


ОНМедУ, кафедра Технології ліків СРС №3. «Біотехнологія рекомбенантних ДНК. Генна інженерія в біотехнології. Біотехнологічні методи одержання білків. Фармацевтична біотехнологія фосфоліпідів, отримання, використання.»

**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 (Борисюк І.Ю.)

« 27 » серпня 2021 р

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
з самостійної роботи студентів (СРС)**

Факультет: фармацевтичний

Навчальна дисципліна «Фармацевтична біотехнологія»

Тема №3 «Біотехнологія рекомбенантних ДНК. Генна інженерія в біотехнології. Біотехнологічні методи одержання білків. Фармацевтична біотехнологія фосфоліпідів, отримання, використання.»

для аспірантів

Методичні рекомендації з СРС
розробив:
асистент



_____ (Акішева А.С.)

підпис

Методичні рекомендації з СРС
обговорено на методичній нараді
кафедри
«27» серпня 2021 р.

Протокол № 1

Одеса – 2021

Методична розробка практичного заняття, ОПП «Фармація, промислова фармація», для докторів філософії III освітньо-наукового рівня, фармацевтичний факультет, Дисципліна: «Фармацевтична біотехнологія» стр. 1

Тема: «Біотехнологія рекомбенантних ДНК. Генна інженерія в біотехнології. Біотехнологічні методи одержання білків. Фармацевтична біотехнологія фосфоліпідів, отримання, використання.»

Мета: Ознайомитися з біотехнологією рекомбенантних ДНК. Генна інженерія в біотехнології..

Основні поняття: рекомбінантна ДНК, генна інженерія.

План

I. Теоретичні питання до заняття:

Вектори для введення рекомбінантних ДНК

Для введення рекомбінантних ДНК використовують два основних вектора: плазміди і бактеріофаги. Плазміди - позахромосомних генетичний елемент, здатний до тривалого автономного існування і реплікації. Зазвичай це дволанцюжкова кільцева ДНК. Плазміди є практично у всіх бактерій. Розміри плазмід досягають до 500 т. п. н. Плазміди містять сайти початку реплікації (*ori*), що визначають реплікацію в клітині хазяїна, без цих сайтів реплікація була б неможлива. Плазміди можуть бути представлені в клітці 10 - 100 копіями (висококопійні плазміди) або 1 - 4 копіями (низькокопійні плазміди). На частку плазмідної ДНК зазвичай доводиться 0, 1 - 5, 0% сумарної клітинної ДНК. Одні плазміди містять інформацію, що забезпечує їх власний перенесення з однієї клітини в іншу (F - плазміди), інші несуть гени стійкості до антибіотиків (R - плазміди) або специфічні набори генів, відповідальних за утилізацію незвичайних метаболітів (плазміди деградації). Властивості високоефективного плазмідного вектора визначаються наступними параметрами: найбільший розмір, оскільки ефективність перенесення екзогенної ДНК в *E. Coli* значно знижується при довжині плазміди більше 15 т. н. п.;

- наявність унікального сайту рестрикції, в який може бути здійснена вставка;

- наявність одного або більше селективних генетичних маркерів для ідентифікації реципієнтних клітин, які мають рекомбінантну ДНК. Плазмідні вектори створюються за допомогою генної інженерії. Одним з перших векторів був створений плазмідний вектор pBR 322 (див. Глосарій - «Фармацевтична біотехнологія: Технологія виробництва імунобіологічних препаратів»). Для відмінності трансформованих клітин використовують спеціальні маркери. В якості маркерів плазмида може містити гени, що визначають стійкість бактерії до антибіотиків. Вставка чужорідного (донорного) гена в маркерний ген призводить до інактивації останнього. Це дозволяє відрізнити трансформовані клітини, які отримали векторну плазмиду (втратили стійкість до антибіотика), від клітин, які отримали рекомбінантний молекулу (які зберегли стійкість до одного, але втратили стійкість до іншого антибіотика). Цей прийом називається інактивацією маркера вставки. Для

