Документ подписан простой электронной подписью
Информация о владельце:
ФИО: Максимов Алексей Борисович
Должность: директор департамента по образовательной политике
Дата подписания: 14.11.2023 16:07:53
Уникальный программный ключ:
8db180d1a3f02ac9e60521a5672742735c18b1d6

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Московский политехнический университет»

УТВЕРЖДАЮ
Декан факультета химической
технологии и биотехнологии
_____ / Белуков С.В. /
«_26_» ____04____ 2022 г.

ОЦЕНОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ
для проверки сформированности компетенции
ПК-7 Способен разрабатывать и модифицировать существующие биотехнологические процессы получения БАВ, разрабатывать предложения по оптимизации биотехнологических процессов и управлению выпуском биотехнологической продукции

Направление подготовки
19.04.01 Биотехнология

Профиль подготовки (образовательная программа)
«Промышленная биотехнология и биоинженерия»

Квалификация (степень) выпускника
магистр

Форма обучения
очная

Москва 2022 г.

ПК-7 Способен разрабатывать и модифицировать существующие биотехнологические процессы получения БАВ, разрабатывать предложения по оптимизации биотехнологических процессов и управлению выпуском биотехнологической продукции

ИПК-7.1 Знает методы генной инженерии клеток для получения продуцентов, технологию получения БАВ; экономику и управление в организации; нормативные правовые акты в области биотехнологического производства; нормы расхода сырья и материалов в области биотехнологического производства
ИПК-7.2. Умеет проводить скрининг штаммов микроорганизмов - продуцентов БАВ; использовать методы генной инженерии при получении новых микроорганизмов; разрабатывать предложения по оптимизации наиболее значимых параметров биотехнологических процессов
ИПК-7.3. Владеет навыками проведения комплекса мероприятий по внедрению в производство биотехнологических продуктов новых штаммов микроорганизмов-продуцентов; методами оптимизации параметров биотехнологического процесса получения БАВ; проведения опытно-промышленной отработки технологии и масштабирования процессов биотехнологического производства; разработки предложений по оптимизации расхода сырья, материалов при изготовлении БАВ

Компетенция формируется дисциплинами:

Б.1.2.1 Технология ферментных препаратов	1 семестр
Б.1.2.5 Нанобиотехнология	3 семестр
Б.1.2.6 Биоконверсия в биотехнологических процессах	3 семестр
Б.1.2.ЭД.3.1 Методы конструирования плазмидных и вирусных векторов	1 семестр
Б.1.2.ЭД.3.2 Структурно-функциональные исследования белков и нуклеиновых кислот	1 семестр

Вопросы и задания для проверки сформированности компетенции

Дисциплина «Технология ферментных препаратов»

Задания в открытой форме

1. Источники ферментов для промышленности: растительные ферментные препараты.
2. Ферменты животного происхождения.
3. Денатурация белка. В чем заключается, какие факторы влияют на процесс денатурации фермента.
4. Роль коферментов и простетических групп в биокатализе.
5. Участие металлов в ферментативных процессах.
6. Прокариоты-продуценты протеолитических ферментов.
7. Мицелиальные грибы-продуценты ферментных препаратов.
8. Ферменты для генетической инженерии.
9. Конститутивные и индуцибельные ферменты.
10. Регуляция активности фермента.
11. Специфические и неспецифические ингибиторы.
12. Способы регуляции скорости ферментативных реакций.
13. Единицы ферментативной активности, международные единицы. Стандартные условия измерения ферментативной активности.
14. Принципы классификации ферментных препаратов.

15. Требования к продуцентам ферментных препаратов.
16. Сырье для производства ферментов.
17. Экстремозимы: продуценты и источники их получения.
18. Условия работы ферментов. Зависимость активности фермента от pH.
19. Стандартизация ферментных препаратов.
20. Методы промышленного получения ферментов поверхностным способом.
21. Микробиологический и биохимический контроль производства.
22. Методы очистки ферментных препаратов, синтезируемых поверхностным способом культивирования.
23. Комплексы ферментаторов для получения ферментов.
24. Стадия выделения внутриклеточного фермента из биомассы.
25. Методы получения ферментов глубинным способом культивирования.
26. Получение сухих ферментных препаратов.
27. Микрокапсулирование ферментных препаратов.
28. Требования, предъявляемые носителям, используемым для иммобилизации ферментов.
29. Методы иммобилизации.
30. Методы гранулирования ферментных препаратов.

Вопрос	Ответ
1. Источники ферментов для промышленности: растительные ферментные препараты.	Источники ферментов для промышленности: растительные ферментные препараты: Ферментные препараты растительного происхождения извлекаются из папайи, инжира, ананаса, а также представлены солодом и препаратами на основе солода. Папаин является наиболее применяемым в производстве ферментом протеолитического действия и ускоряет процесс гидролиза пептидной связи в молекулах белков и их производных. Папаин и химопапаин - ферменты латекса плодов дынного дерева (папайи) (Carica papaya). Фицин выделяют из млечного сока растений семейства тутовых рода фикусовых, например, инжира (Ficus carica). Фермент бромелайн получают из свежего сока ананаса (Ananas comosus, Ananas bracteatus). Солод - это искусственно пророщенное зерно, при определенных температуре и влажности, обладает способностью осахаривать сусло
2. Ферменты животного происхождения.	Ферменты животного происхождения выделяют из различных отделов желудочно-кишечного тракта животных. По сути - это пищеварительные ферменты. Вырабатывают сычужный фермент, пепсин (куриный, говяжий, свиной), трипсин, химотрипсин. Все они являются протеолитическими ферментами.
3. Денатурация белка. В чем заключается, какие факторы влияют на процесс денатурации фермента.	Денатурация белка. В чем заключается, какие факторы влияют на процесс денатурации фермента: Внешние факторы (изменение температуры, солевого состава среды, pH, радиация) могут вызывать нарушение структурной организации молекулы белка. Процесс утраты трехмерной конформации, присущей данной молекуле белка, называют денатурацией. Причиной денатурации является разрыв связей, стабилизирующих определенную структуру белка. Процесс восстановления структуры белка после денатурации называется ренатурацией.

4. Роль коферментов и простетических групп в биокатализе.	Роль коферментов и простетических групп в биокатализе: Ферментативные реакции включают изменение субстрата или его взаимодействие нескольких субстратов. В таких реакциях всегда принимают участие вспомогательные соединения (коферменты), которые выполняют функцию промежуточных переносчиков атомов или функциональных групп. По способам взаимодействия с ферментом различают растворимые коферменты и простатические группы. Растворимый кофермент присоединяется во время реакции к молекуле фермента подобно субстрату, химически изменяется и затем снова освобождается. Простетической группой называется кофермент, который прочно связан с ферментом и во время реакции его не покидает. Простетические группы могут быть органическими (витамины, углеводы, липиды).
5. Участие металлов в ферментативных процессах.	Участие металлов в ферментативных процессах: Активирующее влияние на скорость ферментативной реакции оказывают ионы двухвалентных и, реже, одновалентных металлов. Получены доказательства, что около четверти всех известных ферментов для проявления полной каталитической активности нуждаются в присутствии металлов. Известны ферменты, действие которых активируется ионами нескольких металлов; в частности, енолаза активируется Mg2+, Mn2+, K+.
6. Прокариоты-продуценты протеолитических ферментов.	Прокариоты-продуценты протеолитических ферментов: Грамотрицательные бактерии: *E. Coli* Грамположительные бактерии: *Streptomyces, Micrococcus, Staphylococcus, Bacillus.* Грибы: *Aspergillus, Candida lipolytica Candida albicans*
7. Мицелиальные грибы-продуценты ферментных препаратов.	Мицелиальные грибы-продуценты ферментных препаратов: Для получения амилаз широко применяют микроскопические грибы рода Aspergillus, Для получения целлюлаз:Trichoderma, Pinicillum. Для получения пектолитических ферментов Aspergillus awamori, Aspergillus foetidus
8. Ферменты для генетической инженерии.	Ферменты для генетической инженерии: Ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК, можно разделить на несколько групп: ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (рестриктазы); ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (обратные транскриптазы); ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (лигазы); ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК.
9. Конститутивные и индуцибельные ферменты.	Конститутивные и индуцибельные ферменты: Конститутивными называют ферменты, синтезируемые клеткой вне зависимости от субстрата, на котором размножаются бактерии. К ним, например, относятся ферменты гликолиза. Индуцибельные ферменты синтезируются только в ответ на присутствие в среде необходимого для клетки субстрата — индуктора. К индуцибельным относят гидролазы.

10. Регуляция активности фермента.	Регуляция активности фермента: Активность ферментов в клетке может регулироваться двумя основными путями: 1) присоединением эффекторных молекул, которые повышают или понижают активность фер-ментов и 2) путем ковалентной модификации ферментов (фосфорилирование, ацетитиро-вание, метилирование).
11. Специфические и неспецифические ингибиторы.	Специфические и неспецифические ингибиторы: Вещества, блокирующие определённые группы активного центра ферментов называют специфическими. Не специфическими являются вещества широкого спектра действия на фермент
12. Способы регуляции скорости ферментативных реакций.	Способы регуляции скорости ферментативных реакций: Аллостерическая регуляция; регуляция с помощью белок-белковых взаимодействий; регуляция путём фосфорилирования/дефосфорилирования молекулы фермента; регуляция частичным (ограниченным) протеолизом
13. Единицы ферментативной активности, международные единицы. Стандартные условия измерения ферментативной активности.	Единицы ферментативной активности, международные единицы. Стандартные условия измерения ферментативной активности: Активность – это изменение субстрата под влиянием фермента в единицу времени. Международная единица активности (МЕ или U) – количество фермента, катализирующие превращение 1 мкмоля субстрата за 1 мин. В системе СИ используют «катал», который определяется как 1 моль/с. К стандартным условиям измерения активности фермента относят температуру 30 градусов, давление 767 мм рт.ст.
14. Принципы классификации ферментных препаратов.	Принципы классификации ферментных препаратов: Это система номенклатуры ферментных препаратов, в которой учитывается природа основного фермента, источник получения и степень очистки. Наименование препаратов включает сокращенное название основного фермента и видовое название продуцента. После названия препарата указывается способ культивирования продуцента (Г-глубинное, П – поверхностное), далее следует буква х. Для очищенных препаратов также указывается степень очистки: 2 – жидкий неочищенный концентрат исходной культуры; 3 – сухой препарат, полученный путем распылительной сушки неочищенного раствора фермента (экстракта из поверхностной культуры или культуральной жидкости); 10 – сухие препараты, полученные осаждением ферментов органическими растворителями или методом высаливания; 15, 18, 20 – препараты, очищенные от балластных веществ и частично от сопутствующих ферментов. Для препаратов с индексом очистки выше 20 указанная номенклатура не применяется
15. Требования к продуцентам ферментных препаратов.	Требования к продуцентам ферментных препаратов: К микроорганизмам – продуцентам ферментов – предъявляются следующие требования: наличие высокой ферментативной активности; преимущественный синтез фермента или группы ферментов, превращающих

	определенный субстрат; генетическая стабильность по признаку синтеза фермента или ферментов; достаточно высокая скорость роста; способность расти на средах с доступными и недорогими источниками питания.
16. Сырье для производства ферментов.	Сырье для производства ферментов: При переработке различных видов органического сырья используются ферменты растительного, микробного и животного происхождении. Основная масса ферментных препаратов производится на основе культивирования промышленных штаммов микроорганизмов, преимущественно продуцентов секретируемых (внеклеточных) ферментов. Растительное сырье – солод, растительные протеазы. Животным сырьем для получения ферментных препаратов являются поджелудочная железа (липаза, амилаза, и др.), слизистые оболочки желудков и тонких кишок свиней, сычуги крупного рогатого скота (пепсин и липаза), сычужки молочных телят и ягнят (реннин – сычужный фермент), семенники половозрелых животных.
17. Экстремозимы: продуценты и источники их получения.	Экстремозимы: продуценты и источники их получения: Экстремозимы - ферменты экстремофильных микроорганизмов, зачастую максимально активны в тех же, что и их продуценты, условиях, а иногда и в более широких областях, что является перспективным Кроме изменений в структуре ферментов, обуславливающих экстремофилию их продуцентов, было обнаружено, что некоторые экстремофилы, особенно представители архей, обладают новыми, уникальными метаболическими путями и благодаря этому могут являться продуцентами ферментов и других БАВ с новыми свойствами
18. Условия работы ферментов. Зависимость активности фермента от pH.	Условия работы ферментов. Зависимость активности фермента от pH: Каждая молекулярная форма фермента (изофермент) проявляет каталитическую активность в узком интервале pH среды, в связи с тем, что от концентрации водородных ионов зависит состояние ионизации молекулы субстрата и активных группировок в активном центре ферментного белка, которое обеспечивает каталитическое действие фермента, концентрация ионов водорода влияет на конформацию активного центра. Кривая зависимости активности фермента от pH среды имеет форму купола с пиком в точке оптимума pH для работы фермента.
19. Стандартизация ферментных препаратов.	Стандартизация ферментных препаратов: Стандартизацию препарата можно проводить, добавляя наполнитель, например, перед концентрированием, если продукт выпускается в жидком виде, или же перед сушкой распылением с учетом потерь на стадии концентрирования или при распылительной сушке, или в уже готовый сухой препарат. При смешивании готового сухого препарата с наполнителем необходимо, чтобы препарат и наполнитель имели приблизительно одну и ту же степень измельчения и влажность не более 10 – 12 %. Стабилизатором амилолитических ферментов является крахмал,

	пектолитических – крахмал или хлористый натрий. Стандартизировать неполитические препараты можно также диатомитом, желатином, бентонитом. Выбор наполнителя и стабилизатора, определение дозировки, необходимых условий хранения и длительности сохранения активности осуществляются экспериментально
20. Методы промышленного получения ферментов поверхностным способом.	Методы промышленного получения ферментов поверхностным способом: Поверхностный способ включает в себя культивирование на жидких и твердых - сыпучих фазах (питательных средах). При этом микроорганизмы получают кислород непосредственно из воздуха. При поверхностном культивировании на жидких средах микроорганизмы растут в виде пленок. При росте на твердых субстратах мицеллий плотно оплетает субстрат с образованием коржа. Осуществляется поверхностное культивирование в специальных кюветах или на поддонах при оптимальной температуре и постоянной аэрации.
21. Микробиологический и биохимический контроль производства.	Микробиологический и биохимический контроль производства: Отобранные пробы подвергаются микроскопированию и визуальному просмотру. С целью выявления возможных заражений производится периодический высев проб на агаризованные среды с введением факторов, подавляющих рост продуцента. Постоянно ведется определение накопления в культуре ферментативной активности. При глубинном культивировании ведут контроль за потреблением основных лимитирующих компонентов среды (углеводы, N, P), измеряют pH культуры. Все показатели роста культуры, изменения состава среды и накопления ферментов и т. д. заносятся в лабораторный журнал. На всех стадиях выделения ферментов проводят анализы активности, определяют величины потерь и выход товарного продукта.
22. Методы очистки ферментных препаратов, синтезируемых поверхностным способом культивирования.	Методы очистки ферментных препаратов, синтезируемых поверхностным способом культивирования: В производстве ферментов для очистки полученных препаратов от различных низкомолекулярных примесей (ионов солей, сахаров и т.д.) применяют мембранные методы очистки: диализ, электродиализ и баромембранные методы: обратный осмос, ультрафильтрацию, микрофильтрацию и тонкую фильтрацию. Также используют осаждение ферментов органическими растворителями, высаливанием, органическими полимерами и путём избирательной денатурации; разделение белков хроматографическими методами.
23. Комплексы ферментаторов для получения ферментов.	Комплексы ферментаторов для получения ферментов: Батарея последовательно работающих ферментеров с дополнительной подачей питательной среды (с подпиткой) обычно необходима в том случае, если высокая

	концентрация субстратов ингибирует рост и развитие микроорганизмов, а малая концентрация не позволяет достигнуть необходимой концентрации; Батарея последовательно работающих ферментеров с рециркуляцией части суспензии микроорганизмов, используется при наличии трудно утилизируемого субстрата, когда микроорганизмам необходимо время для адаптации к одному или нескольким компонентам сырья; Батарея последовательно соединенных ферментеров с подпиткой и рециркуляцией суспензии микроорганизмов. Позволяет наиболее полно утилизировать сложный субстрат, ингибирующий в высоких концентрациях микробные клетки.
24. Стадия выделения внутриклеточного фермента из биомассы.	Стадия выделения внутриклеточного фермента из биомассы: Используемые на данной стадии методики направлены на разрушение клеточной стенки и извлечение фермента. Разрушение могут проводить биологическими (ферменты), химическими (кислоты) и физическими (УЗ) методами. По своему воздействию на клетки они могут быть мягкими (истирание, гомогенизация, дейстаие ферменов), средним (гомогенизатор Уоринга, растирание с образивом), сильного (пресс, УЗ, шаровая мельница).
25. Методы получения ферментов глубинным способом культивирования.	Методы получения ферментов глубинным способом культивирования: Глубинный способ выращивания микроорганизмов имеет ряд преимуществ по сравнению с поверхностным: позволяет изменять состав питательной среды, обеспечивая максимальный выход того или иного фермента, исключает тяжелый малопроизводительный ручной труд, упрощает механизацию и автоматизацию различных устройств, контролирующих параметры процесса в динамике. Процесс производства ферментных препаратов при глубинном культивировании состоит из следующих технологических стадий: получение посевного материала, приготовление питательной среды и ее стерилизация, стерилизация воздуха, выращивание микроорганизмов-продуцентов в производственных ферментаторах, отделение биомассы от культуральной жидкости, очистка и выделение ферментов.
26. Получение сухих ферментных препаратов.	Получение сухих ферментных препаратов: В зависимости от агрегатного состояния фермента в конце очистки и его стабильности при повышении температуры применяют три метода сушки: Вакуумная - сушка в вакуумных сушилках при техническом вакууме и температуре около 40° С; Молекулярная - медленная сушка (в течение нескольких часов) при отрицательной температуре путем сублимации воды из замороженного раствора под средним или глубоким вакуумом; Распылительная - скоростная сушка (в течение долей секунды) при высоких температурах порядка 130° в виде аэрозоля, образованного из раствора в токе горячего воздуха.

