

**Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)»**

УТВЕРЖДЕНО

**Директор физтех-школы физики
и исследований им. Ландау**

А.В. Рогачев

Рабочая программа дисциплины (модуля)

по дисциплине:	Современные методы генетической инженерии, геномное редактирование, метаболическая инженерия
по направлению:	Прикладные математика и физика
профиль подготовки:	Общая и прикладная физика Физтех-школа физики и исследований им. Ландау кафедра биофизики
курс:	1
квалификация:	магистр

Семестр, формы промежуточной аттестации: 1 (осенний) - Экзамен

Аудиторных часов: 30 всего, в том числе:

лекции: 30 час.

семинары: 0 час.

лабораторные занятия: 0 час.

Самостоятельная работа: 30 час.

Подготовка к экзамену: 30 час.

Всего часов: 90, всего зач. ед.: 2

Количество контрольных работ, заданий: 2

Программу составили:

И.В. Манухов, д-р биол. наук

С.В. Баженов, канд. биол. наук

С.В. Машко

Программа обсуждена на заседании кафедры биофизики 21.01.2025

Аннотация

Генетическая инженерия - методологическая основа всех отраслей современной генной инженерии и биотехнологии, которые в настоящее время успешно применяются для создания искусственных организмов и живых систем, производящих множество практически полезных химических соединений и используемых макромолекул, например, в промышленности и медицине. Это синтетическая дисциплина, являющаяся методологическим приложением молекулярной генетики. В текущем курсе будут представлены наиболее актуальные методы конструирования рекомбинантной ДНК, начиная с полимеразной цепной реакции и модификации бактериальных плазмид, используемых в качестве векторов, с примерами используемых в этих целях в лабораториях коммерчески доступных ферментов и заканчивая современными подходами к редактированию генома про- и эукариотических клеток, основанные на рекомбинации и CRISPR/Cas методологии. Генетическая инженерия позволяет осуществлять метаболическую инженерию - направленное изменение метаболизма для создания искусственных продуцентов практически важных биологических соединений и молекул для их промышленного производства.

1. Цели и задачи

Цель дисциплины

- формирование и совершенствование компетенций студентов в области генетической инженерии, ознакомление с современными подходами к геномному редактированию и метаболической инженерии.

Задачи дисциплины

- Знакомство обучающихся с общими принципами и современными методами конструирования рекомбинантной ДНК.
- обучение современным подходам к редактированию генома про- и эукариотических клеток, основанным на направленной гомологичной рекомбинации.
- введение в метаболическую инженерию, обучение подходам к конструированию продуцентов клеточных метаболитов, и к разработке технологий биосинтеза метаболитов для современного производства.

2. Перечень формируемых компетенций

Освоение дисциплины направлено на формирование следующих компетенций:

Код и наименование компетенции	Индикаторы достижения компетенции
УК-1 Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, вырабатывать стратегию действий	УК-1.1 Анализирует проблемную ситуацию как систему, выявляя ее составляющие и связи между ними
	УК-1.2 Осуществляет поиск вариантов решения поставленной проблемной ситуации на основе доступных источников информации
	УК-1.3 Разрабатывает стратегию достижения поставленной цели как последовательность шагов, предвидя результат каждого из них и оценивая их влияние на внешнее окружение планируемой деятельности и на взаимоотношения участников этой деятельности
УК-4 Способен применять современные коммуникативные технологии, в том числе на иностранном(ых) языке(ах), для академического и профессионального взаимодействия	УК-4.1 Способен вести обмен деловой информацией в устной и письменной формах на государственном языке Российской Федерации и не менее чем на одном иностранном языке
	УК-4.3 Способен представлять результаты академической и профессиональной деятельности на различных научных мероприятиях, включая международные
	УК-4.4 Способен использовать современные средства информационно-коммуникационных технологий для академического и профессионального взаимодействия