відбору трансформованих клітин, що містять рекомбінантної ДНК (гібридну плазмиду), проводять тестування на резистентність до певних антибіотиків. Наприклад, клітини, що несуть гібридну плазмиду, стійкі до ампіциліну, але чутливі до тетрацикліну (в маркерний ген якого і впроваджена донорная ДНК). Процес поділу геномної ДНК на клонують елементи і введення цих елементів в клітці хазяїна називається створенням геномної бібліотеки (банку клонів, банку генів). Наступним етапом є процес трансформації - введення рекомбінантних ДНК в клітку хазяїна. Вводять плазмиди в соматичні клітини за допомогою хімічних реагентів, що підвищують проникність клітинної оболонки. Зокрема, щоб забезпечити проникнення в клітини плазмідної ДНК, їх обробляють крижаним розчином кальцію хлориду, потім витримують при 42 ° С протягом 1, 5 хв. Ця обробка призводить до локального руйнування клітинної стінки. Максимальна частота трансформації - 10³, т. Е. На кожен тисячу клітин припадає одна трансформація. частота трансформаційне буває 100% ой. Для відбору використовують схеми, що дозволяють ідентифікувати трансформовані клітини. Ефективним методом трансформації E. Coli плазмидами є електропорація (вплив на клітинні мембрани електричним струмом для збільшення їх проникності). Необхідно відзначити, що електропорація в даний час самий ефективний і зручний, але досить дорогий метод, який використовується для генетичної трансформації бактерій. Для введення клонованих генів в соматичні клітини також застосовують мікроін'єкції і мікроуколювання злиття з кліткою навантажених ДНК мембранних везикул (ліпосом). Бактеріофаги – використовувався у якості носіїв генетичної інформації. Рекомбінантний ген вбудовується в геном вірусу і в подальшому репліцирується з генами вірусу при розмноженні в інфікованої клітці хазяїна. З цією метою застосовують бактеріофаг лямбда-вірус двухланцюгової ДНК, яка після проникнення в клітину змикається в кільце. Бактеріофаг M13 - вірус ниткоподібної форми з кільцевої замкнутої ДНК, яка в клітці перетворюється в двухланцюгової і реплікує в клітинах нащадків. У пошуках еукаріотичних систем експресії, для отримання біологічно активних білків, створені бакміди - експресують вектори на основі бакуловірусів для E. Coli і клітин комах. Вихід рекомбінантних бакуловірусів в такій системі підвищився до 99%. Клітини комах, інфіковані бакуловірусів, синтезували гетерологічний білок. Вектори на основі фага зручні для створення клітин (банку генів), але не для тонких маніпуляцій з фрагментом ДНК. Для детального вивчення і перетворення фрагменти ДНК переклонірують в плазмиди. Крім зазначених векторів в генній інженерії приміняютькосміди - плазмиди, що несуть cos-участок (комплементарні липкі кінці) ДНК фага лямбда. Наявність cos-участка дозволяє проводити упаковку ДНК в головку фага in vitro, що забезпечує можливість їх введення в клітину шляхом інфекції, а не трансформації.

Фазміди - це гібриди між фагами і плазмідами. Вони здатні розвиватися як фаг і як плазміда. Поступаючись косміди по клонуєчій емкості, фазміди дають можливість відмовитися від переклонірованія генів з фагових в плазмідні вектори.

Питання для самоконтролю

1. Які відмінні риси клітини прокаріотів?
2. Які відмінні риси еукаріотіческойклеткі?
3. Вказати основні біотехнологічні етапи методики клонування.
4. Які основні методи аналізу генетично модифікованих організмів?
5. Що являють собою трансгенні тварини? Охарактеризуйте тетехнологію їх отримання.
6. Класифікація векторів, що застосовуються в генній інженерії.
7. Привести дані про областях застосування рекомбінантних мікроорганізмів.
8. Які переваги у рекомбінантних штамів пробіотичних мікроорганізмів?