27. Микрокапсулирование ферментных препаратов.	Микрокапсулирование ферментных препаратов: Процесс микрокапсулирования может быть осуществлен двумя способами: химическим или физическим. Химические методы: образования пленки на границе раздела двух фаз при реакциях, полимеризации и поликонденсации. Физические методы: вакуум-напыление, микрокапсулирование в псевдоожиженном слое, при взаимодействии аэрозолей, имеющих различный электрический заряд. Микрокапсулирование довльно затратный метод.
28. Требования, предъявляемые носителям, используемым для иммобилизации ферментов.	Требования, предъявляемые носителям, используемым для иммобилизации ферментов: Требования: • биологическая и химическая стойкость; • механическая прочность • нерастворимость • значительная гидрофильность • достаточная проницаемость для ферментов, коферментов, субстратов и продуктов реакции • большая удельная поверхность; • легкость активации комплекса «фермент — носитель» • высокое качество получаемого продукта • технологичность -возможность автоматизировать процесс ферментации и выделения продуктов реакции • низкая стоимость
29. Методы иммобилизации.	Методы иммобилизации: Ферменты могут быть иммобилизованы физическим и химическим методами. Физическая иммобилизация представляет собой включение фермента или клетки в такую среду, в которой для нее существует ограниченное пространство. К физическим способам можно отнести: Адсорбцию; Включение в поры геля; Использование полупроницаемых мембран; Включение в двухфазную среду. Химическая иммобилизация происходит при сшивании молекулы фермента с носителем ковалентными связями.
30. Методы гранулирования ферментных препаратов.	Методы гранулирования ферментных препаратов: Гранулирование связано с необходимостью ликвидировать пыление ферментного препарата и чаще всего применяется для препаратов, предназначенных для использования в синтетических моющих средствах. Гранулы ферментных препаратов можно получать различными способами: окатыванием, прессованием, таблетированием, в виброкипящем слое. В различных грануляционных установках совмещается несколько процессов — увлажнение, смешивание, гранулирование и сушка получаемых гранул.

Тестовые вопросы по дисциплине

Вопрос 1. Ферментами называются биологические соединения, состоящие из**:**

А) неорганических соединений;

Б) простых белков;
В) сложных белков;
Г) углеводов;
Д) липидов.

Вопрос 2. Наиболее широкое применение и получение промышленным способом получили ферменты:

А) оксидоредуктазы
Б) трансферазы
В) гидролазы
Г) лиазы
Д) изомеразы.

Вопрос 3. Стандартная единица активности (е или u) это количество фермента, которое катализирует:

А) превращение 1 мкмоля субстрата в секунду при стандартных условиях
Б) превращение 1 мкмоля субстрата за 1 мин при стандартных условиях
В) превращение 1 мкмоля субстрата в секунду при любых условиях
Г) превращение 1 мг субстрата в секунду при стандартных условиях;

Вопрос 4. Ферменты, полученные поверхностным твердофазным способом, имеют индекс:

А) Гх
Б) Сх
В) Тх
Г) Пх
Д) Дх.

Вопрос 5. Ферменты, полученные глубинным жидкофазным способом, имеют индекс:

А) Гх
Б) Сх
В) Тх
Г) Пх
Д) Дх

Вопрос 6. Сопоставьте, к какой группе гидролаз относят ферменты, гидролизующие**:**

1. Белки	А) амилазы,
2. Полисахарид крахмал	Б) протеиназы
3. Липиды	В) эстеразы
4. Пектины	Г) липазы
5. Сложные эфиры	Д) пектиназы.

*Правильный ответ:*1)

1) 1- Б; 2 – А; 3 – Г; 4 – Д; 5 – В
2) 2- Б; 1– А; 3 – Г; 4 – Д; 5 – В
3) 1- Б; 2 – А; 3 – Г; 5 – Д; 4 – В
4) 3- Б; 2 – А; 1 – Г; 4 – Д; 5 – В

Вопрос 7. Сопоставьте, какие продуценты синтезируют ферменты:

1.*Bacillus subtilis*	А) амилоризин
2, *Aspergillus oryzae*	Б) протосубтилин
3. *Fusarium oxysporum*	В) пектиназа,
4. *Trichoderma viride*.	Г) целловиридин
5. *Klebsiella sp.*	Д) пуллоназа,

Варианты ответа:
А) 3-Б; 2 – А; 1 – Г; 4 –Г; 5 – Д
Б) 1-Б; 2 – А; 3 – Г; 4 –Г; 5 – Д.
В) 1-Б; 2 – А; 5 – Г; 4 –Г; 3 – Д

Вопрос 8. Укажите, каким способом получают ферменты с номенклатурой:

1. ферментный препарат П3	А) поверхностным твердофазным с низкой степенью очистки
2. ферментный препарат Г20х	Б) глубинным с высокой степенью очистки
3. ферментный препарат П20х	В) поверхностным твердофазным с высокой степенью очистки

Варианты ответа:
А) *1-А; 3 – Б; 2 – Г*
Б) *3-А; 1 – Б; 2 – Г*
В) *1-А; 2 – Б; 3 – Г*

Вопрос 9. Сопоставьте, какие продуценты синтезируют ферменты и каким способом:

1. протосубтилин Г 20х	А) глубинным способом из *Bacillus subtilis* с высокой степенью очистки
2. амилоризин П3х	Б) поверхностным способом из *Aspergillus oryzae* с низкой степенью очистки
3. целловиридин Г 3х	В) глубинным способом из *Trichoderma viride* с низкой степенью очистки

Варианты ответа:
А) *3 - А; 2 – Б; 1 – Г*
Б) *1- А; 2 – Б; 3 – Г*
В) *2- А; 3 – Б; 1 – Г*

Вопрос 10. Выберите ответ: иммобилизация ферментов – это процесс:
А) прикрепления ферментов к поверхности природных и синтетических материалов
Б) прикрепления к клеточной стенке продуцента
В) включение их в полимерные материалы
Д) включения их в полые волокна и мембранные капсулы
Е) поперечная химическая сшивка.

Вопрос 11. Укажите сферы применения иммобилизованных ферментов:
А) тонкий органический синтез и преобразование энергии
Б) ферментная аналитика
В) производство первичных метаболитов
Г) конверсия растительного сырья;
Д) создание лекарственных препаратов.

Вопрос 12. Выберите основные задачи промышленной инженерной энзимологии:

А) извлечение ферментов из растительных тканей

Б) извлечение ферментов из животных тканей;

В) конструирование биоорганических катализаторов с заданными свойствами на основе антител

Г) создание систем иммобилизованных ферментов на носителях.

Вопрос 13. Укажите преимущества микробиологического синтеза ферментов

А) богатство ассортимента ферментов, синтезируемых микроорганизмами,

Б) возможность управления микробиологическим синтезом ферментов;

В) высокие скорости размножения микроорганизмов;

Г) возможность получать нестерильным способом;

Д) возможность использования различных и доступных и недорогих субстратов.

Вопрос 14. Укажите, в каких условиях синтезируются индуцибельные ферменты:

А) изменения условий ферментации

Б) действия на клетку в состоянии покоя

В) культивирование на субстрате, который катализирует фермент

Г) действия на генетический аппарат продуцента мутагенами

Вопрос 15. Какими способами культивирования продуцентов получают ферменты в биотехнологических процессах:

А) поверхностным твердофазным

Б) поверхностным жидкофазным

В) глубинным, жидкофазным

Г) газофазным.

Вопрос 16. Выберите необходимые операции при получении ферментов с высокой степенью очистки глубинным жидкофазным способом:

А) ферментация до автолиза продуцента и выхода фермента в культуральную среду

Б) подготовка посевного материала

В) ферментация до накопления биомассы

Г) отделение биомассы от культуральной жидкости

Д) экстракция фермента из биомассы ультрафильтрацией.

Вопрос 17. Активный центр каталитического антитела, комплементарный специфической части антигена, называется:

А) простетической группой

Б) водной оболочкой

В) мицеллой

Г) гаптеном

Вопрос 18. Укажите, из каких двух основных частей состоит антиген, используемый для получения каталитического антитела

А) рибозима

Б) выкомолекулярного носителя белка

В) низкомолекулярного гаптена-антигена

Г) водной оболочки

Вопрос 19. Укажите основные недостатки материалов-носителей для иммобилизации ферментов

А) доступность
Б) полифункциональность
В) гидрофильность
Г) биодеградируемость
Д) достаточно высокая стоимость.

Вопрос 20. Иммобилизация ферментов – это процесс**:**

А) прикрепления ферментов к поверхности природных и синтетических материалов;
Б) прикрепления фермента к клеточной стенке продуцента
В) включение их в полимерные материалы
Г) включение фермента в полые волокна и мембранные капсулы
Д) поперечная химическая сшивка между ферментом и носителем.

Вопрос 21. Укажите, какими полезными свойствами должны обладать материалы для иммобилизации ферментов:

А) наличие функциональных групп для образования ковалентной связи между носителем и ферментом
Б) способностью носителя легко активироваться
В) значительной гидрофильностью
Г) незначительной гидрофильностью
Д) гидрофобностью.

Вопрос 22. Индуцибельные и репрессибельные ферменты такие, которые синтезируются клетками в результате:

А) изменения условий ферментации;
Б) действия на клетку в состоянии покоя;
В) культивирования клеток в присутствии специфического субстрата;
Г) встраивание в геном клеток продуцента генов, детерминирующих ферменты

Вопрос 23. К биологическим катализаторам-ферментам относят:

А) олигонуклеотиды ДНК
Б) рибозимы
В) энзимы
Г) абзимы

Вопрос 24. Укажите, в каких областях используют рибозимы как высокоэффективные лекарственные препараты

А) генной терапии
Б) терапии кожных заболеваний
В) терапии инфекционных заболеваний
Г) целевой доставке лекарственных препаратов

Вопрос 25. Укажите причины неэффективности иммобилизованных ферментов при их применении в биотехнологических процессах:

А) низкая операционная стабильность;

Б) ограничение свободы движения молекул;

В) способность катализировать только одну реакцию;

Г) возможность употребления лишь тех ферментов, которые не требуют регенерации кофакторов

Д) недолговечность.

Вопрос 26. Укажите ферментативные реакции, осуществляемые рибозимами

А) рестрикция РНК

Б) сшивка РНК

В) репликация ДНК

Г) синтез полипептидной цепи

Вопрос 27. Укажите, какие изменения происходят при иммобилизации ферментов

А) субстратной специфичности

Б) каталитических свойств

В) устойчивости

Г) зависимости активности от параметров среды

Вопрос 28. Укажите, какие объекты не относят к биологическим катализаторам-ферментам:

А) молекулы ДНК

Б) энзимы

В) рибозимы

Г) абзимы.

Вопрос 29. Укажите, какие основные методы иммобилизации ферментов относятся к физическим:

А) адсорбция фермента с образованием ковалентной связи с носителем

Б) включение в поры поперечносшитого геля

В) включение в полупроницаемые структуры

Г) включение в двухфазные системы

Д) адсорбции на нерастворимом носителе.

Вопрос 30. Укажите, какие методы иммобилизации ферментов относятся к химическим

А) адсорбция фермента на носителе

Б) включение в поры поперечносшитого геля

В) включение в полупроницаемые структуры

Г) включение в двухфазные системы

Д) образование ковалентной связи между вставкой, носителем и ферментом.

Ключ к тестовым заданиям:

№ вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ответ	В	В	Б	Г	А	А	Б	В	Б	А, В, Г, Д, Е

№ вопроса	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ответ	А, Б, Г, Д	В, Г	А, Б, В, Д	А, В	А, В	Б, В, Г, Д	Г	Б, В	В, Д	А, В, Г, Д,
№ вопроса	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Ответ	А, Г, В	В, Г	Б, В, Г	А	В, Г	А, Б, Г	В, Г	А	Б, В, Г, Д	Д

Дисциплина «Нанобиотехнология»

Задания в открытой форме

1. Какие направления нанобиотехнологии известны?
2. Перспектива развития «зеленой» нанотехнологии.
3. Потенциальные риски и меры безопасности при работе с нанотехнологиями.
4. Риск применения нанотехнологии, обусловленной высокой мобильностью наночастиц.?
5. Вирусы как нанообъекты. Самосборка вирусных частиц в клетке.
6. Перечислите особые принципы самоорганизации наносистем.
7. Укажите практические возможности использования технических систем для воздействия на биологические системы.
8. Основные направления наноматериаловедения.
9. Характеристика нанотрубок, наночастиц и фуллеренов.
10. Способы повышения биодоступности нанотрубок, наночастиц и фуллеренов.
11. Способ введения фуллеренов в организм – инкапсуляция в липидную везикулу для адресной доставки к трансформированным клеткам.
12. Сенсорные наноматериалы: определение. Использование биосенсоров на основе белков в электронике. Биосенсоры в новых приводящих устройствах.
13. Конструкции биосенсоров с использованием – ферментных электродов и иммобилизованных клеток микроорганизмов.
14. Биосенсоры, содержащие моноклональные антитела, обладающие высокой избирательностью.
15. Определение «биомаркеры», как систем, отражающих события в организме или в биологической системе.
16. Направления наномедицины: разработка методов адресной доставки лекарств к пораженным клеткам.
17. Стратегии создания нанопрепаратов направленного действия. Преимущества и недостатки препаратов направленного действия.
18. Разработка нановакцин, конструирование иммуногенов и мини-антител, наноантител.
19. Химическое коньюгирование в наномедицине. Понятие «кролинкер»: кролинкеры нулевой длины, гомобифункциональные кролинкеры, гетеробифункциональные кролинкеры, трифункциональные кослинкеры.
20. Флуоресцентное мечение наноструктур для диагностических систем. Коньюганты для диагностики и терапии.
21. Антитела как молекулярные векторы. Меченые антитела в биомедицине.
22. Полимеры как переносчики терапевтических агентов. Применение полиэтиленгликолей в нанотехнологии и медицине..
23. Кубосомы. Дискосомы: использование в бионанотехнологии.
24. Липидные микротрубки. Липидные микропузырьки. Липосомы – типы, размеры, стерически стабилизированные липосомы, нацеленные липосомы.
25. Полимерные нанокапсулы и наносферы. Полимерные мицеллы. Дендримеры.
26. Особенности нанотехнологических производств. Эффективность технологий

миниатюризации аналитических систем.

