

Генная инженерия

Программа курса:

1. Клонирование в бактериальных клетках. Используемые ферменты (рестриктазы, T4 ДНК-полимераза, фрагмент Кленова, полинуклеотидкиназа, нуклеаза S1, фосфатаза, ДНК-лигаза). Плазмиды. Ориджины репликации. Совместимость плазмид. Селективные маркеры. Полилинкер. Бело-голубая селекция. Саузерн, нозерн и вестерн блоты. Гибридизация колоний.
2. ПЦР. Конструирование праймеров. Ферменты (Taq-полимераза, Pfu-полимераза, Pfu-Turbo, обратная транскриптаза). Условия денатурации, отжига и элонгации. Случайный и сайт-направленный мутагенез (точечный, делеционный, инсерционный). Амплификация участка ДНК, окружающего известный ген. RT-PCR. Real-time PCR. Иммуно-ПЦР.
3. Библиотеки генов. Размер библиотеки. Расщепление геномов на фрагменты для конструирования библиотек. Векторы (на основе фага лямбда, космиды, YAC'и, BAC'и) их емкость, особенности работы с ними. Физическая карта генома человека. STS. Прогулка по хромосоме.
4. Библиотеки кДНК (конструирование, нормализация, размер). Методы скрининга библиотек. Дифференциальный скрининг, вычитательная гибридизация. Амплификация библиотек.
5. Экспрессия генов в клетках дрожжей. Виды дрожжевых векторов. Ориджины репликации. Селективные маркеры. Дрожжевые промоторы. Индуцибельные системы. Дрожжевая двугибридная система. Одногибридная, тригибридная, обратная двугибридная система. Необходимые контроли.
6. Получение рекомбинантных белков в бактериальных клетках. Используемые промоторы (lac, tac, trc, T5, T7). Превращение конститутивных промоторов в индуцибельные. Особенности системы с T7 промотором. Способы борьбы с подтеканием промотора. Оптимизация экспрессии. Тэги (6xHis, GST, ZZ). Выделение и очистка рекомбинантных белков. Тельца включения.
7. Белковый сплайсинг (механизм, использование для получения рекомбинантных белков). Трансдуцирующие пептиды.
8. Секвенирование НК. Принципы секвенирования. Метод Максама-Гилберта. Метод Сэнгера. Способы разделения и детекции фрагментов ДНК.
9. Gateway клонирование. Принципы подхода. Att-участки и узнающие их ферменты. Основные стадии клонирования. Векторы: Entry, Destination, Donor. Способы селекции.

10. Экспрессия генов в клетках млекопитающих. Клеточные линии. Методы введения ДНК. Транзитная экспрессия. Репортерные гены. Эпитопы. Методы детекции экспрессии генов. Определение эффективности трансфекции. Исследование внутриклеточной локализации белков. Селективные маркеры. Промоторы. Индуцибельные системы.
11. Получение стабильных клеточных линий, экспрессирующих трансген. Ретровирусные векторы (конструирование, получение вирусных частиц, инфекция). Расширение круга хозяев. Стратегии экспрессии двух генов с одного вектора. Преимущества лентивирусных векторов. Самоинактивирующиеся ретровирусные векторы. Эписомальные векторы.
12. Системы введения трансгенов в клетки млекопитающих, основанные на гомологичной рекомбинации. Негативная и позитивная селекция. Нокаутирование генов. Получение трансгенных животных. Cre-lox и flp-frt рекомбинация. Условный нокаут.
13. Факторы, влияющие на эффективность трансляции в клетках прокариот и эукариот. Метод бицистронных конструкций для идентификации IRES-элементов. Источники артефактов. Получение мРНК in vitro. Метод Toe-print.
14. SELEX. Создание рандомизированных библиотек. Получение РНК и ДНК аптамеров. Методы селекции, количество циклов, тестирование, применение.
15. Интерференция РНК. Механизм. Преимущества и недостатки генетического нокадауна по сравнению с нокаутом. Особенности применения метода в клетках млекопитающих. Способы получения siRNA. Критерии выбора последовательности-мишени. Промоторы для экспрессии shRNA. Методы тестирования степени подавления экспрессии гена-мишени. Источники артефактов. Необходимые контроли.
16. Микрочиповые технологии. Методы изготовления микрочипов (включая сочетание ступенчатого олигонуклеотидного синтеза и фотолитографии). Определение профилей экспрессии генов (кДНК чипы и чипы Affimetrix). Генотипирование. Детекция амплификации генов и делеций фрагментов хромосом. Виды и способы получения белковых микрочипов. Поиск ДНК-связывающих белков. Методы ChIP-on-chip, ДНК- программируемый белковый чип.
17. Генная инженерия растений. Способы ведения чужеродных генов в растения. Агробактериальное заражение и трансформация растений. Ti-плазмида. T-ДНК: что кодирует и как образуется? Белки вирулентности. Бинарные векторы. Селективные маркеры. Получение и анализ трансгенных растений. Вирусные векторы. Сайленсинг. Свойства трансгенных растений.