ОПК-1 Владеет системой фундаментальных научных знаний в области физико-математических наук	ОПК-1.1 Знает и способен использовать в профессиональной деятельности фундаментальные научные знания в области физико-математических наук
	ОПК-1.2 Способен обобщать и критически оценивать опыт и результаты научных исследований в области профессиональной деятельности
ОПК-2 Имеет представление об актуальных проблемах науки и техники в области своей профессиональной деятельности, способен на научном языке формулировать профессиональные задачи	ОПК-2.1 Имеет представление о современном состоянии исследований в рамках тематической области своей профессиональной деятельности
	ОПК-2.2 Способен оценивать актуальность исследований в области своей профессиональной деятельности и их практическую значимость
	ОПК-2.3 Владеет профессиональной терминологией, используемой в современной научно-технической литературе, обладает навыками устного и письменного изложения результатов научной деятельности в рамках профессиональной коммуникации
ОПК-3 Способен выбирать и (или) разрабатывать подходы к решению типовых и новых задач в области профессиональной деятельности, учитывая особенности и ограничения различных методов решения	ОПК-3.1 Способен анализировать задачу, планировать пути решения, предлагать и комбинировать способы решения
	ОПК-3.2 Способен использовать исследовательские методы при решении новых задач, применяя знания в различных областях науки (техники)
	ОПК-3.3 Владеет аналитическими и вычислительными методами решения, понимает и учитывает на практике границы применимости получаемых решений
ОПК-4 Способен успешно реализовывать решение поставленной задачи, провести анализ результата и представить выводы, применяя знания и навыки в области физико-математических наук и информационно-коммуникационных технологий	ОПК-4.1 Способен применять знания и навыки по использованию информационно-коммуникационных технологий для поиска и изучения научной литературы, применения прикладных программных продуктов
	ОПК-4.2 Способен применять знания в области физико-математических наук для решения поставленной задачи, формулирования выводов и оценки полученных результатов
	ОПК-4.3 Способен аргументировано выбирать способ проведения научного исследования
ПК-1 Способен ставить, формализовывать и решать задачи, в том числе разрабатывать и исследовать математические модели изучаемых явлений и процессов, системно анализировать научные проблемы, получать новые научные результаты	ПК-1.1 Способен находить, анализировать и обобщать информацию об актуальных результатах исследований в рамках тематической области своей профессиональной деятельности
	ПК-1.3 Способен применять теоретические и (или) экспериментальные методы исследований к конкретной научной задаче и интерпретировать полученные результаты
ПК-3 Способен профессионально работать с исследовательским и испытательным оборудованием (приборами и установками, специализированными пакетами прикладных программ) в избранной предметной области	ПК-3.1 Понимает принципы работы используемого оборудования (специализированных пакетов прикладных программ)
	ПК-3.2 Способен проводить эксперимент (моделирование) с использованием исследовательского оборудования (пакетов прикладных программ)
	ПК-3.3 Способен оценивать точность полученных экспериментальных (численных) результатов

3. Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине (модулю)

В результате освоения дисциплины обучающиеся должны знать:

- общие принципы конструирования рекомбинантной ДНК
- инструменты и приемы, используемые в современной генетической инженерии
- современные подходы к редактированию генома на примере ZFN, TALEN и CRISPR/Cas систем

уметь:

- применять методы конструирования рекомбинантной ДНК для решения фундаментальных профессиональных задач;
- творчески использовать в научной деятельности знания о редактировании генома, основанном на рекомбинации и CRISPR / Cas методологии;
- выделять и систематизировать основные идеи в научных текстах;
- критически оценивать любую поступающую информацию, вне зависимости от источника;
- генерировать новые идеи и методические решения;
- осуществлять проектирование своей научной деятельности;
- представлять свои научные результаты в устных докладах.

владеть:

- методами теоретического и экспериментального исследования;
- навыками поиска (в том числе с использованием информационных систем и баз данных), обработки, анализа и систематизации информации;
- навыками критического анализа и оценки современных научных достижений.

4. Содержание дисциплины (модуля), структурированное по темам (разделам) с указанием отведенного на них количества академических часов и видов учебных занятий

4.1. Разделы дисциплины (модуля) и трудоемкости по видам учебных занятий

№	Тема (раздел) дисциплины	Трудоемкость по видам учебных занятий, включая самостоятельную работу, час.			
		Лекции	Семинары	Лаборат. работы	Самост. работа
1	Введение	2			2
2	Конструирование гибридных молекул ДНК	2			2
3	Конструирование гибридных молекул ДНК. Мутагенез	2			2
4	Геномное редактирование прокариотических клеток	2			2
5	Геномное редактирование эукариотических клеток	2			2
6	Методы секвенирования	2			2
7	Метаболическая инженерия (МИ)	2			2
8	Этапы развития МИ. Точность МИ	2			2
9	Системы МИ	2			2
10	Геномика, транскриптомика и протеомика для метаболомики	2			2
11	Флюксомика	2			2
12	Применение 13C-MFA для медицинских аппаратов	2			2
13	Индукционный и динамический контроль	2			2
14	Успехи МИ	2			2
15	Доклады студентов, консультация перед экзаменом	2			2
Итого часов		30			30
Подготовка к экзамену		30 час.			

Общая трудоёмкость	90 час., 2 зач.ед.
--------------------	--------------------

4.2. Содержание дисциплины (модуля), структурированное по темам (разделам)

Семестр: 1 (Осенний)

1. Введение

Предмет генетической инженерии. Нуклеиновые кислоты (НК). Центральная догма молекулярной биологии. Основные типы ферментов, используемых в генетической инженерии. История развития генетической инженерии. Основы клонирования. Клонирование генов. Маркеры положительной и отрицательной селекции.

