**Модуль №2 «Нанобиотехнологии в медицине и фармации»**

**Занятие №1**

**ДНК – нанобиотехнологии**

**Вопросы для самоподготовки**

1. Методы выделений ДНК
2. Расщепление ДНК с помощью рестриктаз
3. Идентификация специфических последовательностей. Блот-гибридизация по Саузерну
4. Установление первичной структуры ДНК-фрагментов (секвенирование ДНК)
5. Получение рекомбинантных ДНК и их амплификация
6. Клонирование ДНК
7. Полимеразная цепная реакция
8. Секвенирование ДНК с применением наноустройств

**Варианты заданий**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № варианта | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
| Вопросы для самоконтроля | 1 | 10 | 2 | 11 | 3 | 12 | 4 | 13 | 5 | 14 | 6 | 15 | 7 | 16 | 8 | 17 | 9 |
| 18 | 33 | 20 | 31 | 22 | 29 | 24 | 27 | 26 | 25 | 23 | 28 | 21 | 30 | 19 | 32 | 34 |

**Вопросы для самоконтроля**

1. На каких уникальных свойствах ДНК основываются такие атрибуты живых организмов как наследственность и изменчивость?
2. Какие свойства ДНК представляют интерес для разработчиков нанотехнологий?
3. Какова роль ферментов ДНК-полимеразы и РНК-праймазы в процессах самоудвоения ДНК?
4. Чем различаются лидирующая и отстающая цепи самоудваивающейся ДНК?
5. Почему способ репликации ДНК получил название полуконсервативного
6. Что лежит в основе метода гибридизации нуклеиновых кислот?
7. Каким образом можно получить отдельную полинуклеотидную цепь ДНК в лабораторных условиях?
8. Где может найти применение метод гибридизации нуклеиновых кислот?
9. Получение рекомбинантных ДНК и их амплификация
10. Охарактеризуйте этапы первого цикла полимеразной цепной реакции (ПЦР).
11. Укажите различия между первым и вторым циклами полимеразной цепной реакции.
12. Объясните сущность цепного характера полимеразной цепной реакции.
13. С какой целью метод полимеразной цепной реакции используется в медицине?
14. Что представляет собой секвенирование ДНК?
15. Каковы особенности ДНК-секвенатора на основе нанопор?
16. Какие наноконструкции можно использовать для диагностики генных мутаций?
17. Охарактеризуйте возможные перспективы применения ДНК-секвенатора на основе нанопор?
18. Напишите приведенные ниже названия этапов репликации (ауторепликации) ДНК в порядке их осуществления:
* синтез РНК- затравки;
* раскручивание ДНК и разъединение ее на две полинуклеотидные цепи;
* сшивание фрагментов Оказаки в единую полинуклеотидную цепь; объединение материнской и дочерней цепи ДНК в молекулу ДНК;
* синтез фрагментов Оказаки.

19. Какие два процесса схематично изображены на приведенных внизу рисунках? Напишите названия этапов каждого процесса. Сравните этапы обоих процессов между собой. Укажите сходства и различия между этапами двух процессов. Объясните принципиальное различие между молекулами, образующимися на последнем этапе каждого процесса. Какое открытие в молекулярной биологии ХХ века было сделано с использованием процесса (метода), схема которого изображена на рисунке слева?



20. Сравните два биологических явления: самоудвоение ДНК и гибридизацию ДНК. Проанализируйте процессы, лежащие в основе первого и второго явления. В каких состояниях находится в этих процессах молекула ДНК? Используя результаты проведенного сравнительного анализа, заполните приведенную ниже таблицу. Дайте свою оценку степени сходства двух биологических явлений, которые вы сравнивали и анализировали.

Таблица: «Сходство и различие между репликацией и гибридизацией ДНК

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Сходство состояний ДНК и процессов (отметить знаком «+») | Различия состояний ДНК и процессов (отметить знаком «-») |
| Исходное состояние ДНК |  |  |
| Состояние ДНКпо завершении явления |  |  |
| Состояние ДНК в ходе явления: |  |  |
| а) первое состояние |  |  |
| б) второе состояние |  |  |
| Первый процесс (превращение) |  |  |
| Второй процесс (превращение) |  |  |

21. Внесите необходимую информацию о механизме репликации ДНК эукариот в соответствующие колонки таблицы, содержащей перечень некоторых белков и ферментов, участвующих в процессе репликации

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Белки | Функции в вилке репликации | Этап репликации |
| Геликаза  |  |  |
| Дестабилдизирующие белки (SSBP)  |  |  |
| ДНК-полимераза (I)  |  |  |
| ДНК-полимераза (III) |  |  |
| Лигаза  |  |  |
| РНК-праймаза |  |  |

22. Что такое эндонуклеазы рестрикции II и почему они так важны для технологии рекомбинантных ДНК?

