при методическом руководстве преподавателя, но без его непосредственного участия (при частичном непосредственном участии преподавателя, оставляющем ведущую роль за работой студентов).

Самостоятельная работа студентов (СРС) в ВУЗе является важным видом учебной и научной деятельности студента. Самостоятельная работа студентов играет значительную роль в рейтинговой технологии обучения.

Ведущая цель организации и осуществления СРС совпадает с целью обучения студента – формирование набора общенаучных, профессиональных и специальных компетенций будущего специалиста.

При организации СРС важным и необходимым условием становятся формирование умения самостоятельной работы для приобретения знаний, навыков и возможности организации учебной и научной деятельности. Целью самостоятельной работы студентов является овладение фундаментальными знаниями, профессиональными умениями и навыками деятельности по профилю, опытом творческой, исследовательской деятельности. Самостоятельная работа студентов способствует развитию самостоятельности, ответственности и организованности, творческого подхода к решению проблем учебного и профессионального уровня.

Задачами СРС являются:

- систематизация и закрепление полученных теоретических знаний и практических умений студентов;
- углубление и расширение теоретических знаний;
- формирование умений использовать нормативную, правовую, справочную документацию и специальную литературу;
- развитие познавательных способностей и активности студентов: творческой инициативы, самостоятельности, ответственности и организованности;
- формирование самостоятельности мышления, способностей к саморазвитию, самосовершенствованию и самореализации;
- развитие исследовательских умений;
- использование материала, собранного и полученного в ходе самостоятельных занятий на семинарах, на практических и лабораторных занятиях, при написании курсовых и выпускной квалификационной работ, для эффективной подготовки к итоговым зачетам и экзаменам.

К основным видам самостоятельной работы студентов относятся:

- формирование и усвоение содержания конспекта лекций на базе рекомендованной лектором учебной литературы, включая информационные образовательные ресурсы (электронные учебники, электронные библиотеки и др.);
- написание индивидуальных творческих заданий;

- подготовка к семинарам, практическим и лабораторным работам, их оформление;
- составление аннотированного списка статей из соответствующих журналов по отраслям знаний (педагогических, психологических, методических и др.);
- выполнение учебно-исследовательских работ, проектная деятельность;
- подготовка практических разработок и рекомендаций по решению проблемной ситуации;
- выполнение домашних заданий в виде решения отдельных задач, проведения типовых расчетов, расчетно-компьютерных и индивидуальных работ по отдельным разделам содержания дисциплин и т.д.;
- компьютерный текущий самоконтроль и контроль успеваемости на базе электронных обучающих и аттестующих тестов;
- выполнение курсовых работ (проектов) в рамках дисциплин;
- выполнение выпускной квалификационной работы и др.

Методика организации самостоятельной работы студентов зависит от структуры, характера и особенностей изучаемой дисциплины, объема часов на ее изучение, вида заданий для самостоятельной работы студентов, индивидуальных качеств студентов и условий учебной деятельности.

Процесс организации самостоятельной работы студентов включает в себя следующие этапы:

- подготовительный (определение целей, составление программы, подготовка методического обеспечения, подготовка оборудования);
- основной (реализация программы, использование приемов поиска информации, усвоения, переработки, применения, передачи знаний, фиксирование результатов, самоорганизация процесса работы);
- заключительный (оценка значимости и анализ результатов, их систематизация, оценка эффективности программы и приемов работы, выводы о направлениях оптимизации труда).

Методические рекомендации по работе с литературой

Одной из форм самостоятельной внеаудиторной подготовки к занятиям является работа с литературой. Работа с литературой подразумевает умение студента осмысленно пользоваться источниками.

Существует несколько методов работы с литературой. При использовании метода повторения, прочитанный текст заучивается наизусть. Простое повторение воздействует на память механически и поверхностно полученные при этом сведения легко забываются. Метод кодирования подразумевает основательную обработку прочитанного текста. При этом необходимо провести некоторые мыслительные операции: прокомментировать и оценить значение новых данных; сопоставить полученные сведения с ранее известными; установить осмысленные связи; структурировать новые сведения.