2. Конструирование гибридных молекул ДНК

Сборка гибридных ДНК in vitro с использованием отдельных ферментов и их смесей (напр. In-fusion, Gibson Assembly, GoldenGate). Концепция BioBricks. Методы сборки гибридных ДНК с использованием гомологичной рекомбинации в клетках.

3. Конструирование гибридных молекул ДНК. Мутагенез

Внесение точечных мутаций в плазмидные конструкции с помощью ПЦР. Синтез последовательностей ДНК de novo. Спонтанный и индуцированный мутагенез. Мутагены. Мутагенез и селекция. Транспозонный мутагенез.

4. Геномное редактирование прокариотических клеток

Редактирование генома бактерий с использованием гомологичной рекомбинации. Lambda red рекомбинация для повышения эффективности геномного редактирования энтеробактерий. Использование маркеров положительной селекции для геномного редактирования. Точечное редактирование бактериальной хромосомы. Гомологичная рекомбинация с доставкой ДНК в составе мобилизуемого суицидального вектора pKпоск. Трансдукция.

5. Геномное редактирование эукариотических клеток

Мутагенез в эукариотических клетках. CRISPR-Cas9, TALENs, ZFN и мегануклеазы – нуклеазы для геномной инженерии эукариот.

6. Методы секвенирования

Технологии секвенирования ДНК: 1 поколение (метод Сэнгера);
2 поколение (Illumina, Ion Torrent, 454GS FLX и SOLiD 5500xl);
3 поколение (PacBio, Oxford Nanopore).

7. Метаболическая инженерия (МИ)

Метаболическая инженерия как инструмент получения микробов с желаемыми свойствами.

8. Этапы развития МИ. Точность МИ

Три этапа развития МИ (краткое описание и отличительные особенности, примеры достижений на отдельных этапах).

9. Системы МИ

Системы МИ (краткие характеристики компонентов, принципиальное отличие от прецизионной МИ, цикличность исследования).

10. Геномика, транскриптомика и протеомика для метаболомики

Технологии X-omics: Геномика, Транскриптомика, Протеомика, Метаболомика - суть «постгеномных» методов, полученные результаты, успешные примеры использования для решения задач МИ.

11. Флюксомика

Почему флюксомику часто называют квинтэссенцией всех других технологий X-omics. FBA и 13C-MFA - общность математического аппарата квазистационарного решения стехиометрических уравнений и различие в использовании моделей, приближений и экспериментальных данных, а значит, и результатов.

12. Применение 13C-MFA для медицинских аппаратов

Принципы 13C-MFA и результаты, полученные для разработки экспериментальной стратегии и анализа результатов МИ.

13. Индукционный и динамический контроль

Регулируемое культивирование - сходства и различия между индуцибельной экспрессией и «динамическим метаболическим контролем».

14. Успехи МИ

К 30-летию МИ в 2021 году - примеры выдающихся успехов (создание продуцентов аа, 1,3-пропандиола, 7-ADCA, 1,4-бутандиола, артемизинина, изобутанола).

15. Доклады студентов, консультация перед экзаменом

Студенческие доклады по материалам научных публикаций о последних достижениях генетической инженерии. Консультация по материалам курса перед экзаменом.

5. Описание материально-технической базы, необходимой для осуществления образовательного процесса по дисциплине (модулю)

1. Учебная аудитория с медиапроектором и экраном, доступом в сеть Интернет.
2. Необходимое программное обеспечение.
3. Обеспечение самостоятельной работы - базы данных по журналам.

6. Перечень рекомендуемой литературы

Основная литература

1. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition). Sambrook J., Russell D.W. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2000.
2. Lee S. Y., Lee D. Y., Kim T. Y. Systems biotechnology for strain improvement //Trends in biotechnology. – 2005. – Т. 23. – №. 7. – С. 349-358.
3. Goldberg I., Rokem J. S., Pines O. Organic acids: old metabolites, new themes //Journal of Chemical Technology and Biotechnology. – 2006. – Т. 81. – №. 10. – С. 1601-1611.
4. Magnuson J. K., Lasure L. L. Organic acid production by filamentous fungi //Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine. – Springer US, 2004. – С. 307-340.
5. Leuchtenberger W., Huthmacher K., Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects //Applied Microbiology and Biotechnology. – 2005. – Т. 69. – №. 1. – С. 1-8.
6. Esaki N. et al. Enzymology of amino acid production //Biotechnology Set, Second Edition. – 1996. – С. 503-560.