27. Лаборатории на чипе. Использование ДНК для создания наноструктур. ДНК как шаблон для молекулярной электроники.
28. ДНК как возможный компонент компьютеров следующего поколения.
29. Задачи нанобиотехнологии по решению ключевых проблем медицины, здравоохранения, сельского хозяйства, наноэлектроники, защиты окружающей среды, национальной обороны и безопасности.
30. Возможные риски, связанные с использованием нанобиотехнологии Высокая проникающая способность наночастиц и их склонность встраиваться в биотехнологические объекты.

Вопрос	**Ответ**
1. Какие направления нанобиотехнологии известны?	Нанобиотехнология имеет три основных направления: 1. наномедицина это «…слежение, исправление, конструирование и контроль над биологическими системами человека на молекулярном уровне с использованием разработанных наноустройств **и** наноструктур». Под этим термином сегодня понимают применение нанотехнологий в диагностике, мониторинге и лечении заболеваний. 2. Биомиметика – это конструирование наноструктур на основе ДНК, РНК и белков. Имеет четыре сформировавшихся направления развития: - создание наноконструкций из белка - использование в конструировании молекул ДНК - использование в конструировании молекул РНК - работа с вирусами при создании наномеханизмов 3. Разработка методов и способов привнесения искусственных наноразмерных частиц, различных материалов и интерфейсов в живые системы
2. Перспектива развития «зеленой» нанотехнологии	Зеленая нанотехнология = это раздел использования наноматериалов в охране окружающей среды, в сельском и лесном хозяйстве. Это сенсоры для анализа состава различных сред Наноструктурированные материалы и реагенты для процессов водоочистки (водоподготовки, переработки пищевого сырья), датчики физических величин на основе наноматериалов Термостойкие наноструктурированные композиционные, керамические и металлические материалы Наноструктурированные композиционные и керамические материалы и покрытия с особыми термическими свойствами (теплопроводящие, терморегулирующие) Солнечные батареи нового поколения Излучатели (в том числе лазеры и органические светодиоды) на основе наногетероструктур
3. Потенциальные риски и меры безопасности при работе с нанотехнологиями	При производстве и использовании наноматериалов можно выделить следующие потенциальные опасности: токсическое действие на производящих их работников и на население; высокая реакционная способность, взрыво- и пожароопасность некоторых из них; неблагоприятные изменения при попадании в окружающую среду (на производстве, переработке и их утилизации).

4.Риск применения нанотехнологии, обусловленной высокой мобильностью наночастиц.?	Опасности обусловлены рядом специфических свойств: более высокие реакционные способности по сравнению с макроскопическими веществами; способность проникать в клетки и вмешиваться в генетические процессы, оказывая токсическое воздействие на все живые организмы; отличие процессов их биотрансформации от превращений макрочастиц того же химического состава; невозможность их улавливания и обезвреживания в окружающей среде с помощью существующих систем очистки сточных вод и газообразных выбросов; отсутствие полного контроля над их производством и использованием; недостаточность информации по опасности их использования; эпизодичность исследований по их влиянию на человека и природную среду; отсутствие единой базы данных по их производству в РФ.
5.Вирусы как нанообъекты. Самосборка вирусных частиц в клетке.	Вирусы – неклеточные агенты, имеют наноразмерные масштабы: от 20 до 140 нм. Самосборка вирусных частиц — одно из первых свойств вируса, используемое бионанотехнологами. Самосборка, точнее супрамолекулярная самосборка — это спонтанная ассоциация молекулярных «кирпичиков» посредством межмолекулярных нековалентных взаимодействий (т.е. слабых взаимодействий, не связанных с прямым перекрыванием электронных оболочек атомов). Это обратимое явление, что позволяет «выбирать» наиболее устойчивую структуру и исправлять ошибки в упаковке. В биологических системах это приобретает особенно важный смысл
6.Перечислите особые принципы самоорганизации наносистем.	Понятия «самоорганизация» и «самосборка» в современной нанотехнологии определены следующим образом. Самосборка - это процесс, в котором принимают участие только компоненты конечной структуры, т. е. включаемые в собирающуюся структуру. Как правило, в этот процесс вовлечены гидрофобные или гидрофильные взаимодействия, кулоновские и ван-дер-ваальсовые силы, как, например, в случае взаимодействия наночастиц в коллоидном растворе. Самоорганизация – механизм или процесс формирования образца на высшем масштабном уровне посредством множественных взаимодействий компонентов более низких иерархических уровней системы. Самоорганизация - это многостадийная или многомасштабная самосборка. И наоборот, самосборка - это локальная самоорганизация на одном из иерархических масштабных уровней на основе свойственных этому уровню взаимодействий. Результат самосборки - это некоторая неподвижная структура, тогда как в случае самоорганизации, как правило, результатом является стационарный или установившийся колебательный процесс.
7.Укажите практические возможности использования	Гибридные материалы, конвергентные технологии, биомиметические материалы и материалы биомедицинского назначения:

технических систем для воздействия на биологические системы	- костные импланты на основе биорезорбируемых нанокерамик и биокомпозитов, - наноматериалы для достраивания живых тканей организма, заполнения костных дефектов и др.; Наноструктуры, создаваемые с использованием биосовместимых нанокомпозитов на основе нанопористых соединений как средства направленной доставки лекарств и воздействия на онкологические новообразования; - нанокомпозиты на основе плазмидных ДНК и интерферирующих РНК для направленной доставки генетического материала; - устройства для прямого считывания последовательности нуклеотидов, изготовленные с использованием наноструктурированной поверхности.
8.Основные направления наноматериаловедения	Области приоритетного направления «Новые материалы и нанотехнологии»: - Конструкционные и функциональные материалы - Компьютерное моделирование материалов и процессов - Гибридные материалы, конвергентные технологии, биомиметические материалы и материалы медицинского назначения - Диагностика материалов в приборостроении, медицине и охране окружающей среды
9.Характеристика нанотрубок, наночастиц и фуллеренов	Нанотрубки представляют собой цельные цилиндрические структуры, образованные листками графита. Нанотрубки взаимодействуют с макромолекулами (ДНК, белки). Функционизированные нанотрубки могут служить переносчиками как небольших молекул лекарственных веществ, так и макромолекулярных комплексов. Диаметр одностенных нанотрубок находится в диапазоне $1.1 < d < 1.4$ нм; длина нанотрубок — в диапазоне $2 < L < 5$ мкм; соответствующие величины для многостенных нанотрубок $2 < d < 20$ нм и 100 нм $< L < 4$ мкм. Многостенные нанотрубки представляют собой концентрические трубки, где число слоев может меняться в пределах 5–20, а концы трубок могут быть закрытыми и открытыми. Фуллерены составляют уникальный класс макромолекул (нанокластеров), обладающих замкнутой двумерной структурой. Диаметр фуллерена C_{60} составляет ~ 0.70 нм. Наиболее распространенной из молекул, принадлежащих к семейству фуллеренов, является C_{60}, структура которой соответствует правильному усеченному икосаэдру. Твердый фуллерен C_{60} (фуллерит) — это молекулярный кристалл, связанный силами Ван дер Ваальса.
10.Способы повышения биодоступности нанотрубок, наночастиц и фуллеренов.	Фуллерены и нанотрубки обнаруживают биологическую активность. Одна из основных задач повышения биодоступности это инкапсулирование то есть помощь в доставке активного компонента к его мишени. Так как они не растворимы в полярных растворителях и биологических жидкостях, в химических исследованиях их биологической активности используется три подхода: а) создание растворимых комплексных молекул, включающих

	наночастицы, нанотрубки и фуллерены; б) использование детергентов таких, например, как поливинилпиролидон, фосфолипиды и т. д., и синтез водорастворимых производных фуллеренов; в) приготовление суспензии микрочастиц фуллеренов. Показано, что фуллерены и их производные могут использоваться в фототерапии, в приготовлении различных лекарственных препаратов, обнаруживают антивирусную активность и т. д.
11.Способ введения фуллеренов в организм – инкапсуляция в липидную везикулу для адресной доставки к трансформированным клеткам	Фулерены являются наноконтейнерами для антибактериальных, антираковых и противовирусных веществ. фуллерены малопригодны в силу их нерастворимости в водных растворах и, как следствие, ограничений по используемым концентрациям в исследовании их свойств на животных. Функционализация фуллеренов (например, получение карбоксифуллеренов) делает эти соединения биодоступными и, следовательно, более эффективными для исследований в биосистемах. Один из способов введения фуллеренов в организм — инкапсуляция в липидную везикулу для адресной доставки к трансформированным клеткам. Использование принципов фотодинамической терапии и генерирование синглетного кислорода фуллереном под действием света вызывает повреждение и гибель клетки-мишени.
12.Сенсорные наноматериалы: определение. Использование биосенсоров на основе белков в электронике. Биосенсоры в новых приводящих устройствах.	Спектр наноматериалов, используемых в сенсорах, достаточно широк. К ним можно отнести следующие группы наноматериалов: — наночастицы, нанокластеры, нанокристаллы и квантовые точки, используемые в основном в оптических, в том числе и в биохимических сенсорах — иммуносенсорах, реже в электрохимических сенсорах; — нанотрубки, наностержни, наноленты, нанопроволоки, применяемые в первую очередь в электрических (эффект полевого транзистора) и электрохимических сенсоры, основанные на использовании наноразмерных организованных пленочных структур и самоорганизованные моно- и полислои, применяемые в основном в оптических, поверхностно-акустических и пьезокварцевых (объемноакустических) сенсорах. В качестве биосенсора может служить белковая система, обладающая двумя почти равными энергетическими состояниями. И присутствие молекулы-мишени должно регулировать, будет ли протекать реакция в сторону видимого ответа, например свечения или смены цвета.
13.Конструкции биосенсоров с использованием – ферментных электродов и иммобилизованных клеток микроорганизмов	Биосенсоры – аналитические систему для работы с биологическим веществом или систему, содержащую биологическое вещество, больше данных в пользу определения, согласно которому биосенсором называется аналитическая система, содержащая биологический материал (ферменты, клетки, антитела, антигены, рецепторы, фрагменты ДНК), который находится в непосредственном контакте или встроен в физикохимический датчик. В биосенсорных устройствах используются физико-

	химические преобразователи различных типов; оптические, акустические, кондуктометрические, калориметрические, электрохимические. Биосенсорными устройствами именуются и электронные, оптические или электронно-оптические элементы, содержащие компонент биологической системы. Причем этот элемент предназначен для работы именно в электронном или элетронно-оптическом устройстве. Светочувствительные биосенсоры – это устройства, содержащие в качестве рабочего материала те или иные фоточувствительные биологические структуры (макромолекулы, фоторецепторные мембраны и т. д.) и предназначенные для регистрации, преобразования и хранения оптической информации. Важнейшим элементом любого биосенсора является биологический чувствительный элемент (биоспецифическая поверхность, биодатчик, тест-объект.
14.Биосенсоры, содержащие моноклональные антитела, обладающие высокой избирательностью.	В качестве тест-объекта биосенсорного устройства могут быть использованы различные компоненты биологических систем – ферменты, антитела, антигены, нуклеиновые кислоты, рецепторы, клеточные органеллы, клетки, ткани, отдельные живые организмы и др. Ферменты – это наиболее популярные тест-объекты биосенсорных устройств. Ферменты пригодны для изготовления биосенсоров, предназначенных главным образом для определения содержания биогенных веществ. Антитела в биосенсорных устройствах как тест-объекты имеют основные достоинства. 1. Высокая селективность. 2. Высокая чувствительность, связанная с исключительно большим значением константы сродства антитела к антигену. 3. Возможность на основе реакции антиген-антитело определять содержание как антигенов, так и антител. 4. Относительная доступность материала, обусловленная тем, что ИФА интенсивно внедряется в практику. Среди недостатков укажем следующие: 1. Достаточно высокую стоимость. 2. Пригодность для анализа относительно ограниченного круга веществ
15.Определение «биомаркеры», как систем, отражающих события в организме или в биологической системе	Биологический маркер — это какой-либо параметр, который поддается достоверному измерению и по которому можно узнать что-либо о состоянии здоровья или смерти человека: например, о наличии заболевания, физиологического изменения, реакции на лечение или психологического расстройства. Биомаркеры используются для исследований in vitro, а также in vivo, которые могут включать людей. Обычно выделяют три конкретных типа биологических маркеров. биомаркеры воздействия, биомаркеры эффекта или биомаркеры чувствительности (**восприимчивости).**
16. Направления наномедицины: разработка методов адресной доставки лекарств к пораженным	Наномедицина – это «…слежение, исправление, конструирование и контроль над биологическими системами человека на молекулярном уровне с использованием разработанных наноустройств и наноструктур». Под этим термином сегодня понимают

клеткам.	применение нанотехнологий в диагностике, мониторинге и лечении заболеваний. Наномдицина включает: разработку чипов, адресную доставку лекарств к пораженным клеткам, создание новых бактерицидных и противовирусных средств, диагностику заболеваний с помощью квантовых точек. Способность молекул вещества попадать в теле пациента туда, где они необходимы, называется биологической усвояемостью или адресной доставкой. Создается транспортное средство" или макромолекула-транспортер. Он состоит из: лиганда, эндосомолитического модуля, сигнала внутриядерной локализации, собственно носитель лекарства.
17.Стратегии создания нанопрепаратов направленного действия. Преимущества и недостатки препаратов направленного действия.	Создание нанопрепаратов лежит в основе процесса направленного транспорта лекарственных препаратов, перенос токсического вещества, ковалентно или нековалентно связанного с векторной молекулой, в клетку-мишень в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза. Рецептор- это опосредованный эндоцитоз представляет собой сложный механизм, используемый клетками для выборочной интернализации белков цитоплазматической мембраны. Большинство этих белков являются рецепторами на клеточной поверхности для внеклеточных лигандов. Препараты направленного транспорта, представляют собой конъюгаты белка-вектора с лекарственным препаратом. В качестве молекулярного вектора для доставки препаратов в опухолевые клетки могут быть использованы некоторые факторы роста, гормоны и онкофетальные белки, в частности, альфа-фетопротеин (АФП). В качестве альтернативного подхода могут быть использованы препараты направленного действия в виде конъюгатов АФП с антисмысловыми олигонуклеотидами (АСОН) к мРНК генов, играющих ключевую роль в регуляции клеточной пролиферации и апоптоза.
18.Разработка нановакцин, конструирование иммуногенов и мини-антител, наноантител.	Нанометровые вакцинные конструкции — нановакцин содержат вакцинноценные белки, представленные во множестве копий на поверхности частиц размером 40–100 нм. Такие вакцинные наночастицы будут обладать безопасностью очищенных и синтетических вакцин и эффективностью, сравнимой с убитыми и даже живыми вакцинами. Однодоменные антитела (наноантитела) в отличие от классических иммуноглобулинов, представлены одним вариабельным доменом тяжелоцепочечного антитела. По сравнению с классическими IgG, наноантитела обладают такими качествами, как: высокая биологическая доступность, способность взаимодействовать с труднодоступными эпитопами, высокая растворимость, термостабильность, возможность получения в бактериальных системах экспрессии.
19. Химическое коньюгирование в наномедицине. Понятие	Для получения лекарств направленного действия используют процесс химического коньюгирования с различными химиопрепаратами – кролинкерами: хромогенными и