Орієнтовні завдання для опрацювання теоретичного матеріалу

1. Скласти словник основних понять з теми
2. Заповнити орієнтувальну картку для самостійної підготовки студента з використанням літератури з теми:

Основні завдання	Вказівки	Відповіді
1	2	3
Фармацевтична біотехнологія рослин. Культивування клітин та тканин рослин. Отримання біологічно активних сполук з використанням культур рослинних клітин.	Розкрити питання	Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев – Харьков: НТУ «ХПИ», Ч.1.2012. – 304с. С. 63

II. Практичні роботи (завдання), які виконуватимуться на занятті

III. Тестові завдання для самоконтролю

1. Носій генетичної інформації повинен задовольняти вимогам:
А -репліціроваться з високою точністю;
Б-не піддаватися хімічному гідролізу;
В послідовний приєднувати ланки зростаючої полінуклеотидних ланцюга;
Г -виступать як переносник енергії;

- Д -образовивать замкнуту кільцеподібну структуру.
2. Техніка генно-інженерного експерименту включає:
- А -Копіювання гена людини, відповідального за синтез необхідного продукту;
 - Б -модифікацію генетичного апарату хворого для збільшення біосинтезу необхідних продуктів;
 - По-впровадження мікробної клітини з рекомбінантної ДНК в організм людини;
 - Г -культивування і виділення мікробних клітин з рекомбінантними ДНК;
 - Д -Впровадження мікробної клітини з рекомбінантної ДНК в організм тварини;
 - Е -Впровадження людського гена в плазмиду мікробної клітини.
3. Функціональна активність ДНК-лігази:
- А -лізірованіє (розчинення, гідроліз) ДНК;
 - Б-освіта фосфодієфірних зв'язків між кінцями полінуклеотидних ланцюгів;
 - У -метілювання нуклеотидів;
 - Г -нейтралізація ДНК;
 - Д -расщепленіє ДНК.
4. Для введення рекомбінантних ДНК в виробництві препаратів методом генної інженерії використовують:
- А хромосомаю;
 - Б -плазмиди;
 - У -рібосоми;
 - Г -лізосоми;
 - Д -ядро клітин.
5. Плазміда є:
- А -визначення штам кишкової палички, який використовується для біотехнологічних цілей;
 - Б -кольцеобразную молекулу ДНК;
 - У -ділянку ланцюга РНК, що несе інформацію про структуру гена;
 - Д-вірус, що розмножується в цитоплазмі мікробної клітини;
6. Відбір трансформованих клітин, що містять рекомбінантний ДНК (гібридну плазмиду) проводять:
- А -Тестування на резистентність до різної температури;
 - Б -Тестування на резистентність до певних антибіотиків;
 - У -по здатності окрашуватися гематоксіліном;
 - Г-по морфологічними ознаками;
 - Д-по швидкості росту і розмноження.

7. Виникнення геноміки як наукової дисципліни стало можливим після ...
- А. встановлення структури ДНК
 - Б. створення концепції гена
 - В. диференціації регуляторних і структурних ділянок гена
 - Г. повного секвенування генома у ряду організмів
 - Д. підтвердження концепції про подвійної спіралі ДНК
8. Протеоміка характеризує стан мікробного патогена по ...
- А. ферментативної активності
 - Б. швидкості росту
 - В. експресії окремих білків
 - Г. знаходженню на конкретній стадії росту
 - Д. метаболізму
9. Для отримання протопластів з кліток грибів використовується ..
- А. лізоцим
 - Б. трипсин
 - В. «равликовий фермент»
 - Г. Пепсин
 - Д. солізим
10. За освітою протопластів з мікробних клітин можна стежити за допомогою методів ...
- А. віскозиметрії
 - Б. колориметрії
 - В. фазово-контрастної мікроскопії
 - Г. електронної мікроскопії
 - Д. спектрального аналізу
11. Для отримання протопластів з бактеріальних клітин використовується ...
- А. лізоцим
 - Б. «равликовий фермент»
 - В. Трипсин
 - Г. Папаин
 - Д. хімотрипсин
12. Висока стабільність протопластів досягається при зберіганні в ...
- А. холоді
 - Б. гіпертонічної середовищі
 - В. середовищі з додаванням антиоксидантів
 - Г. анаеробних умовах
 - Д. середовищі ПЕГ
13. ПЕГ, внесений в суспензію протопластів ...