Дополнительная литература

1. Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка, Электронная версия печатной публикации / А. С. Спирин. — Москва, Лаборатория знаний, 2019
2. Генетика с основами селекции, учебник для студентов высших учебных заведений /С. Г. Инге-Вечтомов. Санкт-Петербург, Изд-во Н-Л, 2015
3. Льюин Б., «Гены», изд. Бином: Лаборатория знаний, 2012.
4. Brakmann S., Johnsson K. Directed molecular evolution of proteins. – Wiley-VCH, 2002.
5. Georgiou G. Directed evolution library creation. – Totowa, New Jersey : Humana Press, 2003.
6. de Winde H. Functional genetics of industrial yeasts; of ancient skills and modern applications. – Springer Berlin Heidelberg, 2003. – С. 1-16.
7. Reymond J. L., Babiak P. Screening systems //White biotechnology. – Springer Berlin Heidelberg, 2007. – С. 31-58.
8. Hilterhaus L., Liese A. Building blocks //White biotechnology. – Springer Berlin Heidelberg, 2007. – С. 133-173.
9. Kamm B., Kamm M. Biorefineries—multi product processes //White Biotechnology. – Springer Berlin Heidelberg, 2007. – С. 175-204.
10. Kuchner O., Arnold F. H. Directed evolution of enzyme catalysts //Trends in biotechnology. – 1997. – Т. 15. – №. 12. – С. 523-530.
11. Завильгельский Г.Б., Манухов И.В. Генетическая инженерия. – М.: изд. МФТИ, 2012.
12. Ishino, S.; Ishino, Y. DNA polymerases as useful reagents for biotechnology - The history of developmental research in the field. Front. Microbiol. 2014, 5, 465, doi:10.3389/FMICB.2014.00465.
13. Martín-Alonso, S.; Frutos-Beltrán, E.; Menéndez-Arias, L. Reverse Transcriptase: From Transcriptomics to Genome Editing. Trends Biotechnol. 2021, 39, 194–210, doi:10.1016/j.tibtech.2020.06.008.
14. Völler, J.S. Enhancing DNA sequencing. Nat. Catal. 2018 17 2018, 1, 481–481, doi:10.1038/s41929-018-0120-7.
15. Rosano, G.L.; Ceccarelli, E.A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. Front. Microbiol. 2014, 5, 172, doi:10.3389/FMICB.2014.00172.
16. Gavrilov, M.; Yang, J.Y.C.; Zou, R.S.; Ma, W.; Lee, C.Y.; Mohapatra, S.; Kang, J.; Liao, T.W.; Myong, S.; Ha, T. Engineered helicase replaces thermocycler in DNA amplification while retaining desired PCR characteristics. Nat. Commun. 2022 131 2022, 13, 1–14, doi:10.1038/s41467-022-34076-0.
17. Hughes, R.A.; Ellington, A.D. Synthetic DNA Synthesis and Assembly: Putting the Synthetic in Synthetic Biology. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2017, 9, doi:10.1101/CSHPERSPECT.A023812.
18. Cain, A.K.; Barquist, L.; Goodman, A.L.; Paulsen, I.T.; Parkhill, J.; van Opijnen, T. A decade of advances in transposon-insertion sequencing. Nat. Rev. Genet. 2020 219 2020, 21, 526–540, doi:10.1038/s41576-020-0244-x.

7. Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети "Интернет", необходимых для освоения дисциплины (модуля)

NCBI, molbiol.ru, PDB, swissprot.

8. Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса по дисциплине (модулю), включая перечень необходимого программного обеспечения и информационных справочных систем (при необходимости)

При подготовке и проведении лекционных занятий используется сеть интернет.
Кроме того, используется Libre Office, а также графический пакет Ink Scape.

9. Методические указания для обучающихся по освоению дисциплины (модуля)

Студент, изучающий дисциплину, должен, с одной стороны, овладеть общим понятийным аппаратом, а с другой стороны, должен научиться применять теоретические знания на практике. В результате изучения дисциплины студент должен знать основные определения и понятия, уметь применять полученные знания для решения различных задач.

Успешное освоение курса требует:

- посещения всех занятий, предусмотренных учебным планом по дисциплине;
- ведения конспекта занятий;
- напряжённой самостоятельной работы студента.

Самостоятельная работа включает в себя:

- чтение рекомендованной литературы;
- проработку учебного материала, подготовку ответов на вопросы, предназначенных для самостоятельного изучения;
- решение задач, предлагаемых студентам на занятиях;
- подготовку к выполнению заданий промежуточной аттестации.

Показателем владения материалом служит умение без конспекта отвечать на вопросы по темам дисциплины.

Важно добиться понимания изучаемого материала, а не механического его запоминания. При затруднении изучения отдельных тем, вопросов, следует обращаться за консультациями к преподавателю.

Возможен промежуточный контроль знаний студентов в виде решения задач в соответствии с тематикой занятий.

ОЦЕНОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ПО ДИСЦИПЛИНЕ (МОДУЛЮ)

по направлению: Прикладные математика и физика
профиль подготовки: Общая и прикладная физика
Физтех-школа физики и исследований им. Ландау
кафедра биофизики
курс: 1
квалификация: магистр

Семестр, формы промежуточной аттестации: 1 (осенний) - Экзамен

Разработчики:

И.В. Манухов, д-р биол. наук
С.В. Баженов, канд. биол. наук
С.В. Машко

1. Компетенции, формируемые в процессе изучения дисциплины

Код и наименование компетенции	Индикаторы достижения компетенции
УК-1 Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, вырабатывать стратегию действий	УК-1.1 Анализирует проблемную ситуацию как систему, выявляя ее составляющие и связи между ними
	УК-1.2 Осуществляет поиск вариантов решения поставленной проблемной ситуации на основе доступных источников информации
	УК-1.3 Разрабатывает стратегию достижения поставленной цели как последовательность шагов, предвидя результат каждого из них и оценивая их влияние на внешнее окружение планируемой деятельности и на взаимоотношения участников этой деятельности
УК-4 Способен применять современные коммуникативные технологии, в том числе на иностранном(ых) языке(ах), для академического и профессионального взаимодействия	УК-4.1 Способен вести обмен деловой информацией в устной и письменной формах на государственном языке Российской Федерации и не менее чем на одном иностранном языке
	УК-4.3 Способен представлять результаты академической и профессиональной деятельности на различных научных мероприятиях, включая международные
	УК-4.4 Способен использовать современные средства информационно-коммуникационных технологий для академического и профессионального взаимодействия
ОПК-1 Владеет системой фундаментальных научных знаний в области физико-математических наук	ОПК-1.1 Знает и способен использовать в профессиональной деятельности фундаментальные научные знания в области физико-математических наук
	ОПК-1.2 Способен обобщать и критически оценивать опыт и результаты научных исследований в области профессиональной деятельности
ОПК-2 Имеет представление об актуальных проблемах науки и техники в области своей профессиональной деятельности, способен на научном языке формулировать профессиональные задачи	ОПК-2.1 Имеет представление о современном состоянии исследований в рамках тематической области своей профессиональной деятельности
	ОПК-2.2 Способен оценивать актуальность исследований в области своей профессиональной деятельности и их практическую значимость
	ОПК-2.3 Владеет профессиональной терминологией, используемой в современной научно-технической литературе, обладает навыками устного и письменного изложения результатов научной деятельности в рамках профессиональной коммуникации
ОПК-3 Способен выбирать и (или) разрабатывать подходы к решению типовых и новых задач в области профессиональной деятельности, учитывая особенности и ограничения различных методов решения	ОПК-3.1 Способен анализировать задачу, планировать пути решения, предлагать и комбинировать способы решения
	ОПК-3.2 Способен использовать исследовательские методы при решении новых задач, применяя знания в различных областях науки (техники)
	ОПК-3.3 Владеет аналитическими и вычислительными методами решения, понимает и учитывает на практике границы применимости получаемых решений
ОПК-4 Способен успешно реализовывать решение поставленной задачи, провести	ОПК-4.1 Способен применять знания и навыки по использованию информационно-коммуникационных технологий для поиска и изучения научной литературы, применения прикладных программных продуктов

анализ результата и представить выводы, применяя знания и навыки в области физико-математических наук и информационно-коммуникационных технологий	ОПК-4.2 Способен применять знания в области физико-математических наук для решения поставленной задачи, формулирования выводов и оценки полученных результатов
	ОПК-4.3 Способен аргументировано выбирать способ проведения научного исследования
ПК-1 Способен ставить, формализовывать и решать задачи, в том числе разрабатывать и исследовать математические модели изучаемых явлений и процессов, системно анализировать научные проблемы, получать новые научные результаты	ПК-1.1 Способен находить, анализировать и обобщать информацию об актуальных результатах исследований в рамках тематической области своей профессиональной деятельности
	ПК-1.3 Способен применять теоретические и (или) экспериментальные методы исследований к конкретной научной задаче и интерпретировать полученные результаты
ПК-3 Способен профессионально работать с исследовательским и испытательным оборудованием (приборами и установками, специализированными пакетами прикладных программ) в избранной предметной области	ПК-3.1 Понимает принципы работы используемого оборудования (специализированных пакетов прикладных программ)
	ПК-3.2 Способен проводить эксперимент (моделирование) с использованием исследовательского оборудования (пакетов прикладных программ)
	ПК-3.3 Способен оценивать точность полученных экспериментальных (численных) результатов

2. Показатели оценивания компетенций

В результате изучения дисциплины «Современные методы генетической инженерии, геномное редактирование, метаболическая инженерия» обучающийся должен:

знать:

- общие принципы конструирования рекомбинантной ДНК
- инструменты и приемы, используемые в современной генетической инженерии
- современные подходы к редактированию генома на примере ZFN, TALEN и CRISPR/Cas систем

уметь:

- применять методы конструирования рекомбинантной ДНК для решения фундаментальных профессиональных задач;
- творчески использовать в научной деятельности знания о редактировании генома, основанном на рекомбинации и CRISPR / Cas методологии;
- выделять и систематизировать основные идеи в научных текстах;
- критически оценивать любую поступающую информацию, вне зависимости от источника;
- генерировать новые идеи и методические решения;
- осуществлять проектирование своей научной деятельности;
- представлять свои научные результаты в устных докладах.