крослинкер»: крослинкеры нулевой длины, «гомобифункциональные крослинкеры, гетеробифункциональные крослинкеры, трифункциональные кослинкеры	флуоресцентными красителями, олигонуклеотидами, углеводами, пептидами и белками, синтетическими полимерами. Химическое коньюгирование позволяет формировать из двух или нескольких молекул комплексы, которые не только сочетают в себе свойства исхрдных компонентов но и отличаются уникальными свойствами. Крослинкеры «нулевой длины» обеспечивают образование ковалентной связи между двумя молекулами за счет атомов самих молекул. Гомобифункциональные крослинкеры представляют собой цепочки углеродных атомов различной длины, на обоих концах которых имеются идентичные реакционноспособные группы. Они способны связывать две молекуля белка, или белок с другой молекулой, имеющей одинаковые функциональные группы. Гетеробифункциональные крослинкеры,имеют на концах молекулы различные функциональные группы. Трифункциональные кослинкеры содержат в своей структуре три различных функциональных группы и позволяют получать коньюганты сразу трех соединений.
20.Флуоресцентное мечение наноструктур для диагностических систем. Коньюганты для диагностики и терапии.	Наиболее часто применяемым реагентом для флуоресцентного мечения белков является флуоресцеинизотиоцианат для модификации ε и N-концевых аминогрупп белков. Используют и другие реагенты: 6-флуоресцеин-5-карбоксамидо-сукцинимидный эфир капроевой кислоты. Флуоресцентными свойствами обладает и производные кумарина.
21.Антитела как молекулярные векторы. Меченые антитела в биомедицине.	Молекулярная антитела позволяют осуществлять доставку генов в клетки. Молекулярная антитела как векторы представляет собой частицы, в центре которых находится рекомбинантная плазмидная ДНК с доставляемым геном, а на поверхности - антитела к клеткам-мишеням. Антитела входят в состав конъюгата – лекарственного препарата, способного удерживать конъюгат на отрицательно заряженной ДНК за счет положительного заряда препарата и стимулировать проникновение молекул ДНК в эукариотические клетки. Меченые радиоактивным изотопом моноклональные антитела, обладающие сродством к рецепторам, расположенным на поверхности опухолевых клеток, могут быть использованы как для диагностики опухолей, так и для терапии. В качестве меток используют радиоактивные изотопы ^{125,131} I, B и другие.
22.Полимеры как переносчики терапевтических агентов. Применение полиэтиленгликолей в нанотехнологии и медицине..	При разработке наночастиц в качестве носителей терапевтических препаратов используют линейные и разветвленные полимеры: полиэтиленгликоль (ПЭГ) различной молекулярной массы, полиглутаминовая кислота, декстраны, циклодекстрины полиги-N(2дроксипропил-метакриламид). Химическое присоединение к ПЭГ увеличивает растворимость препаратов в биологических жидкостях, увеличивает биодоступность, время циркуляции в организме и уменьшает иммуногенность препарата. Для коньюгирования используют хорошо растворимые в воде и органических растворителях полиэтиленгликоли с

	молекулярной массой менее 20000 Да.
23.Кубосомы. Дискосомы: использование в бионанотехнологии	Кубосомы – это липидные структуры входящие в состав наночастиц, применяемых для транспортировки лекарственных средств. Кубосомы состоят из смеси липидов, образующих кубоподобные структуры. Они в структуре имеют непрерывный фрсфолипидный слой. Расстояние между единичными элементами кубосом около 20 нм. Размер кубосомы от 100 до 1000 нм. Используются для транспортировки лекарственных препаратов связанные в нанотранспортном средстве с кубосомой.
24.Липидные микротрубки. Липидные микропузырьки. Липосомы – типы, размеры, стерически стабилизированные липосомы, нацеленные липосомы.	Липидные микротрубки представляют собой полые цилиндрические структуры диаметром менее 1000 нм и длиной от 20 до 45 мкм. Стенки микротрубок образованы одним или двумя липидными бислоями. Липосомы представляют собой заполненные водной средой замкнутые наносферы. Оболочка липосом состоит из фосфолипидных слоев двуслойной мембраны. Диаметр липосом составляет от 20 нм (моноламеллярные везикулы, стенка которых состоит из одного бислоя) до 10-50 мкм (мультиламеллярные везикулы, стенка состоит из десятков или сотен бислоёв). Для доставки терапевтических средств используют pH-чувствительные, «нацеленные», стерически стабилизированные липосомы. Нацеленные липосомы несут на поверхности лиганды и антитела, узнающие рецепторы или антигены. Применяются в противоопухолевой терапии. Модифицированные ПЭГ липосомы называют «пэгилированными» или «стерически стабилизированными». Они не распознаются иммунной системой и недоступны макрофагам.
25.Полимерные нанокапсулы и наносферы. Полимерные мицеллы. Дендримеры	Нанокапсулы представляют собой полые, ограниченные замкнутой полимерной оболочкой наноразмерные сферы (100-500 нм). Внутри содержат водную или масляную среду. Полимерные полицианоакрилатные капсулы применяются в качестве носителей терапевтических препаратов. На поверхности нанокапсул иммобилизуют антитела или векторные молекулы. Наносферы представляют собой сплошные пористые шары, состоящие из природных (коллаген, крахмал, хитозан) или химически синтезируемых полимеров (полиалкилцианоакрилаты) или сополимеров молочной и гликолевой кислот. Используют как структурные композиты транспортных лекарственных средств. Полимерные мицеллы формируются в виде амфифильных блок-сополимеров, организующихся в виде наноразмерных структур, имеющих гидрофобный кор и гидрофльную оболочку. Это мицеллы сформированные из полиэтиленоксида и полипропиленоксида (ПЭО и ППО). Дендримеры представляют собой синтетические полимерные макромолекулы, состоящие из мономерных

	звеньев, выходящих из центрального кора за пределы наноструктуры. Дендримеры получают методом многоступенчатого химического синтеза. Они могут быть модифицированы векторными молекулами, антигенами и лекарственными препаратами.
26.Особенности нанотехнологических производств. Эффективность технологий миниатюризации аналитических систем.	Особенность нанотехнологических производств в использовании технологических методов и процессов для производства материалов, устройств и систем, а также управление химическим составом и взаимодействием составляющих элементов наноразмерного диапазона. Существует перспектива будущего применения аналитических микросистем. Развитие микрочиповых технологий связано с процессами миниатюризации приборов, используемых в различных отраслях. В зависимости от конкретных задач архитектура микросистемы может изменяться.
27.Лаборатории на чипе. Использование ДНК для создания наноструктур ДНК как шаблон для молекулярной электроники	Это микросистемы полного анализа — миниатюрный прибор, позволяющий осуществлять один или несколько многостадийных (био) химических процессов на одном чипе площадью от нескольких мм^2 до нескольких см^2 и использующий микро- или наноскопические количества образцов для пробоподготовки и проведения реакций. Лаборатории на чипе отличаются от обычных биомикрочипов, выполняющих, одну реакцию: осуществляют последовательные химические превращения исходных образцов, включая стадии разделения, концентрирования, смешивания промежуточных продуктов, перемещения их в различные реакционные микрокамеры и считывания конечных результатов.
28.ДНК как возможный компонент компьютеров следующего поколения.	Молекулы ДНК - материал, из которых состоят гены, могут выполнять вычисления во много раз быстрее, чем самые мощные в мире компьютеры. ДНК-компьютеры имеют потенциал для того, чтобы вывести компьютер на новые уровни. Существует несколько преимуществ использования ДНК вместо кремния: - неограниченные запасы ДНК; - большой запас ДНК делает его дешевым ресурсом; - в отличие от токсичных материалов, используемых для изготовления традиционных микропроцессоров, биочипы ДНК могут быть сделаны более экологичными способами; - ДНК-компьютеры во много раз меньше современных компьютеров. Более 10 триллионов молекул ДНК могут входить в область размером не более 1 кубического сантиметра. С помощью этого небольшого количества ДНК компьютер мог бы хранить 10 терабайт данных и выполнять 10 триллионов вычислений за раз. Добавив больше ДНК, можно было бы провести еще больше расчетов.
29.Задачи нанобиотехнологии по решению ключевых проблем медицины, здравоохранения,	В качестве задач нанобиотехнологии выделяют: - разработка микроустройств (микрочипов, биосенсоров) для диагностики заболеваний, создания наноинструментов и наноманипуляторов;

сельского хозяйства, наноэлектроники, защиты окружающей среды, национальной обороны и безопасности	- разработка микро- и наноустройств различной степени автономности (Микророботы и нанороботы) для терапевтических методов; - разработка наноструктур и нанопрепаратов для адресной доставки лекарств к пораженным клеткам - создание новых бактерицидных и противовирусных средств, включающих наноматериалы и наночастицы - создание нейроэлектронной системы сознания, осуществляющей взаимодействие центральной нервной системы и искусственного интеллекта, созданного на основе достижений наноэлектроники.
30. Возможные риски, связанные с использованием нанобиотехнологии Высокая проникающая способность наночастиц и их склонность встраиваться в биотехнологические объекты	Высокое соотношение поверхности к объему и, соответственно, высокий процент атомов на поверхности — главный фактор, определяющий различие в поведении и свойствах нано- и микрочастиц. Поверхностные атомы связаны с меньшим числом соседних, и поэтому обладают избыточной энергией, что делает их свойства (а значит, и свойства наночастиц в целом) отличными от свойств атомов в толще материи. некоторые выводы: - разовое поступление нанообъектов в организм вызывает нежелательные изменения, интенсивность которых зависит от концентрации нанообъектов; - нанообъекты имеют свойство накапливаться в органах и тканях (костном мозге, нервных клетках центральной и периферической нервных систем, лимфоузлах, мозге, легких, печени, почках).

Тестовые вопросы по дисциплине

Вопрос 1. Наука нанобиотехнология изучает

А Изучает воздействие объектов нанодиапазона на биологические объекты и их использование в практических целях

Б. Область фундаментальной и прикладной науки и техники изучающий контролируемое манипулирования отдельными атомами и молекулами

В. Получение полезных продуктов с использованием микроорганизмов

Вопрос 2. Нанобиотехнология включает в себя следующие разделы

А. Энзимология

Б. Наномедицина

В. Биомиметика

Г. Разработка доставки соединений в живые системы

Вопрос 3. Молекулярная наномедицина это

А. Применение нанотехнологий в диагностике, мониторинге и лечении заболеваний

Б. Диагностика заболеваний с использованием методов ПЦР

В. Создание новых бактерицидных и противовирусных средств

Вопрос 4. Медицинские нанотехнологии включают следующие направления исследований

А. Разработку чипов

Б. Адресную доставка лекарств к пораженным клеткам
В. Создание новых бактерицидных и противовирусных средств
Г. Диагностику заболеваний с помощью квантовых точек
Д. Все ответы верны

Вопрос 5. В 1988 году первую наномедицинскую концепцию нанороботa для чистки артерий предоставил
А. А.К.Дьюдни
Б. Я.В. Соловьев
В. Дж. Герфид

Вопрос 6. Микросистему полного анализа многократного анализа, использующую микро- или наноскопические количества образцов для пробоподготовки и проведения реакций называют
А. Биомикрочип
Б. Наночип
В. Лаборатория на чипе

Вопрос 7. Способность молекул вещества попадать в теле пациента туда, где они необходимы называется
А. Биологическая усвояемость
Б. Нановпитывемость
В. Эффективность

Вопрос 8. Почему простое увеличение дозы лекарства не дает улучшения эффекта от лечения:
А. Возникает токсичность
Б. Снижается эффективность
В. Избыток лекарства взаимодействует с клетками организма и это неконтролируемый процесс

Вопрос 9. Метод и способы привнесения искусственных наноразмерных частиц, различных материалов и интерфейсов в живые системы называют
А. Адресной доставкой
Б. Наномедициной
В. Биомиметикой
Г. Бионаночипами

Вопрос 10. Основные преимущества лаборатории на чипе
А. простота использования
Б. низкая скорость проведения анализа
В. малое количество образцов и реагентов, необходимых для получения результата
Г. хорошая воспроизводимость результатов благодаря использованию стандартных технологий и автоматизированного оборудования.
Д. Длительность процедуры
Е. Его могут использовать только высоко квалифицированные сотрудники

Вопрос 11. Молекула транспортер состоит из нескольких функциональных модулей
А. Лиганд, Эндосомолитический модуль, Сигнал внутриядерной локализации, Носитель лекарства

Б. Пептидный хвост, Эндосомолитический модуль, Сигнал внутриядерной локализации, Носитель лекарства.

В. Пептидный хвост, Эндосомолитический модуль, Стабилизатор, Носитель лекарства

Вопрос 12. За обнаружение больной клетки отвечает

А. Пептидный хвост
Б. Эндосомолитический модуль
В. Метка
Г. Лиганд
Д. Лекарственное средство

Вопрос 13. Разрыв эндосомы при втягивании транспортера в клетку вызывает:

А. Пептидный хвост
Б. Эндосомолитический модуль
В. Метка
Г. Лиганд
Д. Лекарственное средство

Вопрос 14. Модуль, который позволяет транспортеру проникнуть через поры ядерной мембраны

А. Лиганд,
Б. Эндосомолитический модуль,
В. Сигнал внутриядерной локализации,
Г. Носитель лекарства

Вопрос 15. Один из методов доставки лекарственных средств является использование

А. Нанооболочек
Б. Нанокапсулы
В. Биоточек

Вопрос 16. В чем эффект использования нанооболочек

А. Селективное поглощение инфракрасных частот для нагрева транспортера локально
Б. Флуоресценция
В. Краситель для нахождения молекулы лекарства

Вопрос 17. Нагрев нанооболочек приводит

А. К разрушению полимерной оболочки
Б. К выходу лекарственного вещества
В. К действию лекарство строго локально

Вопрос 18. Квантовые точки в бионанотехнологии это

А. полупроводниковые кристаллы нанометрового размера, имеющие уникальные химические и физические свойства, не характерные для тех же веществ в макромасштабе
Б. Флуорисцирующие метки
В. Маркеры для биомолекул
Г. Верны все утверждения

Вопрос 19. Верно ли утверждение, что одним источником можно выявить разные группы квантовых меток?

А. Верно

Б. Не верно
В. Верно, но они должны быть все в одной клетке

Вопрос 20. Квантовые точки в качестве люминесцирующих маркеров помогают:
А. Разрушать мембраны живых клеток
Б. Разрушать полимерные оболочки
В. Отслеживать перемещение лекарственных средств
Г. Обнаруживать целевые молекулы

Вопрос 21. В качестве микророботов предложено использовать кристаллы:
А. Алмазоида
Б. Наносеребра
В. Нанозолота

Вопрос 22. Искусственные тромбоциты
А. Адаманты
Б. Алмазоиды
В. Клоттоциты

Вопрос 23. Действие искусственных тромбоцитов основано на:
А. Разрушении оболочки, Выделении волокнистого материала, Иммобилизации эритроцитов на волокна
Б. Выделении волокнистого материала, Иммобилизации эритроцитов на волокна, Разрушении оболочки
В. Выделении тромбоцитов в кровь

Вопрос 24. Наноробот предназначен для циркуляции в кровотоке и фагоцитоза патогенных вирусов, бактерий и грибов
А. Наноцит
Б. Клоттоцит
В. Микрофагоцит

Вопрос 25. Респироцит это сферический сосуд их алмазоподобного материала, который способен:
А. Переносить в 256 раз больше кислорода
Б. Останавливать кровотечение в течении нескольких секунд
Г. Уничтожать патогенные вирусы в крови

Вопрос 26. К нанороботам относят
А. Наноцит
Б. Клоттоцит
В. Микрофагоцит
Г. Респироцит
Д. Все ответы верны

Вопрос 27. Способ использования нанотрубок для доставки и высвобождения лекарственных веществ:
А. Сорбирование активных молекул препарата
Б. Химическое присоединение лекарства
Г. Разрушение мембраны живых клеток
Д. Разрушение полимерные оболочки

Вопрос 28. Является ли бактериальная целлюлоза наноматриалом?