- А. сприяє їх злиття
 - Б. запобігає їх злиття
 - В. підвищує стабільність суспензії
 - Г. запобігає мікробне зараження
 - Д. знижує можливість мікробного зараження
13. ПЕГ, внесений в суспензію протопластов ...
- А. сприяє їх злиття
 - Б. запобігає їх злиття
 - В. підвищує стабільність суспензії
 - Г. запобігає мікробне зараження
 - Д. знижує можливість мікробного зараження
15. Субстратами рестриктаз, які використовуються в генній інженерії, є
- А. гомополісахаріди
 - Б. гетерополісахаріди
 - В. нуклеїнові кислоти
 - Г. Білки
 - Д. полісахариди
16. «Ген-маркер» необхідний в генній інженерії для ..
- А. включення вектора в клітини господаря
 - Б. відбору колоній, утворених клітинами, в які проник вектор
 - В. включення «робочого гена» в вектор
 - Г. підвищення стабільності вектора
 - Д. підвищення компетентності клітини
17. Фермент лігаза використовується в генній інженерії, оскільки ...
- А. скріплює вектор з оболонкою клітини господаря
 - Б. каталізує включення вектора в хромосому клітин господаря
 - В. каталізує ковалентное зв'язування вуглецево-фосфорної ланцюга ДНК гена з ДНК вектора
 - Г. каталізує замикання пептидних містків в пептидогліканов клітинної стінки
 - Д. забезпечує утворення водневих зв'язків
18. біотехнології «ген-маркер» необхідний для ...
- А. підвищення активності рекомбінантного
 - Б. освіти компетентних клітин господаря
 - В. модифікації місця взаємодії рестриктаз з субстратом
 - Г. відбору рекомбінантов
 - Д. підвищення стійкості рекомбінантов
19. Мета секвенування генома -встановлення ...
- А. розмірів генома
 - Б. послідовності нуклеотидів
 - В. змісту А -ТГ. співвідношення А-Т / ГЦ пар нуклеотидів

Д. зміни метаболізму

20. В якості основного методу протеоміки використовують ..

.А. мікроскопію

Б. газожидкостную хроматографію

В. двомірний електрофорез

Г. Радіоізотопний

Д. Спектральний

21. Напрямок геноміки, безпосередньо пов'язане з протеомікою ...

А. структурна

Б. порівняльна

В. Функціональна

Г. Формальна

Д. всі напрямки

22. Вкажіть, що з нижче перерахованого можна віднести до окремих етапів клітинної інженерії:

А. отримання плазмід

Б. отримання фагів

В. злиття протопластів

Г. отримання гібридом

23. Як в клітинної інженерії вирішують проблему збереження цілісності протопластов

А. використовуючи механічний тиск

Б. використовуючи осмотичний тиск

В. використовуючи гіпертонічну середу

Г. використовуючи додавання антиоксид

IV. Індивідуальні завдання для студентів з теми заняття

Підготувати презентацію за темами:

1. Структура та матрична природа ДНК, основні етапи матричного синтезу, організація генів, експресія генів, механізми її регуляції.

2. Синтез полінуклеотидів. Виділення клонованих генів.

3. . Що являє собою банк клонів і яким чином створюються банки клонів?

6.Рекомендована література:

Основна

• 1. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.

• 2. S. Spada. G. Walsh Directory of Approved Biopharmaceutical Products 1st Edition . – CRC Press, 2019. – 336 p.

• 3. С. Kokare PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 1st Edition. – Nirali Prakashan, 2017. – 274.

ОНМедУ, кафедра Технології ліків СРС №3. «Біотехнологія рекомбінантних ДНК. Генна інженерія в біотехнології. Біотехнологічні методи одержання білків. Фармацевтична біотехнологія фосфоліпідів, отримання, використання.»

- 4. Лихач А. В. Промислова біотехнологія / А. В. Лихач. – МНАУ. – 2016. – 116 с.
- 5. Краснопольский Ю.М., Звягинцева О.В. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. Ю.М. Краснопольский, О.В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
- 6. Державна фармакопея України : в 3 т. / ДП “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. –2-е вид. –Харків : Державне підприємство “ Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів ”, 2015. –Т.1.