владеть:

- методами теоретического и экспериментального исследования;
- навыками поиска (в том числе с использованием информационных систем и баз данных), обработки, анализа и систематизации информации;
- навыками критического анализа и оценки современных научных достижений.

3. Перечень типовых (примерных) вопросов, заданий, тем для подготовки к текущему контролю

Примеры тем курсовых работ/рефератов:

1. Получение мутаций с помощью системы CRISPR / Cas9
2. Эпистемологические корни и структурные компоненты биоинженерии.
3. Метаболическая инженерия - рождение и эволюция термина, современное определение.
4. К 30-летию МЭ в 2021 году - примеры выдающихся успехов (создание продуцентов аа, 1,3-пропандиола, 7-ADCA, 1,4-бутандиола, артемизинина, изобутанола)
5. Достижения в области генетического отбора продуцентов аминокислот.

4. Перечень типовых (примерных) вопросов и тем для проведения промежуточной аттестации обучающихся

Перечень контрольных вопросов:

1. Предмет генной инженерии, центральная догма молекулярной биологии
2. Конструирование гибридных плазмид, общие принципы с примерами конкретных методов.
3. Гомологичная рекомбинация ДНК, способы геномного редактирования с использованием гомологичной рекомбинации.
4. Секвенирование ДНК. Области применимости методов секвенирования 1, 2 и 3 поколений.
5. Химерные белки, различия агрегации белков и олигомеризации.
6. Методы секвенирования
7. Метаболическая инженерия (МИ)
8. Этапы развития МИ. Точность МИ
9. Системы МИ
10. Геномика, транскриптомика и протеомика для метаболомики
11. Флюксомика

Экзаменационные билеты:

1

Предмет генетической инженерии.

Ферменты, используемые в генетической инженерии.

Системы рестрикции –модификации.

РНК-полимеразы. ДНК-полимеразы.

Щелочная фосфатаза и полинуклеотидкиназа

Нуклеазы

Топоизомераза

ДНК-лигаза

2

Репликация, транскрипция, трансляция: основные отличия у про- и эукариот.

Автономные единицы репликации (плазмиды, бактериофаги, хромосомы). Репликоны.

Несовместимость плазмид. Мобилизация плазмид.

Маркеры, используемые для селекции.

3

Разделение фрагментов ДНК с помощью электрофореза в агарозном и полиакриламидном гелях.

Принцип амплификации фрагментов ДНК с помощью ПЦР.

Клонирование фрагментов, полученных ПЦР. Клонирование в Т-вектор.

Спонтанный мутагенез. Основные типы повреждения ДНК.

Системы репарации ДНК бактерий на примере *E. coli*.

4

Гомологичная рекомбинация ДНК.

Сайт-направленный мутагенез.

Получение мутаций в хромосоме *E. coli*. Применяемые маркеры селекции.

5

Концепция BioBricks. Методы сборки гибридных ДНК: In-fusion, LIC, TEDA, TPA, EFC, PIPE, MOE-PCR, Hot fusion, NEBuilder, DATEL, CPEC, SLIC, SLiCE, USER, Gibson Assembly, гомологичная рекомбинация в клетках.

6

Получение мутаций с помощью CRISPR/Cas9 системы.

Трансляция у бактерий и эукариот.

Пост-трансляционный уровень регуляции активности белков.

Трансфекция.

7

Гносеологические корни и структурные компоненты биоинженерии. Взаимосвязь между отдельными компонентами.

В чем специфические особенности ^{13}C -MFA в случае проведения параллельных экспериментов (PLE вместо SLE), различающихся меченностью исходного субстрата.

8

Метаболическая инженерия – рождение и эволюция термина, современное определение; фундаментальная направленность исследований и их практическая значимость. Этапы развития, их сущность, методологическая основа и принципиальные различия.

Каковы перспективы анализа «кинетики» изменения потоков в ходе проведения культивирования микроорганизмов? Успешные примеры использования ^{13}C -MFA в современной метаболической инженерии.

9

К тридцатилетию МИ в 2021 г. – примеры выдающихся успехов (создание продуцентов АК, 1,3-пропандиол, 7-ADCA, 1,4-бутандиол, артеминизин, изо-бутанол).