А. Да

Б. Нет

Вопрос 29. Биомиметика

А. Повторение свойств природного объекта

Б. Создание новых наноматериалов

В. Использование новых конструкционных материалов

Вопрос 30. ДНК-процессоры, использующие способность ДНК к хранению информации

А. Биочип

Б. Наноцит

В.. Клоттоцит

Г. Микрофагоцит

Ключ к вопросам теста по дисциплине «Нанобиотехнологии»

1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
А	Б, В, Г	А	Д	А	В	А	А	А	А,В,Г
11	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**
А	Г	Б	Г	А	А	А	Г	А	В, Г
21	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**
А	В	А	В	А	Б,В,Г	А,Б	А	В	А

Дисциплина «Биоконверсия в биотехнологических процессах»

Задания в открытой форме

1. Дайте определение биоконверсии
2. Назовите преимущества биоконверсии по сравнению с химическими процессами
3. Какое сырье использую для биоконверсии?
4. Что является катализатором в химических реакциях биоконверсии?
5. Назовите ферменты класса гидролаз, которые используют в процессах биоконверсии?
6. Назовите источники ферментов для биоконверсии
7. Назовите основные группы микроорганизмов, осуществляющих биоконверсию в пищевой биотехнологии
8. Приведите примеры ферментов, осуществляющих биоконверсию отходов деревообрабатывающей промышленности
9. Какие превращения происходят в процессе подготовки сырья для пивоваренной промышленности?
10. Назовите ферменты и биохимические процессы, происходящие при биоконверсии крахмала в глюкозо-фруктозные сиропы
11. Какие процессы осуществляют микроорганизмы при биоконверсии растительного сырья в ацетон и бутанол?
12. Какие процессы биоконверсии происходят при компостировании органических отходов?
13. Назовите три стадии компостирования, соответствующие изменениям температуры
14. Назовите ферменты и получаемые продукты при биоконверсии крахмала
15. Назовите ферменты и получаемые продукты при получении солода и пивного сусла

16. Назовите ферменты и получаемые продукты при биоконверсии сырья в спиртовой промышленности
17. Какие технологии биоконверсии используются при комплексной переработке винограда (включая гребни)?
18. Назовите сырье и микроорганизмы для получения уксусной кислоты
19. Перечислите углеводсодержащие отходы, используемые для биоконверсии в белоксодержащую биомассу
20. Перечислите не углеводсодержащее сырье, используемое для биоконверсии в белоксодержащую биомассу
21. Какие микроорганизмы осуществляют биоконверсию сырья с получением биогаза?
22. Перечислите основные процессы биоконверсии при силосовании кормов
23. Перечислите основные процессы биоконверсии при получении биотоэтанола.
24. Какие микроорганизмы перспективны для биоконверсии с получением биотоплива?
25. Для каких целей используется биотрансформация в производстве антибиотиков?
26. Каким образом может использоваться биоконверсия для получения металлов из отвалов горнообогатительных комбинатов?
27. Приведите пример биоконверсии с использованием ферментов животного происхождения
28. Перечислите небиологические методы обработки сырья, используемые в биоконверсии
29. Перечислите пентозансодержащее сырье, подлежащее биоконверсии
30. Как и за счет чего биоконверсия влияет на безопасность отходов?

№ п/п	Вопрос	Варианты ответа
1.	Дайте определение биоконверсии	Превращение органических материалов, таких как отходы растений или животных, в пригодные для использования продукты или источники энергии с помощью биологических процессов или агентов, таких как определенные микроорганизмы.
2.	Назовите преимущества биоконверсии по сравнению с химическими процессами	1. Возможность ферментов и микроорганизмы осуществлять практически неограниченную биосинтетическую деятельность и потенциал деградации или трансформации (превращения) различных материалов с целью получения полезных продуктов для различных нужд человека. 2. эффективных технологий переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов для получения продуктов, которые могут использоваться в других отраслях хозяйственной деятельности человека, что невозможно с помощью химических катализаторов 3. экологичность процессов
3.	Какое сырье использую для биоконверсии?	Сырьем для биоконверсии являются: - растительные продукты или отходы сельскохозяйственного производства - отходы химической промышленности - газообразные продукты нефтедобывающей отрасли (газы).
4.	Что является катализатором в химических	Катализаторами являются: - чистые или комплексные ферментные препараты микробного происхождения

	реакциях биоконверсии?	- ферменты культур микроорганизмов, используемых в процессах биоконверсии
5.	Назовите ферменты класса гидролаз, которые используют в процессах биоконверсии?	Амилазы находят применение почти во всех областях, где перерабатывается крахмалсодержащее сырье. Для биоконверсии используют ферменты, расщепляющие крахмал – -а-амилазы и β-амилазы, Пектолитические ферменты широко используются в различных отраслях народного хозяйства: для переработки плодов, ягод и овощей. Ферментные препараты целлюлазы и гемицеллюлазы применяют в производстве спирта, пивоварении и др., где сырьем являются растительные материалы или отходы переработки растений. Препараты цитолитического действия: «Целловиридин Г20х», «Целловиридин Г3х», «Целлоконингин П10х», Препараты гемицеллюлазного действия: «Ксилоглюканофоетидин П10х», «β-Глюканаза Г10х».
6.	Назовите источники ферментов для биоконверсии	Главными источниками ферментов для биоконверсии являются микроорганизмы - мицелиальные грибы рода *Aspergillus* и бактерии рода *Bacillus,* пророщенные семена злаков, семена растений, биологические жидкости. Извлекают ферменты из этих объектов посредством экстрагирования водой, водными растворами глицерина, нейтральных солей, буферными растворами при одновременном механическом разрушении клеточных структур.
7.	Назовите основные группы микроорганизмов, осуществляющих биоконверсию в пищевой биотехнологии	В хлебопечении для биоконверсии используют дрожжевые грибы рода *Saccharomyces* и молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*. Для приготовления вина и пива используют дрожжевые грибы рода Saccharomyces и ферменты β-амилазы. В сыроделии применяли пропионовислые бактерии и плесневые грибы рода *Penicillium.*
8.	Приведите примеры ферментов, осуществляющих биоконверсию отходов деревообрабатывающей промышленности	Комплексная малоотходная технология биоконверсии целлюлозосодержащих материалов представляет собой производство, включающее стадии превращения целлюлозы растительного сырья в готовые продукты: ферментативный гидролиз с использованием целлюлаз грибов рода *Trichoderma* и превращение продуктов ферментации в полезные продукты: спирт, кормовой белок.
9.	Какие превращения происходят в процессе подготовки сырья для пивоваренной промышленности?	При подготовке среды -сусла в качестве сырья используют солод – пророщенные семена ячменя. Под действием ферментов альфа и β-амилаз солода происходит гидролиз крахмала солода. В результате осахаривания солода образуются моно- и дисахариды, которые являются источников углерода для спиртового брожения. Альфа-амилаза также расщепляет молекулы крахмала. Пептидаза отвечает за высвобождение азота.

		Протеиназа способна подарить пивовару напиток со стойкой пеной и повышенной плотностью. Бета-глюконаза расщепляет бета-глюканы.
10.	Назовите ферменты и биохимические процессы, происходящие при биоконверсии крахмала в	Первый этап – гидролиз крахмала проводят с использованием а-амилаз и β-амилаз. Превращение глюкозы во фруктозу осуществляют с использованием фермента глюкозоизомеразы.
11.	Какие процессы осуществляют микроорганизмы при биоконверсии растительного сырья в ацетон и бутанол?	При биоконверсии растительного сырья в ацетон и бутанол происходит ацетоново-бутиловая форма маслянокислого брожение. Процесс биоконверсии осуществляют представители рода *Clostridium: C.pectinovorum, C. Acetobutilicum.*
12.	Какие процессы биоконверсии происходят при компостировании органических отходов?	Процесс компостирования представляет собой сложное взаимодействие между органическими отходами, микроорганизмами, влагой и кислородом. В отходах обычно существует своя эндогенная смешанная микрофлора. Потребляя органические отходы как пищевой субстрат, микроорганизмы размножаются и продуцируют воду, диоксид углерода, органические соединения и энергию. Часть энергии, получающейся при биологическом окислении углерода, расходуется в метаболических процессах, остальная – выделяется в виде тепла.
13.	Назовите три стадии компостирования, соответствующие изменениям температуры	В процессе компостирования принимает участие множество видов бактерий (более 2000) и не менее 50 видов грибов. Эти виды можно подразделить на группы по температурным интервалам, в которых каждая из них активна. Каждая его стадия характеризуется различными консорциумами организмов. Фазы компостирования состоят из: 1. мезофильной фазы (mesophilic phase), 2. термофильной фазы (thermophilic phase), 3. фазы созревания (final phase).
14.	Назовите ферменты и получаемые продукты при биоконверсии крахмала	Ферменты для крахмала – это бактериальные препараты на основе альфы-амилазы (амилосубтилин) и глюкоамилазы (глюкаваморин) и глюкамилазы.. Амилосубтилин – разжижающий фермент, который разрывает молекулу крахмала на олигосахара и декстрины, для дальнейшего превращением их в глюкозу. Глюкаваморин – осахаривающий фермент, превращающий продукты первичного разжижения крахмала в глюкозу. Крахмал сначала нужно обработать α-амилазой и затем глюкоамилазой
15.	Назовите ферменты и продукты гидролиза при получении пивного сусла из солода	Гидролиз крахмала начинается при солодоращении. При затирании крахмал проходит три стадии: клейстеризацию, разжижение и осахаривание. Собственно гидролиз крахмала (осахаривание) представляет собой разжижение крахмального клейстера, которое сопровождается

		накоплением в среде декстринов, мальтозы и глюкозы. Схематически гидролиз крахмала можно представить: Крахмал – Амилодекстрины - Эритродекстрины - Ахродекстрины - Мальтодекстрины - Мальтоза - Глюкоза.
16.	Назовите ферменты и получаемые продукты при биоконверсии сырья в спиртовой промышленности	Ферментные препараты с относительно низкой оптимальной температурой действия целесообразно использовать на стадии осахаривания. Это относится к препаратам с основной активностью α-амилазы: Амилосубтилину, Амилоризину, солоду) и препаратам глюкоамилазы. Амилолитический комплекс солода и грибная α-амилаза более глубоко расщепляют крахмал, чем бактериальная α-амилаза, но полное осахаривание достигается только с помощью глюкоамилазы., Глюкаваморин.
17.	Какие технологии биоконверсии используются при комплексной переработке винограда (включая гребни)?	Основной биохимический процесс, протекающий в плодово-ягодной мезге и соке при их обработке пектолитическими препаратами или при совместном применении термической и ферментативной обработки, – гидролиз пектиновых веществ. Среди промышленных продуцентов пектолитических ферментов следует отметить *A. niger, A. wenti, A. oryzae, A. foetidus, P. Expansum, P. Italicum, Rhizopus* spp. Ферментный препарат глюкозооксидаза применяют с целью улучшения качества и стабилизации плодово-ягодных соков, вин, и безалкогольных напитков за счет удаления кислорода в результате реакции окисления глюкозы. Применение мацерирующих ферментов. Гемицеллюлаза и целлюлаза способствуют получению однородной консистенции соков с мякотью.
18.	Назовите сырье и микроорганизмы для получения уксусной кислоты	Для производства уксуса немецкис способом субстратом для подготовки питательной среды являются сахара и этанол. Для орлеанского способа используют продукт спиртового брожения растительного сырья с последующим окислением до уксусной кислоты. К возбудителям уксуснокислого окисления относят бактерии родов *Acetobacter* и *Gluconobacter*.
19.	Перечислите углеводсодержащие отходы, используемые для биоконверсии в белоксодержащую биомассу	Кормовые дрожжи, культивированные на нефтяных парафинах называются папринами. Сырьем служат неразветвленные углеводороды С10-С18 и С14-С19. Для получения н-парафинов, нефть необходимо перегнать до жидких фракций парафинов с температурами кипения 200-320°С. Именно от степени очистки нефти зависит качество кормовых дрожжей. На н-парафинах способны синтезировать белок как и дрожжи так и бактерии. Однако в технологическом производстве используются дрожжи. Лучшими продуцентами являются родов Candida (Candida maltosa, Candida guilliermondii, Candida lipolytica).
20.	Перечислите не углеводсодержащее сырье,	У углеводсодержащим субстратам для производства белка относят целлюлозосодержащие субстраты: измельченную солому, сенную муку, пшеничные отруби, кукурузный

	используемое для биоконверсии в белоксодержащую биомассу	стебель, свекольную пульпу, т.е. продукты, которые обычно в натуральном виде являются компонентами рационов животных и человека.
21.	Какие микроорганизмы осуществляют биоконверсию сырья с получением биогаза?	На целлюлозосодержащем субстрате биогаз образует консорциум микроорганизмов, осуществляющих биоконверсию. В состав консорциума входят представители *Bacteria* (на первом этапе сбраживания и ацидогенеза) и метаногенные *Archaea Methanoculleus и Methanosarcina* и другие.
22.	Перечислите основные процессы биоконверсии при силосовании кормов	Силосование (от испанского silos – яма) – это биологический метод консервирования кормов, в основе которого лежит молочнокислое брожение. 1. Холодный способ – проходит при температуре 25-35 градусов. 2. Горячий способ – проходит при температуре 50 ºС. При этом корм укладывают рыхло и постепенно, что создает условия для более бурного развития микробиологических процессов. Молочнокислые бактерии. Возбудителей молочнокислого брожения. Аммонификаторы (гнилостные микробы) – всегда имеются на поверхности растений. Они вызывают энергичное разложение белков в начале процесса силосования, когда pH более 4,5-4,7.
23.	Перечислите основные процессы биоконверсии при получении биоэтанола	Для получения биоэтанола используют растительное сырье, содержащее целлюлозу, пектиновые вещества, гемицеллюлозы. Процесс биоконверсии идет с участием бактерий – возбудителей маслянокислого брожения. При этом брожении образуется масляная кислота, этанол, водород.
24.	Какие микроорганизмы перспективны для биоконверсии с получением биотоплива?	Биобутанол – как топливо используется при обогащении топлива, повышении октанового числа. Продуценты бутанола бактерии рода *Clostridium*. Они хорошо сбраживают растительные субстраты: солому, стебли кукуруза, подсолнечника. Для сбраживаемости древесных субстратов бактериями рода *Clostridium* проводят предварительную биоконверсию остатков древесины актиномицетами.
25.	Для каких целей используется биотрансформация в производстве антибиотиков?	В основе борьбы с адаптацией (устойчивостью) микроорганизмов к препаратам лежит производство новых либо модификация уже существующих антибиотиков ферментативным способом (их «ядра» получают путем ферментного удаления боковых групп молекул антибиотиков). Антибиотики в процессе ферментативной трансформации превращаются в ценные промежуточные соединения, которые затем используются для создания новых менее дорогих антибиотиков. Биоконверсия методом твердофазной ферментации в массе субстрат. В промышленных масштабах ТФФ традиционно применяется при производстве антибиотиков, например, с использованием мицелиальных грибов. В настоящее время одной из нерешенных проблем прямой биоконверсии растительного сырья является отсутствие конструкций

		ферментаторов, обеспечивающих возможность крупнотоннажного производства кормовых добавок и необходимую эффективность процесса.
26.	Каким образом может использоваться биоконверсия для получения металлов из отвалов горнообогатительных комбинатов	Технология биологического выщелачивания может быть реализована в различных формах: чанового, кучного, подземного. Биологическое выщелачивание основано на способности микроорганизмов окислять сульфидные минералы с высвобождением металлов в раствор. Перспективность разработок в этой области связана с увеличением глубины переработки руд, привлечением новых ранее не использовавшихся типов сырья, экологической безопасностью создаваемых технологий.
27.	Приведите пример биоконверсии с использованием ферментов животного происхождения	Сычужный фермент животного происхождения — специальное вещество, которое используется для быстрого свертывания молока при производстве сыров и творога. Лизоцим по своему происхождению — белковый препарат и является натуральным ферментом класса гидролаз, Трипсин - фермент класса гидролаз, расщепляющий пептиды и белки; обладает также эстеразной (гидролиз сложных эфиров) активностью.
28.	Перечислите небиологические методы обработки сырья, используемые в биоконверсии	Небиологические методы обработки сырья используют при гидролиедревесных субстратов. – - Это химический гидролиз серной и соляной кислот. - Кислотно_катализируемый метод с паровым взрывом - Шелочной метод обработки растительного сырья. - Механо-химические методы предобработки
29.	Перечислите пентозансодержащее сырье, подлежащее биоконверсии	Петозансодержащее сырье - это древесина, преимущественно хвойная, подвергается гидролизу в присутствии серной кислоты. Процесс проводят при температуре от 170 до 195°С и рабочем давлении 8-12 атм. После гидролиза гидролизаты используются для получения спирта или кормового белка.
30.	Как и за счет чего биоконверсия влияет на безопасность отходов?	Биоконверсия отходов лесопромышленных предприятий и предприятий переработки сельскохозяйственного сырья (целлолигнина) является новой технологией, не имеющей аналогов в отечественном и зарубежном промышленных производствах. Однако на практике, особенно отечественной, широко распространена технология химической конверсии целлолигнина, преследующая те же цели, что технология биоконверсии — превращение целлюлозы в сахаристые вещества. Основными недостатками процесса перколяционного гидролиза древесины являются образование крупнотоннажного отхода — лигнина и низкое качество гидролизата с точки зрения микробиологического синтеза: наличие в смеси и пентоз, и гексоз, а также заметных количеств ингибирующих примесей, ограничивает