При изучении научной учебной и иной литературы рекомендуется вести рабочие записи. Наиболее краткой и доступной формой записей является план. План - первооснова, каркас какой-либо письменной работы, определяющие последовательность изложения материала. По существу, это перечень основных вопросов, рассматриваемых в источнике. План может быть простым и развернутым. Их отличие состоит в степени детализации содержания и, соответственно, в объеме.

Методические рекомендации по составлению конспекта

Результатом самостоятельной работы является составление конспекта. Конспект – сложная запись содержания исходного текста, включающая в себя заимствования (цитаты) наиболее примечательных мест в сочетании с планом источника, а также сжатый анализ записанного материала и выводы по нему.

Запись конспекта должна быть систематической, логической, связной. Для составления конспекта необходимо:

1. Внимательно прочитать текст, определить цель составления конспекта. Уточнить в справочной литературе непонятные слова, записать название конспектируемого произведения (или его части) и его выходные данные;
2. Выделить главное, составить план;
3. Кратко сформулировать основные положения текста;
4. Законспектировать материал, четко следуя пунктам плана. При конспектировании необходимо выразить мысль своими словами. Записи следует вести четко, ясно.
5. Грамотно записывайте цитаты. При цитировании использовать лаконичность, значимость мысли.

В тексте конспекта желательно приводить не только тезисные положения, но и их доказательства. При оформлении конспекта необходимо стремиться к емкости каждого предложения. Мысли автора книги следует излагать кратко, заботясь о стиле и выразительности написанного. Число дополнительных элементов конспекта должно быть логически обоснованным, записи должны распределяться в определенной последовательности, отвечающей логической структуре произведения. Для уточнения и дополнения необходимо оставлять поля.

Методические рекомендации при подготовке к коллоквиумам

Изучение основных разделов дисциплины «Клеточная инженерия» заканчивается проведением контрольных занятий, на которых обобщается весь материал по данной части учебной программы.

Коллоквиум представляет собой не только одну из форм текущего контроля, но и одну из активных форм учебных занятий, проводимых как в виде беседы преподавателя со студентами, так и в виде семинара, посвященного обсуждению определенной темы. Целями коллоквиума являются: выяснение у студентов знаний, их углубление (повышение) и закрепление по той или иной теме курса; формирование у студентов навыков анализа теоретических проблем на основе самостоятельного изучения учебной и научной литературы.

Основная задача коллоквиума – пробудить у студента стремление к чтению и использованию дополнительной литературы. На коллоквиум могут выносятся как проблемные (нередко спорные теоретические вопросы), так и вопросы, требующие самостоятельного изучения, а также более глубокой проработки.

Методические рекомендации по написанию научных текстов (проектов, научных статей и т.д.)

Перед тем, как приступить к написанию научного текста, важно разобраться, какова цель вашего научного исследования.

Объем текста и различные оформительские требования во многом зависят от принятых в конкретном учебном заведении порядков.

Проект - это самостоятельное исследование студентом определенной проблемы, комплекса взаимосвязанных вопросов.

Проект не должен состояться из фрагментов статей, монографий, пособий. Кроме простого изложения фактов и цитат, в Проекте должно проявляться авторское видение проблемы и ее решения.

Рассмотрим основные этапы подготовки Проекта студентом.

Выполнение Проекта начинается с выбора темы.

Затем студент приходит на первую консультацию к руководителю, которая предусматривает:

- обсуждение цели и задач работы, основных моментов избранной темы;
- консультирование по вопросам подбора литературы;
- составление предварительного плана.

Следующим этапом является работа с литературой. Необходимая литература подбирается студентом самостоятельно.

После подбора литературы целесообразно сделать рабочий вариант плана работы. В нем нужно выделить основные вопросы темы и параграфы, раскрывающие их содержание.

Составленный список литературы и предварительный вариант плана уточняются, согласуются на очередной консультации с руководителем.

Затем начинается следующий этап работы - изучение литературы. Только внимательно читая и конспектируя литературу, можно разобраться в основных вопросах темы и подготовиться к самостоятельному (авторскому) изложению содержания Проекта. Конспектируя первоисточники, необходимо отразить основную идею автора и его позицию по исследуемому вопросу, выявить проблемы и наметить задачи для дальнейшего изучения данных проблем.

Систематизация и анализ изученной литературы по проблеме исследования позволяют студенту написать работу.