Почему Флюксомику часто рассматривают как «Вершину» всех современных X-омных технологий. Что является результатом расчета современных Fitting программ в ^{13}C -MFA, что дает расчет дизайна эксперимента, доверительных интервалов для значений потоков?

10

Аминокислоты – традиционный продукт биотехнологии и «target» для МИ. Успехи генетической селекции продуцентов аминокислот. Сложности и основные современные пути создания штаммов-продуцентов АК.

Анализ статистики решения задачи потоков. Принципы использования метода Монте-Карло для установления доверительных интервалов с отсечением определенного числа квантилей для определения 95%-ного или 68%-ного доверительного уровня.

11

В чем принципиальное различие в раннем и современном использовании методов Мутагенеза и селекции. Понятия Обратной/Инвертированной (Inverse) МИ и Обратной генетики.

Эксперимент в ^{13}C -MFA: ЯМР и GC-MS, LC-MS/MS. Возможности и перспективы использования для решения стационарных задач на основе анализа АК и метаболитов.

12

Современные методы мутагенеза (MAGE, TRMR, Global transcriptional engineering, etc.). Необходимость развития и значимость HT (high-throughput)-based подходов для современной МИ.

Теоретические подходы к экспериментальному определению значений потоков, характеризующих предложенную модель, включающую стехиометрию всех реакций и перестановки атомов углерода. Понятие изотопомера.

13

В чем принципиальное и методологическое различие в подходах, использованных для создания продуцентов 1,3-пропандиола и 1,4-бутандиола.

Методы моделирования распределения ^{13}C атомов углерода из молекул исходного субстрата во внутриклеточные метаболиты и протеиногенные АК (АММ, IMM, кумомеры, EMU). Доступное компьютерное программное обеспечение (13CFLUX, Metran, OpenFLUX, OpenFLUX2).

14

На чем основаны возможности создания разнообразных видов биотоплива с использованием микробных продуцентов.

Основные принципы стационарного ^{13}C -MFA. Стехиометрические модели метаболизма от «коровой» до «полно-геномной». Общая схема эксперимента по ^{13}C -MFA. Экспериментальные и теоретические этапы. Стационарное приближение ^{13}C -MFA – возможность использования «протеиногенных» аминокислот для получения информации о метаболических потоках.

15

Что такое «эволюция белков» и как проводить подобные эксперименты.

Два принципиально различных направления исследований современной Флюксомики – FBA и ^{13}C -MFA – условно, «теоретический» и «экспериментальный» подходы. Общие принципы. Теоретическая неразрешимость обратимых, циклических и пр. реакций в рамках FBA.

16

Какие факторы лежат в основе решения о создании (модернизации) штамма-продуцента нового или уже известного продукта методами МИ с целью его использования в новом (или уже действующем) промышленном производстве.

Системная биология – определение понятия и методы исследования. Примеры использования методов системной биологии в современной МИ (как минимум по одному примеру исследований по МИ, в которых основа стратегии опиралась на информацию, полученную одной из X-омных технологий).

17

Какие важнейшие научно-методические и организационные подходы были разработаны и апробированы при создании продуцентов артемизининовой кислоты и затем артемизинина, и какова была благотворительная инициатива авторов препарата.

Анализ метаболитов. Виды современного «Метаболомного» анализа. Принципиальная сложность получения достоверных результатов. Приборы и методы, используемые для анализа метаболитов; основные проблемы и достижения Metabolomics. Важность пробоподготовки.

18

Какова принципиальная стратегия проведения экспериментов по МИ. Приведите примеры необходимости именно такого типа стратегии.

Изучение метаболических ферментов. Преимущества использования методов «Протеомики» в современных исследованиях структуры и функции белков.

19

Современные методы редактирования геномов микроорганизмов. От плазмидных модификаций до «рандомизации» целевых последовательностей в хромосоме на основе Recombineering с контра-селекцией через SacB, I-SceI, CRISPR/Cas. Комбинированные стратегии (e.g., Dual In/Out).

Транскриптомика – роль в системе X-омных исследований в системной биологии, суть метода и эволюция экспериментальных подходов. Примеры обнаружения генов «новых ферментов». Роль «Транскриптомики» для поиска новых генов.

20

Принципы использования CRISPR/Cas9-зависимой контра-селекции для прецизионного редактирования генома микроорганизмов. Перспективы использования для МИ бактерий.

Метаболическая регуляция ферментов в природе - распространенность, роль, мишень. Почему в клетке большая доля ферментов в норме работает на достаточно малом уровне своей потенциальной активности.

21

Синтетическая биология для МИ. Примеры синтетических генетических элементов, структур, каскадных регуляторов, генов, геномов. – Metabolic grafting, Retrosynthesis.

Современные методы исследования структуры и функции неизвестных генов и их белковых продуктов. Почему в геномах даже самых изученных объектов (например, E. coli) до сих пор сохраняется большое число генов с неизвестной функцией.