Тестовые вопросы по дисциплине

№ п/п	Вопрос	Варианты ответа
1.	Биоконверсия – это:	1. Превращение одних органических соединений в другие вследствие воздействия неорганических веществ на исходное сырье; 2. Превращение одних органических соединений в другие вследствие воздействия ферментных систем микроорганизмов; 3. Превращение одних органических соединений в другие вследствие воздействия гормональных препаратов животного происхождения; 4. Превращение одних органических соединений в другие вследствие воздействия физических факторов окружающей среды. 5. Превращение органических материалов, таких как отходы растений или животных, в пригодные для использования продукты или источники энергии с помощью биологических процессов или агентов, таких как определенные микроорганизмы.
2.	К биоконверсии не относится:	1. Брожение (продуктами являются спирты и органические кислоты); 2. Изомеризация (превращение глюкозы во фруктозу); 3. Получение стероидных гормонов (из гидрокортизона получают преднизалон). 4. Разделение рацематной смеси 5. Получение кормового белка; 6. Получение БАВ (гормонов, антибиотиков, витаминов); 7. Очистка сточных вод; 8. Вермикультивирование (природная биоконверсия).
3.	Для биотрансформации справедливы все утверждения, кроме:	1. Процесс изменения химической структуры вещества под действием ферментативной активности микроорганизмов или ферментных препаратов. 2. В процессе биотрансформации обычно не происходит накопления клеток микроорганизмов, а химическая структура вещества меняется незначительно. 3. Вещество как бы уже в основном готово, биотрансформация осуществляет его химическую модификацию: добавляет или отнимает радикалы, гидроксильные ионы, де- гидрирует и т. п. 4. В процессе биотрансформации происходит расщепление вещества до углекислого газа и воды 5. В биотрансформации обычно участвует один определенный фермент, катализирующий окисление, декарбоксилирование, метилирование и другие реакции
4.	Для биокатализа справедливы все утверждения, кроме:	1. Ускорение с помощью ферментов химических реакций, протекающих в живых организмах. 2. Процессы, протекающие в клетке при участии каталаз 3. Ускорение химических реакций с помощью ферментов, синтезируемых микроорганизмами непосредственно в процессе биокатализа

		4. Ускорение химических реакций с помощью ферментных препаратов 5. Высокоэффективный процесс, специфичный и, в отличие от химического катализа, происходит в более «мягких» условиях, т.е. условиях, свойственных живому организму (температуре, давлению, реакции среды и т.д.).
5.	Для биодеградации справедливы все утверждения, кроме:	1. Деструкция вредных соединений под воздействием микроорганизмов-биодеструкторов 2. Процесс обезвреживания ксенобиотиков в экобиотехнологии 3. Разрушение сложных веществ, материалов, продуктов в результате деятельности живых организмов 4. Один из основных механизмов уничтожения отходов деятельности человека в природе: как отходов, собственно, жизнедеятельности, так и промышленных отходов 5. Процессу разрушения отходов, попавших в окружающую среду, с помощью живых микроорганизмов 6. Процесс расщепления полимеров гидролитическими ферментами
6.	В промышленной биотехнологии биоконверсия не осуществляется при:	1. Подготовке сырья 2. Получении целевого продукта 3. На стадии выделения 4. Для утилизации отходов
7.	Основными источниками сырья для биоконверсии являются:	1. Отходы металлургической промышленности; 2. Отходы авиационного приборостроения; 3. Сырье и отходы пищевой промышленности; 4. Отходы химической промышленности. 5. Отходы деревообрабатывающей промышленности 6. Отходя сельскохозяйственной промышленности
8.	Гидролазы – это класс ферментов, которые катализируют:	1. реакции расщепления полимеров без участия воды; 2. окислительно-восстановительные реакции; 3. реакции расщепления полимеров с участием воды; 4. еакции биосинтеза органических веществ.
9.	Фермент α-амилаза ускоряет реакции гидролиза:	1. фосфолипидов; 2. крахмала; 3. миозина; 4. нуклеиновой кислоты 5. целлюлозы
10.	Целлюлаза ускоряет реакции гидролиза:	1. фосфолипидов; 2. белка миозина; 3. целлюлозы; 4. нуклеиновой кислоты; 5. крахмала

11.	Фермент протеаза ускоряет реакции гидролиза:	1. фосфолипидов; 2. крахмала; 3. нуклеиновой кислоты; 4. белка; 5. пектиновых веществ
12.	Фермент пектиназа ускоряет реакции гидролиза:	1. фосфолипидов; 2. миозина; 3. пектина; 4. гемицеллюлозы 5. нуклеиновой кислоты.
13.	Биоконверсия сахаров в промышленности осуществляется в основном путем:	1. спиртового брожения; 2. пропионовокислого брожения; 3. гниения; 4. молочнокислого брожения; 5. фотосинтеза.
14.	Для производства этилового спирта в качестве исходного сырья применяется:	1. отходы деревообрабатывающей промышленности; 2. отходы пищевой промышленности; 3. зерно злаковых культур; 4. отход нефтедобывающей промышленности.
15.	Амилолитический ферментный комплекс применяется в процессе производства этилового спирта для:	1. охлаждения исходного сырья; 2. гидролиза крахмала в исходном сырье; 3. синтеза белков; 4. расщепления жирных кислот. 5. для утилизации отходов
16.	Для биотехнологического производства гидролитических ферментов амилаз, применяемых в спиртовой промышленности, используют следующие живые организмы:	1. вирусы; 2. цианобактерии; 3. актиномицеты; 4. базидиальные грибы; 5. грибы рода Aspergillus 6. бактерии рода Bacillus
17.	Для получения пивного сусла из смешанного сырья применяют биоконверсию ферментами класса:	1. гидролаз (амилазы, протеазы); 2. изомераз; 3. лиаз; 4. оксидоредуктаз 5. трансфераз.
18.	Компостирование зеленой массы растений подвергается	1. Консервирования 2. Деструкции пестицидов 3. Повышения биологической ценности 4. Получения органических кислот

	биоконверсии с целью:	
19.	В промышленной биотехнологии в качестве крахмалосодержащего сырья, как правило после биоконверсии, не используют:	1. зерно и муку пшеницы 2. зерно и муку ржи 3. зерно и мука тритикале 4. картофель 5. зерно и мука кукурузы 6. зеленую массу люцерны
20.	Целлюлозосодержащие отходы, подвергающиеся биоконверсии, все, кроме:	1. Подсолнечная лузга 2. Гребни винограда 3. Кукурузные кочерыжки 4. Опилки 5. Стружки 6. Соевый шрот
21.	Биоконверсия трудноутилизируемых субстратов предполагает использование:	1. парафина 2. метана 3. метанола 4. мелассы 5. лигнина 6. коричневого сока
22.	Биополимеры синтезируемые микроорганизмами, которые используются для приготовления тонкой пленки для упаковки продуктов:	1. ксантан 2. желатин 3. декстран 4. поллулан 5. коллаген
23.	Отходы лесного хозяйства и деревообрабатывающей промышленности подвергаются биоконверсии с целью:	1. Утилизации 2. Повышения биологической ценности для использования в кормопроизводстве 3. Производства биотоплива 4. Выращивания грибов 5. Получения этилового спирта 6. Производства витаминов
24.	Биоконверсия в пищевой промышленности осуществляется при:	1. получении солода и пивного сусла. 2. комплексной переработке зерна. 3. получении глюкозо-фруктозных сиропов. 4. комплексной переработке винограда и фруктов. 5. в спиртовой промышленности. 6. получении растительного масла
25.	Биоконверсия в сельскохозяйственных биотехнологиях применяется при:	1. силосовании кормов; 2. производстве безвирусных растений; 3. компостировании растительных отходов; 4. получении биоудобрений и средств защиты растений; 5. производстве кормовых дрожжей.
26.	С применением биоконверсии	1. Биошроты; 2. Послеспиртовая барда;

	производят утилизацию и переработку промышленных отходов, кроме:	3. Отходы свеклосахарного производства 4. Отходы лакокрасочного производства 5. Целлюлозосодержащие отходы. 6. Жиросодержащие сточные воды.
27.	Обработка плодово-ягодного сока пектолитическим ферментным препаратом используется для:	1. понижения интенсивности окраски; 2. увеличения количества полисахаридов; 3. осветления сусла; 4. понижения выхода экстрактивных веществ.
28.	При температуре выше 64°С в компосте активно выделяются экзоферменты (гемицеллюлазы, лигниназы и целлюлазы) микроорганизмом:	*1. Thermomyces lanuginosus* *2. Trichoderma lignorum* 3. *Actinobifida chromogena* 4. *Streptomyces thermovulgaris* *5. Bacillus subtilis*
29.	Увеличить скорость и интенсивность образования гумусовых кислот при компостировании осадков сточных вод можно при внесении препаратов:	1. *Bacillus*, 2. *Lactobacillus*, 3. *Trichoderma*, *4. Candida* 5. Все перечисленные
30.	Количество микроскопических грибов в компосте при повышении температуры	1. Уменьшается 2. Увеличивается 3. Остается без изменений

Ключ к тестовым заданиям:

№ вопроса	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Ответ	2	4	4	2	6	3	3,6	3	2	3
№ вопроса	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**
Ответ	4	3	1,4	1,3	2	5,6	1	1,2,3	6	6
№ вопроса	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**
Ответ	1,2,3,5	1,4	1,2,4,5	6	1,3,4,5	4	3	1	5	1

Дисциплина «Методы конструирования плазмидных и вирусных векторов»

Задания в открытой форме

1. Перечислите принципиально новые методы генетической трансформации продуцентов, позволяющие получить нужные признаки.
2. Охарактеризуйте принципиальное отличие традиционной селекции от генной инженерии.
3. Как проводят модификацию генетического материала *in vivo?*
4. Регуляция экспрессии генов и оперонов.
5. Перечислите ферментативные системы в конструировании векторных молекул.
6. Ковалентное лигирование «липких» и «тупых» концов при конструировании векторов.
7. Конструирование полилинкеров мультиклональных сайтов рестрикции
8. Постановка гена под контроль регуляторных элементов клетки хозяина или трансформирующего вектора
9. Классификации используемых в генетической инженерии векторных систем.
10. Примеры создания векторных молекул на основе геномов плазмид
11. Роль мигрирующих элементов в конструировании разных типов векторных молекул
12. Критерии, используемые при создании векторных конструкций
13. Характерные признаки сильных промоторов, используемых в генетических транспортных конструкциях
14. Обязательные и специфические свойства векторных молекул.
15. Дайте характеристику понятиям «ДНК-вставка», «клонированная ДНК» и «трансген».
16. Дайте характеристику конструкция ДНК вектор-вставка, «клонирующий вектор».
17. Что такое нуклеотидная палиндромная последовательность? Какую роль она играет для сайта узнавания эндонуклеазами рестрикции?
18. Как называют ферменты, осуществляющие вырезание нужного фрагмента ДНК-вставки?
19. Как называют ферменты, осуществляющие сшивание (отжиг) фрагментов ДНК-вставки и ДНК-вектором?
20. За счет каких связей происходит сшивка ДНК-вставки и ДНК-вектора для создания клонирующего ДНК-вектора?
21. Дайте характеристику сайтов узнавания эндонуклеазами рестрикции.
22. Дайте характеристику плазмидных векторных систем.
23. Охарактеризуйте векторы «космиды».
24. Охарактеризуйте вирусные векторы.
25. Какие последовательности нуклеотидов обязательно входят в состав космид?
26. Дайте характеристику эндонуклеазам рибозимам.
27. Дайте характеристику вектора бактериальной искусственной хромосоме (BAC).
28. Дайте характеристику вектора искусственная хромосома дрожжей (YAC).
29. Дайте характеристику шаттл вектору. Какие последовательности ДНК в них обязательно должны содержаться? Для каких целей используют эти векторы?
30. Дайте характеристику «бактериофаговый вектор M13». Какие особенности ДНК в них? Для каких целей используют этот вектор?

№	Вопрос	Ответ
1	Перечислите принципиально новые методы генетической трансформации продуцентов, позволяющие получить нужные признаки.	К новым методам относят рекомбинацию генома. Для чего используют метод вырезания генов с помощью ректриктаз. После получения коллекции фрагментов ДНК их вводят в соответствующие векторы, получают рДНК и трансформируют ими клетки. Амплификация последовательностей ДНК in vitro: это полимеразная цепная реакция применяется для получения множества копий. ДНК-полимераза — фермент, участвующий в репликации ДНК. Ферменты этого класса катализируют

		полимеризацию дезоксирибонуклеотидов вдоль цепочки нуклеотидов ДНК, которую фермент «читает» и использует в качестве шаблона. Наиболее распространенным методом химического синтеза ДНК является фосфорамидитный. Синтез олигонуклеотидов длиной около 50 звеньев осуществляют в твердой фазе: растущая цепь ДНК фиксируется на твердом носителе.
2	Охарактеризуйте принципиальное отличие традиционной селекции от генной инженерии.	В отличие от традиционной селекции, в ходе которой генотип подвергается изменениям лишь косвенно, генная инженерия позволяет непосредственно вмешиваться в генетический аппарат, применяя технику молекулярного клонирования.
3	Как проводят модификацию генетического материала *in vivo?*	Работы в области генетической инженерии (генно-инженерные проекты) включают следующие основные этапы: 1) получение нужного гена (целевого гена, гена-мишени); 2) встраивание гена-мишени в генетический элемент (генетический вектор), способный к репликации, с образованием рекомбинантной ДНК (далее – рДНК); 3) введение рДНК (гена, входящего в состав вектора) в клетку хозяина (целевую клетку, организм-реципиент); 4) идентификация (скрининг и селекция) целевых клеток, несущих рДНК (ген-мишень).
4	Регуляция экспрессии генов и оперонов	Некоторые ферменты, необходимые бактерии для усвоения определенных питательных веществ, активно синтезируются в клетке только тогда, когда эти вещества присутствуют в культурной среде, и синтез их прекращается, если каким-либо образом они удаляются из среды. Такой тип регуляции синтеза фермента называется индукцией, а вещество, включающее экспрессию гена — индуктором. Оперон — это группа генов прокариот, находящихся под общим промотором. Все эти гены транскрибируются на одну общую молекулу мРНК. Такая мРНК, содержащая информацию о нескольких белках, называется полицистронной. С промотором перекрывается следующий участок — оператор (О). С ним может связываться регуляторный белок-репрессор. Репрессор *блокирует* промотор и тем самым *предотвращает* транскрипцию гена.
5	Перечислите ферментативные системы в конструировании векторных молекул.	В коннекторном методе получения рДНК используют концевой дезоксинуклеотидилтрансферазу для достраивания участков ДНК. Одноцепочечные бреши в рДНК достраивают с участием ДНК-полимеразы. В рестриктазно-лигазном методе сначала с помощью рестриктазы специфически разрезают молекулы ДНК на фрагменты с комплементарными «липкими» концами. Их смешивают и осуществляют отжиг – образование двухцепочечных молекул из одиночных полинуклеотидных комплементарных цепей. Цепи ДНК удерживаются вместе водородными связями, но в каждой полинуклеотидной цепи остаются одноцепочечные разрывы. Эти разрывы устраняются ДНК-лигазой Т4 в присутствии АТФ.