Рабочий вариант текста Проекта предоставляется руководителю на проверку. На основе рабочего варианта текста руководитель вместе со студентом обсуждает возможности доработки текста, его оформление. После доработки Проект сдается на кафедру для его оценивания руководителем.

Требования к написанию Проекта

Написание 1 Проекта является обязательным условием выполнения плана СРС по любой дисциплине профессионального цикла.

Тема Проекта может быть выбрана студентом из предложенных в рабочей программе или фонде оценочных средств дисциплины, либо определена самостоятельно, исходя из интересов студента (в рамках изучаемой дисциплины). Выбранную тему необходимо согласовать с преподавателем.

Проект должен быть написан научным языком.

Объем Проекта должен составлять 10-15 стр.

Структура Проекта:

- Введение (не более 2-3 страниц). Во введении необходимо обосновать выбор темы, ее актуальность, очертить область исследования, объект исследования, основные цели и задачи исследования.

- Основная часть состоит из 2-3 разделов. В них раскрывается суть исследуемой проблемы, проводится обзор мировой литературы и источников Интернет по предмету исследования, в котором дается характеристика степени разработанности проблемы и авторская аналитическая оценка основных теоретических подходов к ее решению. Изложение материала не должно ограничиваться лишь описательным подходом к раскрытию выбранной темы. Оно также должно содержать собственное видение рассматриваемой проблемы и изложение собственной точки зрения на возможные пути ее решения.

• Заключение (1-2 страницы). В заключении кратко излагаются достигнутые при изучении проблемы цели, перспективы развития исследуемого вопроса

• Список использованной литературы (не меньше 10 источников), в алфавитном порядке, оформленный в соответствии с принятыми правилами. В список использованной литературы рекомендуется включать работы отечественных и зарубежных авторов, в том числе статьи, опубликованные в научных журналах в течение последних 3-х лет и ссылки на ресурсы сети Интернет.

• Приложение (при необходимости).

Требования к оформлению:

- текст с одной стороны листа;
- шрифт Times New Roman;
- кегль шрифта 14;
- межстрочное расстояние 1,5;
- поля: сверху 2,5 см, снизу – 2,5 см, слева - 3 см, справа 1,5 см;
- Проект должен быть представлен в сброшюрованном виде.

Порядок защиты Проекта:

Защита Проекта проводится на практических занятиях, после окончания работы студента над ним и исправления всех недочетов, выявленных преподавателем в ходе консультаций. На защиту Проекта отводится 5-7 минут времени, в ходе которого студент должен показать свободное владение материалом по заявленной теме. При защите Проекта приветствуется использование мультимедиа-презентации.

Оценка Проекта

Проект оценивается по следующим критериям:

- соблюдение требований к его оформлению;
- необходимость и достаточность для раскрытия темы приведенной в тексте Проекта информации;
- умение студента свободно излагать основные идеи, отраженные в Проекте;
- способность студента понять суть задаваемых преподавателем и сокурсниками вопросов и сформулировать точные ответы на них.

Критерии оценки:

Оценка «отлично» выставляется студенту, если в проекте студент исчерпывающе, последовательно, четко и логически стройно излагает материал; свободно справляется с задачами, вопросами и другими видами применения знаний; использует для написания проекта современные научные материалы; анализирует полученную информацию; проявляет самостоятельность при написании проекта.

Оценка «хорошо» выставляется студенту, если качество выполнения проекта достаточно высокое. Студент твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, не допуская существенных неточностей в ответе на вопросы по теме проекта.

Оценка «удовлетворительно» выставляется студенту, если материал проекта излагается частично, но пробелы не носят существенного характера, студент допускает неточности и ошибки при защите проекта, дает недостаточно правильные формулировки, наблюдаются нарушения логической последовательности в изложении материала.

Оценка «неудовлетворительно» выставляется студенту, если он не подготовил проект или допустил существенные ошибки. Студент неуверенно излагает материал проекта, не отвечает на вопросы преподавателя.

Описание шкалы оценивания

Максимально возможный балл за весь текущий контроль устанавливается равным 55. Текущее контрольное мероприятие считается сданным, если студент получил за него не менее 60% от установленного для этого контроля максимального балла.