22

Что такое ортогональная экспрессия генов, «ключевые игроки» этой системы и в чем отличие ортогональной от альтернативной системы экспрессии.

Современные методы реконструкции Метаболизма по сиквенированному Геному: теоретические возможности, необходимость экспериментального уточнения и проверки.

23

Примеры разработки и использования статических и динамических стратегий процессов в МИ; достоинства динамических подходов, основанных на Metabolic Control Engineering. Успешные примеры изменения регуляции генов в МИ методами синтетической биологии.

Потенциальные и уже используемые возможности оптимизации расходования энергии в энергоемких процессах, разрабатываемых с помощью МИ.

24

Примеры экспериментов МИ, направленных на повышение эффективности традиционных производств. Актуальность и промышленные перспективы микробного синтеза антибиотиков, АК, жирных кислот, витаминов, ферментов.

Краткий анализ основных этапов и методов изучения метаболизма. Синтез метаболитов предшественников. Генерация внут-рикеточной энергии на примере E. coli, понятие и представление о метаболической цене основных предшественников и других метаболитов.

25

Использование МИ для рентабельной утилизации нового промышленного сырья (raw material). Возможные перспективы использования глицерина, метанола, метана, сингаза как сырья для биотехнологической промышленности.

Позитивные примеры организации искусственных «скаффолдов», использование природной и организация искусственной компартиментализации для реализации туннелирования субстратов по targeted pathway в экспериментах по МИ.

26

МИ для организации принципиально новых производств (лекарственных, пищевых и кормовых средств, новых источников сырья и энергии). Привести успешные примеры МИ продуцентов, в частности, лекарственных препаратов.

Что такое «bio-based chemicals», каковы перспективы производства с использованием МИ. Искусственные терпеноиды – от Изопрена до артемизина и таходина, как цель многих исследований в современной МИ.

27

Секвенирование ДНК (1, 2 и 3 поколения технологии)

Критерии оценивания

Оценка отлично 10 баллов - выставляется студенту, показавшему всесторонние, систематизированные, глубокие знания учебной программы дисциплины, проявляющему интерес к данной предметной области, продемонстрировавшему умение уверенно и творчески применять их на практике при решении конкретных задач, свободное и правильное обоснование принятых решений.

Оценка отлично 9 баллов - выставляется студенту, показавшему всесторонние, систематизированные, глубокие знания учебной программы дисциплины и умение уверенно применять их на практике при решении конкретных задач, свободное и правильное обоснование принятых решений.

Оценка отлично 8 баллов - выставляется студенту, показавшему всесторонние, систематизированные, глубокие знания учебной программы дисциплины и умение уверенно применять их на практике при решении конкретных задач, правильное обоснование принятых решений, с некоторыми недочетами.

Оценка хорошо 7 баллов - выставляется студенту, если он твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, умеет применять полученные знания на практике, но недостаточно грамотно обосновывает полученные результаты.

Оценка хорошо 6 баллов - выставляется студенту, если он твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, умеет применять полученные знания на практике, но допускает в ответе или в решении задач некоторые неточности.

Оценка хорошо 5 баллов - выставляется студенту, если он в основном знает материал, грамотно и по существу излагает его, умеет применять полученные знания на практике, но допускает в ответе или в решении задач достаточно большое количество неточностей.

Оценка удовлетворительно 4 балла - выставляется студенту, показавшему фрагментарный, разрозненный характер знаний, недостаточно правильные формулировки базовых понятий, нарушения логической последовательности в изложении программного материала, но при этом он освоил основные разделы учебной программы, необходимые для дальнейшего обучения, и может применять полученные знания по образцу в стандартной ситуации.

Оценка удовлетворительно 3 балла - выставляется студенту, показавшему фрагментарный, разрозненный характер знаний, допускающему ошибки в формулировках базовых понятий, нарушения логической последовательности в изложении программного материала, слабо владеет основными разделами учебной программы, необходимыми для дальнейшего обучения и с трудом применяет полученные знания даже в стандартной ситуации.

Оценка неудовлетворительно 2 балла - выставляется студенту, который не знает большей части основного содержания учебной программы дисциплины, допускает грубые ошибки в формулировках основных принципов и не умеет использовать полученные знания при решении типовых задач.

Оценка неудовлетворительно 1 балл - выставляется студенту, который не знает основного содержания учебной программы дисциплины, допускает грубейшие ошибки в формулировках базовых понятий дисциплины и вообще не имеет навыков решения типовых практических задач.

5. Методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности

Экзамен проводится в устной форме по билетам. В каждом билете представлено два теоретических вопроса. При проведении экзамена обучающемуся предоставляется 30 минут на подготовку. Опрос обучающегося не должен превышать одного астрономического часа.