6	Ковалентное лигирование «липких» и «тупых» концов при конструировании векторов.	ДНК-лигаза Т4 образует фосфодиэфирные связи между 5′-фосфатными и 3′-гидроксильными группами в местах разрывов в остове двухцепочечной ДНК. ДНК-лигаза сшивает и «липкие», и «тупые» концы. Для уменьшения количества нежелательных продуктов лигирования (объединившихся между собой фрагментов исходной векторной ДНК) рестрицированную плазмидную ДНК обрабатывают щелочной фосфатазой. Последняя отщепляет от линеаризованной плазмидной ДНК 5′-фосфатные группы. В образовавшейся после отжига и лигирования рДНК имеются одноцепочечные разрывы, которые устраняются системой лигирования клетки-хозяина после трансформации
7	Конструирование полилинкеров мультиклональных сайтов рестрикции	Сайт рестрикции (участок узнавания) — короткая последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, которая распознаётся ферментом эндонуклеазой рестрикции-модификации (рестриктазой). **П**олилинкер, или мультиклональный сайт (MCS) — компактный фрагмент ДНК, имеющий последовательности, распознаваемые разными ферментами-ножницами — рестриктазами; в разрез, сделанный каким-то ферментом (или двумя) как раз и вставляется клонируемый ген, поэтому сайты рестриктаз из MCS не должны встречаться где-то еще в векторе, иначе он развалится.
8	Постановка гена под контроль регуляторных элементов клетки хозяина или трансформирующего вектора	Эти регуляторные элементы можно разделить на несколько групп. Первую группу составляют промоторы, которые располагаются непосредственно перед геном и служат местом сборки преинициаторного транскрипционного комплекса. Вторая группа представлена удаленными регуляторными элементами, которые могут как активировать (энхансеры), так и подавлять (сайленсеры) транскрипцию. Существуют так называемые архитектурные элементы, которые поддерживают взаимодействия между удаленными участками генома, способствуя, как считается, созданию относительно стабильных хроматиновых петель. Наиболее известными архитектурными элементами являются инсуляторы, которые в зависимости от ряда дополнительных условий могут либо разделять функциональные домены генома, либо способствовать установлению коммуникаций между удаленными энхансерами и контролируемыми ими промоторами.
9	Классификации используемых в генетической инженерии векторных систем	Плазмидные векторы Плазмиды – внехромосомные автономно реплицирующиеся двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК. Векторы фаговые на основе бактериофагов в отличие от плазмидных векторов предназначены для клонирования крупных фрагментов ДНК длиной более 10 т. п. н. Космиды – векторы, объединяющие свойства плазмидных векторов и векторов на основе фага λ. Комбинированные векторы (фагмиды) Искусственные хромосомы — бактериальные (BAC) и фаговые (PAC) — кольцевые ДНК, выстроенные на базе репликона F-плазмиды (полового фактора): они

		содержат ori, rep- и par-гены, обеспечивающие репликацию и стабильное поддержание в ряду бактериальных поколений этого 1–2-копийного вектора. Фазмиды – гибриды между фагами и плазмидами, которые могут развиваться и как фаги, и как плазмиды. Существуют также векторы с условной (регулируемой) центромерой, (YAC), линейные векторы с теломерами на концах и дрожжевые искусственные хромосомы содержащие и теломеры, и центромеру. Бакмиды — крупные челночные векторы на базе бакуловирусной ДНК, все манипуляции с которыми производят в E. coli и только для наработки продукта полностью готовую конструкцию отправляют в насекомых.
10	Примеры создания векторных молекул на основе геномов плазмид	В природном виде эти мобильные элементы для клонирования обычно не используют, а создают химеры, содержащие только самое необходимое: - место начала репликации (*origin*, *oriV*); - соответствующий ген белка — инициатора репликации (*rep*) и другие элементы контроля репликации (необходимость во всём этом определяется типом *ori*); - последовательности, обеспечивающие стабильное поддержание вектора в бактериальном потомстве; - селективный/детекционный маркер (чаще это ген устойчивости к антибиотику — ампициллину, тетрациклину, канамицину — и/или часть гена lacZ); - полилинкер, или мультиклональный сайт (MCS) — компактный фрагмент ДНК, буквально напичканный последовательностями, распознаваемыми разными ферментами-ножницами — рестриктазами; в разрез, сделанный каким-то ферментом (или двумя) как раз и вставляется клонируемый ген, поэтому сайты рестриктаз из MCS не должны встречаться где-то еще в векторе, иначе он развалится.
11	Роль мигрирующих элементов в конструировании разных типов векторных молекул	Мигрирующими элементами (МЭ) называются последовательности ДНК, имеющие специфическую структуру и автономно перемещающиеся по геному. Гены, кодирующие это перемещение, локализованы в самих МЭ. К мигрирующим элементам бактерий относятся: простые вставочные последовательности; IS-элементы (от Insertion Sequences); транспозоны – Tn; конъюгативные транспозоны – CTn; интегроны – In; генные острова (ГО), включая острова патогенности (ОН). Первыми обнаруженными и изученными МЭ были IS-оследовательности и транспозоны, перемещение которых осуществляется кодируемыми ими ферментами – транспозазами, которые могут связываться с однонитевыми ДНК.
12	Критерии, используемые при создании векторных конструкций	Вектор, который обеспечивает репликацию целевого гена в клетке-реципиенте, называют клонирующим или вектором для клонирования. К векторам для клонирования предъявляют требования: 1) наличие уникального сайта рестрикции для расщепления определенной рестриктазой, в который может быть осуществлена вставка (инсерция) гена-

		мишени; 2) наличие одного или более селективных генетических маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рДНК; 3) способность вектора к репликации, т. е. наличие сайта инициации репликации ориджин (ori).
13	Характерные признаки сильных промоторов, используемых в генетических транспортных конструкциях	Характерные признаки сильных промоторов – промотор, обеспечивающий высокую частоту присоединения ДНК-зависимой РНК-полимеразы, что сопровождается повышенным уровнем инициации транскрипции прилежащих генов.
14	Обязательные и специфические свойства векторных молекул.	Вектор, который обеспечивает репликацию целевого гена в клетке-реципиенте, называют клонирующим или вектором для клонирования. К векторам для клонирования предъявляют требования: 1) наличие уникального сайта рестрикции для расщепления определенной рестриктазой, в который может быть осуществлена вставка (инсерция) гена-мишени; 2) наличие одного или более селективных генетических маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рДНК;; 3) способность вектора к репликации, т. е. наличие сайта инициации репликации ориджин (ori). Векторы, которые обеспечивают интеграцию целевого гена в геном клетки-реципиента, называют векторами для интеграции или интегративными (интегрирующими). Челночные или шатл-векторы – это векторы, способные реплицироваться в клетках различных организмов.
15	Дайте характеристику понятиям «ДНК-вставка», «клонированная ДНК» и «трансген».	Целевую ДНК (чужеродную ДНК), которая должна быть перенесена в другую клетку, называют: ДНК-вставка, клонированная ДНК или трансген. Трансген — фрагмент ДНК, переносимый при помощи генно-инженерных манипуляций либо природой[1] в геном определённого организма с целью модификации его свойств. Трансген может быть выделен из биологического объекта или синтезирован искусственно.
16	Дайте характеристику конструкция ДНК вектор-вставка, «клонирующий вектор».	ДНК, полученную путем соединения (лигирования) с трансгеном для получения новой молекулы рекомбинантной ДНК, называют: клонирующий вектор или вектор-вставка.
17	Что такое нуклеотидная палиндромная последовательность? Какую роль она играет для сайта узнавания	Нуклеотидная последовательность в сайтах узнавания эндонуклеазами рестрикции, состоящая: из инвертированных повторов, одинаково считывающихся в прямом направлении одной цепи и в обратном направлении другой цепи называется палиндромная,

	эндонуклеазами рестрикции?	
18	Как называют ферменты, осуществляющие вырезание нужного фрагмента ДНК-вставки?	Ферменты рестриктазы, осуществляют вырезание нужного фрагмента. Рестриктазы классифицируют на три класса по характеру расщепления ДНК и потребности в кофакторах. Рестриктазы I класса узнают строго специфичные последовательности нуклеотидов, но осуществляют расщепление ДНК случайным образом на расстоянии 400–7000 п. н. от сайта узнавания. Рестриктазы II класса (табл. 1) выделяются в индивидуальном состоянии (свободны от метилазной активности). Они узнают последовательности ДНК длиной 4–8 п. н. – палиндромы (последовательности-перевертыши, идентичные в обеих цепях при прочтении в направлении 5′→3′) и расщепляют нуклеиновую кислоту внутри сайта узнавания. Рестриктазы III класса обладают и эндонуклеазной, и метилазной активностями. Они, как и рестриктазы I класса, узнают непалиндромные последовательности ДНК и расщепляют ее в стороне от сайта узнавания на расстоянии 24–27 п. н. Их молекулы (200–300 кДа) состоят из двух различных субъединиц и используют в качестве кофакторов АТФ и ионы магния.
19	Как называют ферменты, осуществляющие сшивание (отжиг) фрагментов ДНК-вставки и ДНК-вектором?	После рестрикции фрагменты ДНК могут повторно отжигаться за счет комплементарных связей для создания рекомбинантных молекул ДНК с участием ферментов ДНК-лигаз. ДНК-лигаза – фермент, катализирующий синтез фосфодиэфирной связи в двухцепочечной ДНК. Особенностью ДНК-лигазы фага Т4 является ее способность сшивать двухцепочечные фрагменты ДНК с «тупыми» концами, поэтому она наи- более часто используется в генно-инженерных проектах.
20	За счет каких связей происходит сшивка ДНК-вставки и ДНК-вектора для создания клонирующего ДНК-вектора?	Препараты фаговой и клонируемой ДНК объединяют, обрабатывают ДНК-лигазой Т4 и получают рекомбинантные молекулы (рис. 14). Затем добавляют пустые головки фага и собранные отростки. Рекомбинантные молекулы ДНК упаковываются в головки бактериофага и получаются инфекционные фаговые частицы.
21	Дайте характеристику сайтов узнавания эндонуклеазами рестрикции.	Сайт рестрикции (участок узнавания) — короткая последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, которая распознаётся ферментом эндонуклеазой рестрикции-модификации (рестриктазой). Рестриктаза связывается с молекулой ДНК в точке расположения сайта рестрикции и перерезает цепочку нуклеотидов внутри сайта или в непосредственной близости от него.
22	Дайте характеристику плазмидных векторных систем.	Плазмидные векторы представляют собой: - двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК - содержат последовательность, которая функционирует как источник репликации (ори) - содержат хотя бы один селективный генетический маркер
23	Охарактеризуйте векторы «космиды».	космида — это вектор, представляющий собой «гибрид» между плазмидой и фагом. Реплицируются, используя

		плазмидный тип репликации, и обладают способностью упаковываться in vitro в оболочки частиц фага λ.
24	Охарактеризуйте вирусные векторы.	Вирусные векторы представляют собой: - векторы для клонирования более длинных фрагментов ДНК - умеренные фаги бактерий - как одноцепочечную ДНК, так и двухцепочечную ДНК.
25	Какие последовательности нуклеотидов обязательно входят в состав космид?	В состав космид входят: - cos-последовательности фага лямбда (необходим для упаковки ДНК фага в белковую оболочку фага) - ген устойчивости к антибиотикам для идентификации клетки-хозяина Они содержат последовательность ori, позволяющую ей реплицироваться в E. coli, селекционный маркёр ampr, полилинкер (сайт множественного клонирования) и cos-сайты встроенные из фага λ. Наличие в составе космид cos-участка позволяет производить упаковку ДНК в головку фага и использовать механизмы последнего для трансформации клеток. Cos-сайты представляют из себя
26	Дайте характеристику эндонуклеазам рибозимам.	Эндонуклеазы- рибозимы – это РНК ферменты**,** способные расщеплять специфические фосфодиэфирные связи. Многие рибозимы естественного происхождения катализируют расщепление самих себя или других молекул РНК, кроме того образование пептидной связи в белках происходит при помощи рРНК рибосомы. Эндорибонуклеаза — интерферон-индуцируемая рибонуклеаза, которая после индукции, активации, расщепляет все РНК в клетке, участвует в антивирусном действии интерферонов и апоптозе.
27	Дайте характеристику вектора бактериальной искусственной хромосоме (BAC).	Бактериальная искусственная хромосома (BAC) – это вектор, характеризующийся: - переносом генетической информации при бактериальной конъюгации (фактор F) - наличием фрагментов длиной до 1 Мб (106 п.н.) - наличием гена репликации и числа копий - наличием сайта ферментов рестрикции.
28	Дайте характеристику вектора искусственная хромосома дрожжей (YAC).	Искусственная хромосома дрожжей (YAC) – это вектор, характеризующийся: - наличием фрагментов длиной до 1 Мб (106 п.н.) - наличием выбираемых маркеров на каждом плече (TRP1 и URA3) - наличием сайта ферментов рестрикции - наличием кластера уникальных сайтов рестрикции для ДНК вставки.
29	Дайте характеристику шаттл вектору. Какие последовательности ДНК в них обязательно должны содержаться? Для каких целей	Шаттл векторы – это: - векторы, состоящие из плазмид и вирусов животных - векторы для перемещения вставок ДНК туда и обратно между различными клетками-хозяевами - бифункциональный рекомбинантный вектор, вектор, содержащий участки инициации репликации как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. Напр., некоторые челночные векторы содержат бактериальную плазмиду и фрагмент ДНК вируса SV40.

	используют эти векторы?	
30	Дайте характеристику «бактериофаговый вектор М13». Какие особенности ДНК в них? Для каких целей используют этот вектор?	Бактериофаговый вектор М13 представляет собой: - ДНК-одноцепочечный фаг - реплицируется с образованием двухцепочечной молекулы ДНК, называемой репликативной формой (РФ). Фаг М13 – нитевидный колифаг, имеющий кольцевой ДНК-геном. Для получения рекомбинантных ДНК используют репликативную форму фага, представляющую собой кольцевую двухнитевую ДНК размером 6400 п.н., в которую вставлен ген lacZ, содержащий полилинкер сайтов для целого ряда рестриктаз. Использование данных фагов целесообразно для создания клонирующих векторов.

Тестовые вопросы по дисциплине

Вопрос 1. Принципиальное отличие продуцентов с желаемыми признаками в организме-продуценте стало возможным путем:

А) культивирования в элективных условиях

Б) проведением направленного химического мутагенеза

В) проведением направленного химического мутагенеза

Г) путем введения новых генов из клеток других организмов в клетки продуцента

Д) путем непосредственного модифицирования собственного генетического состава посредством манипуляций с ДНК.

Вопрос 2. Укажите, какие принципиально новые перемены в области методов генетической трансформации продуцентов, позволяющие получить нужные признаки:

А) появление метода химического и химического мутагенеза

Б) появление метода, основанного на технологии рекомбинантных ДНК

В) появление метода слияния протопластов

Г) появление метода коньюгации клеток

Вопрос 3. Модификация генетического материала, осуществляемая *in vivo,* это:

А) изменение генетического материала клетки в вне живого организма последующим введением его в клетки продуцента

Б) изменение генетического материала в внутри клетки организма с помощью слияния клеток

В) изменение генетического материала в внутри клетки организма с помощью коньюгации клеток

Вопрос 4. Модификация генетического материала осуществляемая *in vitro*, это:

А) изменение генетического материала клетки в вне живого организма последующим введением его в клетки продуцента в виде вектора

Б) изменение генетического материала в внутри клетки организма с помощью слияния клеток

В) изменение генетического материала в внутри клетки организма с помощью коньюгации клеток

Вопрос 5. Выделите принципы генетической манипуляции клеток:

А) воссоединение фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением новых «рекомбинантных» генетических структур в живую клетку

Б) перенос любых других генов из одного организма в другой, минуя половой процесс

В) перенос любых генов только организма одного и того же вида, минуя половой процесс

Г) перенос любых генов только организма одного и того же вида, при половом процессе

Вопрос 6. Принципиальное отличие традиционной селекции от генной инженерии заключается в том, что:

А) при перестройке генома вводят чужеродные последовательности одного и того же вида ДНК в геном реципиента при половом процессе

Б) при перестройке генома вводят чужеродные последовательности одного и того же вида ДНК в геном реципиента без полового процесса

В) при перестройке генома вводят «рекомбинантные» ДНК, полученные путем соединения сегментов ДНК различного биологического происхождения

Вопрос 7. Целевую ДНК (чужеродную ДНК), которая должна быть перенесена в другую клетку, называют:

А) ДНК-вставка

Б) клонированная ДНК

В) трансген

Г) вектор

Вопрос 8. ДНК, полученную путем соединения (лигирования) с трансгеном для получения новой молекулы рекомбинантной ДНК, называют:

А) ДНК вектор-вставка

Б) конструкция ДНК

В) конструкция ДНК вектор-вставка

Г) клонирующий вектор.

Вопрос 9. Перенос и поддержание (копирование) конструкция ДНК вектор-вставки в клетке-хозяине называется:

А) мутацией

Б) модификацией

В) трансформацией.

Вопрос 10. Образующиеся в результате репликации ДНК вектор-вставки идентичные молекулы в клетке называются:

А) новыми генами

Б) ДНК-транспозонами

В) клонами ДНК-вставки

Вопрос 11. Ферменты, осуществляющие вырезание нужного фрагмента ДНК-вставки называют:

А) лигазы
Б) эндонуклеазами рестрикции
В) РНК-нуклеазы
Г) ДНК-нуклеазы

Вопрос 12. Нуклеотидная последовательность, в которой осуществляют разрезание ДНК эндонуклеазы рестрикции, называется:

А) сайтами инициации транскрипции
Б) сайтами идентичности
В) сайтами узнавания
Г) комплиментарные последовательности.