Примерные темы докладов

1. История генетической инженерии: от открытия ДНК до CRISPR.
2. Структура и функции плазмид как векторов в генной инженерии.
3. Рестрикционные ферменты: классификация и применение.
4. Полимеразная цепная реакция (ПЦР): принципы и современные модификации.
5. Методы секвенирования ДНК: от Сангера до Nanopore.
6. CRISPR-Cas9: механизм действия и применение.
7. Альтернативные системы редактирования генома: TALEN и ZFN.
8. Базовое и прайм-редактирование: преимущества и ограничения.
9. Вирусные векторы в генной терапии: AAV, лентивирусы, ретровирусы.
10. Электропорация и микроинъекция: методы доставки генетического материала.
11. Синтетическая биология: создание искусственных геномов.
12. Генетическая модификация бактерий для биоремедиации.
13. Продуцирование биотоплива с помощью ГМ-микроорганизмов.
14. Генетически модифицированные дрожжи в пищевой промышленности.
15. Биосенсоры на основе ГМ-бактерий.
16. Создание ГМ-растений с устойчивостью к гербицидам.
17. Bt-растения: механизм действия и экологические риски.
18. Фитобиореакторы: производство вакцин в растениях.
19. Генетическая модификация фотосинтеза для повышения урожайности.
20. CRISPR-редактирование сельскохозяйственных культур: успехи и проблемы.
21. Трансгенные животные как модели человеческих заболеваний.
22. Генетически модифицированные рыбы: пример GloFish.
23. Создание животных-продуцентов фармацевтических белков.

24. Генетическое редактирование свиней для ксенотрансплантации.
25. Этические аспекты создания ГМ-животных.
26. Генная терапия наследственных заболеваний: успехи и провалы.
27. CAR-T-клеточная терапия: принципы и клиническое применение.
28. Редактирование генома для лечения ВИЧ.
29. Генетическая инженерия против старения: современные подходы.
30. Персонализированная медицина на основе геномного редактирования.
31. Международное регулирование ГМО: сравнение подходов в США, ЕС и Китае.
32. Этические дилеммы редактирования зародышевой линии человека.
33. «Дизайнерские дети»: научные возможности и моральные границы.
34. Риски горизонтального переноса генов от ГМО к диким видам.
35. Общественное восприятие ГМО: мифы и реальность.
36. Биофармацевтика: производство инсулина с помощью ГМ-бактерий.
37. Генетическая инженерия в производстве ферментов для промышленности.
38. Синтетическая биология и создание искусственных органов.
39. ГМ-микроорганизмы в космической биологии.
40. Биологическое оружие: риски misuse генетических технологий.
41. Молекулярные ножницы нового поколения: CRISPR-Cas12/Cas13.
42. ДНК-компьютеры: использование биомолекул для вычислений.
43. Генетическая память: запись информации в ДНК клеток.
44. Искусственные геномы: проект «Геном человека 2.0».
45. КриоАРХИВ: использование ДНК для хранения данных.
46. Генетическая инженерия насекомых для борьбы с малярией.
47. Редактирование генома митохондриальной ДНК.
48. Эпигенетическое редактирование: методы и перспективы.
49. Генетически модифицированные грибы в сельском хозяйстве.
50. Генетическая инженерия и изменение климата: возможные решения.