23. Перечислите наиболее важные свойства систем экспрессии клонированных генов.

24. Сколько копий ДНК можно иметь после 4-х циклов ПЦР, если сначала имелись три копии фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

Опишите применение бактериофага λ в качестве вектора. Какими особенностями он обладает?

25. Какими способами можно влиять на экспрессию генов, клонированных в прокариотических организмах?

26. Сколько копий ДНК можно иметь после 5-ти циклов ПЦР, если сначала имелись две копии фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

Что такое клонирование ДНК? Что необходимо для клонирования ДНК?

27. В чем состоят проблемы клонирования эукариотических генов в системе клеток прокариот. Опишите стратегию преодоления этих проблем.

28. Сколько копий ДНК можно иметь после 5-ти циклов ПЦР, если сначала имелись три копии фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

Каким образом осуществляют отбор колоний, содержащих рекомбинантную плазмиду? Приведите пример с применением плазмиды рBR322.

29. В чем состоят преимущества эукариотической системы экспрессии в сравнении с бактериальной?

30. Сколько копий ДНК можно иметь после 4-х циклов ПЦР, если сначала имелись две копии фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

31. Сколько копий ДНК можно иметь после 6-ти циклов ПЦР, если сначала имелись три копии фрагмента ДНК?

32. Сколько копий ДНК можно иметь после 6-ти циклов ПЦР, если сначала имелись две копии фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

33. Сколько копий ДНК можно иметь после 4-х циклов ПЦР, если сначала имелось пять копий фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

34. Сколько копий ДНК можно иметь после 6-ти циклов ПЦР, если сначала имелись десять копий фрагмента ДНК? Ответ иллюстрируйте схемой.

**Глоссарий**

1. **Ампликон** – единица амплификации, синтезированная копия гена (фрагмента ДНК), ограниченная с двух сторон праймерами.
2. **Амплификация** – последовательное многократное копирование гена (молекулы ДНК или ее фрагмента).
3. **Ауторепликация** (репликация) ДНК – самоудвоение ДНК, образование из одной материнской молекулы двух дочерних молекул.
4. **Биочип** – матрица размером несколько сантиметров, с помощью которой можно получить данные о функциональной активности генов организма.
5. **Гибридизация ДНК** – образование в опыте двухцепочечной ДНК из двух отдельных цепей ДНК.
6. **Денатурация ДНК** – разрушение водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями и распад молекулы ДНК на две полинуклеотидные цепочки при нагревании до 93-95 градусов.
7. **Имплантант** – биологическая структура (орган, ткань и т.п.), природного или искусственного происхождения, которая пересаживается (внедряется) в живой организм.
8. **Комплементарность** – свойство азотистых оснований образовывать с помощью водородных связей парные комплексы (аденин-тимин или аденин-урацил, гуанин-цитозин) при взаимодействии цепей нуклеиновых кислот.
9. **Липкие концы** – одноцепочечные участки ДНК, расположенные на концах молекул ДНК.
10. **Полимера́зная цепна́я реа́кция** (ПЦР) – экспериментальный метод, позволяющий значительно увеличивать малые концентрации определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).
11. **Полимеразы** – ферменты, катализирующие матричный синтез нуклеиновых кислот.
12. **Праймер** – короткий (18-30 нуклеотидов) олигонуклеотид комплементарный одной из цепей двухцепочечной матрицы ДНК; праймер обрамляет начало или конец амплифицируемого участка.
13. **Рекомбинантная ДНК** – молекула ДНК, образовавшаяся в результате гибридизации ДНК.
14. **Секвенирование** – установление последовательности звеньев (нуклеотидов, аминокислот) в молекулах нуклеиновых кислот или белков.
15. **Транскрибируемые последовательности** – последовательности нуклеотидов в ДНК, с которых считывается информация.