Вопросы для самоконтроля

1. Клонирование фрагментов ДНК. Общая характеристика процесса.
2. Основные этапы эксперимента по клонированию целевого (заданного) фрагмента ДНК.
3. Рестриктазы (эндонуклеазы рестрикции). Механизм и специфичность действия. Биологическая роль.
4. Классификация и номенклатура рестриктаз. Изошизомеры. Гетерошизомеры.
5. ДНК-лигазы. Механизм действия, биологическая роль. Применение в генной инженерии.
6. ДНК-зависимые ДНК-полимеразы. Источники, свойства ферментов, применение.
7. Источники фрагментов ДНК для клонирования.
8. Синтез целевого фрагмента ДНК для клонирования методом ПЦР.
9. кДНК. Особенности структуры. Синтез *in vitro*.
10. Методы объединения фрагментов ДНК.
11. Векторы для клонирования. Требования, предъявляемые к векторным молекулам.
12. Направленное встраивание клонируемого фрагмента в вектор. Выбор рестриктаз.
13. Способы введения рекомбинантных ДНК в реципиентные клетки.
14. Природная и искусственная компетентность клеток прокариот. Трансформация бактериальных клеток.
15. Методы поиска (скрининга) клонов, несущих целевой фрагмент ДНК.
16. Скрининг клонов методом гибридизации нуклеиновых кислот.
17. Прямая селекция рекомбинантных клонов по комплементации.
18. Иммунологический метод скрининга клонов.
19. Клонотеки геномной ДНК и кДНК. Подходы к созданию. Репрезентативность клонотеки.
20. Векторы для клонирования фрагментов ДНК в клетках *E. coli*. Классификация. Основные структурные элементы.
21. Плазмиды. Структура, свойства, биологическая роль.
22. Свойства бактериальных плазмид, используемые при конструировании векторов.
23. Плазмидные векторы для клонирования в клетках *E. coli*.
24. Фаг λ . Структура генома. Жизненный цикл.
25. Векторы на основе генома фага λ . Применение.
26. Космиды. Особенности структуры. Применение в генной инженерии.
27. Фагмиды. Особенности структуры. Применение в генной инженерии.
28. Фаг M13. Особенности строения. Жизненный цикл.
29. Векторы на основе генома фага M13. Применение.
30. Принципы выбора вектора для клонирования определенных фрагментов ДНК.
31. Синтез чужеродных белков в клетках *E. coli*. Проблемы и подходы.
32. Векторы для экспрессии генов в клетках *E. coli*. Структурные элементы. Примеры.

33. Факторы, оказывающие влияние на экспрессию рекомбинантных генов в бактериальных клетках.
34. Сайт-направленный мутагенез. Методы.
35. Векторы для клонирования и экспрессии генов в клетках дрожжей.
36. Трансгенные растения. Основные этапы получения трансгенных культур.
37. Методы трансформации растений.
38. Агробактериальная трансформация растений, основные этапы.
39. Ti-плазмиды агробактерий. Структура. Векторы на их основе.
40. Применение маркерных генов в отборе трансгенных растений.
41. Безмаркерные трансгенные растения, методы получения.
42. Методы введения трансгенных конструкций в культивируемые клетки млекопитающих.
43. Векторы на основе вирусов животных. Принципы конструирования.
44. Трансгенные животные. Способы получения.
45. Генная терапия. Общая характеристика. Подходы.
46. Векторы для доставки фрагментов ДНК и РНК при генной терапии.
47. Проблемы безопасности при работе с рекомбинантными ДНК и при создании трансгенных организмов.
48. Использование достижений генной инженерии в биотехнологии, сельском хозяйстве, промышленности и медицине.

Литература:

Перечень основной литературы:

1. Якупов, Т. Р. Молекулярная биотехнология : учебник для вузов / Т. Р. Якупов, Т. Х. Фаизов. — 4-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2025. — 160 с. — ISBN 978-5-507-53208-7. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/478241>
2. Резяпкин, В. И. Генная инженерия: практикум : учебное пособие / В. И. Резяпкин. — 7-е изд., перераб. — Гродно : ГрГУ им. Янки Купалы, 2024. — 65 с. — ISBN 978-985-582-603-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/433241>

Перечень дополнительной литературы:

1. Тузова, Р. В. Молекулярно-генетические механизмы эволюции органического мира. Генетическая и клеточная инженерия / Р. В. Тузова, Н. А. Ковалев. — Минск : Белорусская наука, 2010. — 395 с. — ISBN 978-985-08-1186-8. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/90451>
2. Генетические основы селекции растений : монография : в 4 томах. — Минск : Белорусская наука, [б. г.]. — Том 4 : Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия — 2014. — 653 с. — ISBN 978-985-08-1791-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/90618>
3. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия : учебно-справочное пособие / С. Н. Щелкунов. — Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2017. — 514 с. — ISBN 978-5-379-02024-8. — Текст : электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART : [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/65273.html>
4. Кизиченко, Н. В. Молекулярная биология : учебник с упражнениями и задачами / Н. В. Кизиченко, А. Г. Жукова, Л. Г. Горохова. — Москва ; Берлин : Директ-Медиа, 2018. — 267

с. : ил., табл. – Режим доступа: по подписке. – URL:
<https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=488606>