Вопрос 13. Нуклеотидная последовательность в сайтах узнавания эндонуклеазами рестрикции должна быть палиндромная, состоящая:

А) из инвертированных повторов, одинаково считывающихся в прямом направлении одной цепи и в прямом направлении другой цепи
Б) из инвертированных повторов, одинаково считывающихся в прямом направлении одной цепи и в обратном направлении другой цепи
В) из инвертированных повторов, одинаково считывающихся в обратном направлении одной цепи и в обратном направлении другой цепи

Вопрос 14. Ферменты рестриктазы могут давать:

А) только тупой или плоский срез.
Б) только ступенчатый срез (липкие концы), в котором есть 5-фосфатное удлинение (например, EcoRI) или 3-фосфатное удлинение (например, San 3AI)
В) тупой (плоский срез) или ступенчатый срез.

Вопрос 15. После рестрикции фрагменты ДНК могут повторно отжигаться за счет комплементарных связей для создания рекомбинантных молекул ДНК с участием ферментов:

А) нуклеаз
Б) эндонуклеаз рестрикции
В) ДНК-полимераз
Г) ДНК-лигаз.

Вопрос 16. Ферменты эндонуклеазы I типа:

А) высокоспецифичные, имеют один сайт узнавания и рестрикции разрезают или замыкают ДНК по целевому сайту и не требуют АТФ
Б) имеют разные субъединицы для узнавания, модификации и рестрикции или расщепления, сайт рестрикции расположен на расстоянии более 1000 пар нуклеотидов от места узнавания
В) имеют две субъединицы, одну для узнавания и метилирования, а другую для рестрикции
Г) способны расщеплять специфические фосфодиэфирные связи.

Вопрос 17. Ферменты эндонуклеазы II типа:

А) высокоспецифичные, имеют один сайт узнавания и рестрикции разрезают или замыкают ДНК по целевому сайту и не требуют АТФ

Б**)** имеют разные субъединицы для узнавания, модификации и рестрикции или расщепления, сайт рестрикции расположен на расстоянии более 1000 пар нуклеотидов от места узнавания

В) имеют две субъединицы, одну для узнавания и метилирования, а другую для рестрикции

Г) способны расщеплять специфические фосфодиэфирные связи.

Вопрос 18. Ферменты эндонуклеазы III типа:

А) высокоспецифичные, имеют один сайт узнавания и рестрикции разрезают или замыкают ДНК по целевому сайту и не требуют АТФ

Б**)** имеют разные субъединицы для узнавания, модификации и рестрикции или расщепления, сайт рестрикции расположен на расстоянии более 1000 пар нуклеотидов от места узнавания

В) имеют две субъединицы, одну для узнавания и метилирования, а другую для рестрикции

Г) способны расщеплять специфические фосфодиэфирные связи.

Вопрос 19. Эндонуклеазы- рибозимы – это РНК ферменты:

А) высокоспецифичные, имеют один сайт узнавания и рестрикции разрезают или замыкают ДНК по целевому сайту и не требуют АТФ

Б**)** имеющие разные субъединицы для узнавания, модификации и рестрикции или расщепления, сайт рестрикции расположен на расстоянии более 1000 пар нуклеотидов от места узнавания

В) имеющие две субъединицы, одну для узнавания и метилирования, а другую для рестрикции

Г) способные расщеплять специфические фосфодиэфирные связи.

Вопрос 20. Для выделения или клонирования гена используют стратегию трансформационная рекомбинации как:

А) метод выделения генов, основанный на естественной способности клеток находить и комбинировать похожие ДНК, независимо от их происхождения.

Б) метод инактивирования гена вставкой транспозона

В) метод клонирования на основе карты путем идентификации рДНК гена без информации его продукта.

Вопрос 21. Укажите, какие обычно используют ДНК-векторы:

А) плазмиды,

Б) бактериофаги,

В) BAC, Г) YAC,

Г) фосмиды, космиды

Д) все ответы верны

Вопрос 22. Выделите верные характеристики: плазмидные векторы представляют собой:

А) двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК

Б) одноцепочечные молекулы ДНК

В) последовательность, которая функционирует как источник репликации (ори)

Г) последовательность, которая функционирует как источник репликации (ори), может отсутствовать

Д) один селективный генетический маркер

Е) вектор с более одним селективным генетическим маркером.

Вопрос 23. Плазмидные клонирующие векторы обозначаются строчной буквой:

А) «a»

Б) «r»

В) «p»

Г) «h»

Д) «d».

Вопрос 24. Выделите верные характеристики: вирусные векторы представляют собой:

А) векторы для клонирования более длинных фрагментов ДНК

Б) умеренные фаги бактерий

В) литические фаги бактерий

Г) только двухцепочечную ДНК

Д) только одноцепочечную ДНК

Е) как одноцепочечную ДНК, так и двухцепочечную ДНК

Вопрос 25. Выделите верные характеристики: космида - это вектор, представляющий собой:

А) вектор бактериофага λ

Б) «гибрид» между плазмидой и фагом

В) гибрид между плазмидами, которые участвуют в переносе генетической информации при бактериальной конъюгации и плазмидой вирусы животных

Г) искусственная хромосома дрожжей в линейной форме, содержащая теломеры дрожжей для распространения в дочерние клетки при клеточном делении.

Вопрос 26. В состав космид входят:

А) cos-последовательности фага лямбда (необходим для упаковки ДНК фага в белковую оболочку фага)

Б) теломеры дрожжей для распространения в дочерние клетки при клеточном делении

В) ген устойчивости к антибиотикам для идентификации клетки-хозяина

Г) фактор F (коньюгации клеток)

Д) сайты ферментов рестрикции.

Вопрос 27. Выделите верные характеристики: бактериальная искусственная хромосома (BAC) – это вектор, характеризующийся:

А) переносом генетической информации при бактериальной конъюгации (фактор F)

Б) наличием фрагментов длиной до 1 Мб (106 п.н.)

В) наличием гена репликации и числа копий

Г) наличием теломер дрожжей для распространения в дочерние клетки при клеточном делении

Д) наличием сайта ферментов рестрикции.

Вопрос 28. Выделите верные характеристики: искусственная хромосома дрожжей (YAC) – это вектор, характеризующийся:

А) переносом генетической информации при бактериальной конъюгации (фактор F)

Б) наличием фрагментов длиной до 1 Мб (106 п.н.)

В) наличием выбираемых маркеров на каждом плече (TRP1 и URA3)

Г) наличием теломер дрожжей для распространения в дочерние клетки при клеточном делении

Д) наличием сайта ферментов рестрикции

Е) наличием кластера уникальных сайтов рестрикции для ДНК вставки.

Вопрос 29. Выделите верные характеристики: шаттл векторы – это:

А) плазмидные векторы, которые участвуют в переносе генетической информации при бактериальной конъюгации (фактор F)

Б) векторы, состоящие из плазмид и вирусов животных

В) имеют выбираемые маркеры на каждом плече (TRP1 и URA3)

Г) векторы, которые могут реплицироваться более чем в одной клетке-хозяина

Д) векторы для перемещения вставок ДНК туда и обратно между различными клетками-хозяевами

Е) векторы, которые содержат кластер уникальных сайтов рестрикции для ДНК вставки.

Вопрос 30. Бактериофаговый вектор M13 представляет собой:

А) ДНК-одноцепочечный фаг

Б) ДНК-двухцепочечный фаг

В) РНК-одноцепочечный фаг

Г) реплицируется с образованием двухцепочечной молекулы ДНК, называемой репликативной формой (РФ)

Д) реплицируется с образованием одноцепочечной молекулы ДНК, называемой репликативной формой (РФ).

Ключ к тестовым заданиям:

№ Вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ответ	Г	Б	Б	А	А	В	А,Б,В	В, Г	В	В
№ вопроса	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ответ	Б	В	Б	В	Г	Б	А	В	Г	А
№ вопроса	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Ответ	Д	А, В, Д	В	А,Б,Г	Б	А, В	А, В, Д	Б, В, Д, Е	Б, Д	А, Г

Дисциплина «Структурно-функциональные исследования белков и нуклеиновых кислот»

Задания в открытой форме

1. Структурные характеристики аминокислот, классификация, участие функциональны групп в стабилизации белковых структур.

2. Пространственные структуры белков. Типы белковых доменов.
3. Характеристика процесса «Фолдинга» белков.
4. Механизм посттрансляционной модификации белков.
5. Нуклеиновые кислоты. Структура нуклеозидов, нуклеотидов, РНК, ДНК, спиралей ДНК.
6. Таутомерия азотистых оснований. Кислотно-основные свойства.
7. Понятие «посттранскрипционные» модификации РНК.
8. Физико-химические свойства белков.
9. Перечислите методы для разделения смеси основных и кислых белков.
10. Какую форму имеет вторичная структура белка и за счет каких связей она образуется?
11. Как формируется третичная структура белка и какие связи её образуют?
12. Какие аминокислотные остатки имеются в глобулярной структуре белка?
13. Растворимость мономерных и полимерных белковых структур.
14. Понятие «денатурация белка». Факторы и агенты денатурации биополимеров. Изменение нативных свойств белков после денатурации.
15. Температура денатурации ДНК. Оптическая активность аминокислот и азотистых оснований.
16. Дайте характеристику метода определения относительной молекулярной массы белка.
17. Что такое двухнитевая ДНК? Какими типом связи соединяются нити друг с другом в молекуле ДНК?:
18. Рестрикционный анализ ДНК.
19. Классификация эндонуклеаз рестрикции, различающихся по сайтам узнавания, структуре белка и условиям ферментативной активности.
20. Свойства изошизомеров и гетероизошизомеров, крупнощепящих и мелкощепящих рестриктаз.
21. Палиндромные сайты рестрикции.
22. Типы ферментов и использование их в генной инженерии при картировании геномов, клонировании генов, генотипировании в качестве «молекулярных ножниц».
23. Метод оценки рестрикционного анализа.
24. Электрофорез белков и нуклеиновых кислот
25. Принципы метода электрофоретического разделения фрагментов и молекул биополимеров.
26. Применение в методе электрофореза интеркалирующих флуоресцентных красителей, маркеров молекулярной массы.
27. Использование электрофорезных буферов в зависимости от дальнейшей ДНК-гибридизации или секвенирования разделенных образцов.
28. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.
29. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез.
30. Методы гибридизации при идентификации биомолекул. Саузерн-блоттинг, Вестерн-блоттинг.

	Вопрос	**Ответ**
1	Структурные характеристики аминокислот, классификация, участие функциональны групп в	Аминокислоты являются структурной единицей белков. Аминокислоты содержат аминогруппу (-NH_2), карбоксильную группу (-COOH), атом водорода и боковую цепь, связанную с α-углеродным атомом. В природе выявлено около 300 аминокислот. Из них 20 являются стандартными (протеиногенными) аминокислотами, которые обнаружены в структуре белков, полученных из различных организмов -

	стабилизации белковых структур	животных, растений и микроорганизмов. Классификация протеиногенных аминокислот по строению радикала: 1) алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, пролин); 2) ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан); 3) алифатические, содержащие гидроксильную группу (серин, треонин); 4) алифатические, содержащие сульфгидрильную группу (цистеин); 5) основные (лизин, аргинин, гистидин); 6) кислые (аспарагиновая и глутаминовая кислоты); 7) алифатические, содержащие карбоксамидную группу (аспарагин, глутамин).
2	Пространственные структуры белков. Типы белковых доменов	Под первичной структурой белка понимают порядок (последовательность) чередования аминокислот в полипептидной цепи. Вторичная структура белков обусловлена способностью групп пептидной связи к водородным взаимодействиям: C=O....HN. При этом пептид стремится принять конформацию с образованием максимального числа водородных связей. Четвертичной структурой обладают белки с молекулярной массой более 50000 Да
3	Характеристика процесса «фолдинга» белков	Фолдинг – это процесс укладки вытянутой полипептидной цепи в правильную трехмерную пространственную структуру. Для обеспечения фолдинга используется группа вспомогательных белков под названием шапероны (chaperon, франц. – спутник, нянька). Они предотвращают взаимодействие новосинтезированных белков друг с другом, изолируют гидрофобные участки белков от цитоплазмы и "убирают" их внутрь молекулы, правильно располагают белковые домены. Шапероны представлены семействами, состоящими из гомологичных по строению и функциям белков, которые отличаются по характеру экспрессии и присутствию в разных компартментах клетки.
4	Механизм посттрансляционной модификации белков	Посттрансляционная модификация — это ковалентная химическая модификация белка после его синтеза на рибосоме. Для многих белков посттрансляционная модификация оказывается завершающим этапом биосинтеза, который является частью процесса экспрессии генов. Наряду с альтернативным сплайсингом посттрансляционные модификации увеличивают разнообразие белков в клетке. На сегодняшний день известно более двухсот вариантов посттрансляционной модификации белков, более того, один и тот же белок может подвергаться нескольким различным модификациям. Так, гликозилирование является одной из наиболее часто встречающихся модификаций: считается, что около половины белков человека гликозилировано, а 1—2 % генов человека кодируют белки, связанные с гликозилированием.
5	Нуклеиновые кислоты. Структура нуклеозидов, нуклеотидов, РНК, ДНК, спиралей ДНК	Нуклеиновые кислоты – это неразветвленные полимеры нуклеотидов, соединенных между собой 3',5'-фосфодиэфирной связью. Полинуклеотиды, составленные из рибонуклеотидных звеньев, называются *рибонуклеиновыми кислотами* (РНК), из дезоксирибонуклеотидных звеньев – *дезоксирибонуклеиновыми* кислотами (ДНК).

		Азотистые основания – это ароматические гетероциклические соединения, производные пиримидина или пурина. Пять азотистых оснований являются основными структурными компонентами нуклеиновых кислот, общими для всей живой материи. В состав ДНК входят *аденин*, *гуанин*, *тимин* и *цитозин*. В состав РНК – *аденин*, *гуанин*, *урацил* и *цитозин*. Кроме перечисленных, в нуклеиновых кислотах в небольших количествах встречаются модифицированные азотистые основания, в основном метилированные и гидроксилированные, их называют *минорными*. Углеводная часть нуклеотидов, входящих в РНК, представлена рибозой, а входящих в ДНК, – дезоксирибозой. Пентозы в нуклеиновых кислотах всегда присутствуют в β-*D*-фуранозной форме. Углеводные атомы пентоз в нуклеотидах нумеруют со знаком «штрих», чтобы их можно было отличить от атомов азотистых оснований. Первичная структура ДНК – это линейная цепь четырех видов дезоксирибонуклеотидов, соединенных фосфодиэфирной связью. Вторичная структура ДНК – это двухцепочечная правозакрученная спираль из комплементарных друг другу антипараллельных полинуклеотидных нитей.
6	Таутомерия азотистых оснований. Кислотно-основные свойства	Азотистыми основаниями в химии нуклеиновых кислот называют входящие в их состав гетероциклические соединения пиримидинового и пуринового рядов. В качестве заместителей в гетероциклическом ядре они содержат либо окси- (урацил, тимин), либо аминогруппу (аденин), либо одновременно обе эти группы (цитозин, гуанин). Важной особенностью окси-производных пурина и пиримидина является подвижность атома водорода в окси-группах, что и обуславливает склонность к его «переселению» - таутомерии, особенно разнообразны таутомерные превращения для урацила (U). Такой вид таутомерии получил название лактим-лактамная. Таутомерные превращения из окси- в оксо-форму претерпевают и другие азотистые основания. Таутомерные превращения из окси- в оксо-форму претерпевают и другие азотистые основания. В физиологических условиях среды (pH ~ 7,4) фосфатные группы в молекулах ДНК и РНК полностью ионизированы, поэтому в условиях внутренней среды живых организмов нуклеиновые кислоты существуют в форме полианионов, т.е. несут множество отрицательных зарядов. Фосфатные группы нуклеиновых кислот сильно полярны и характеризуются значениями pKI < 2. Поверхность нуклеиновых кислот в целом несет отрицательный заряд, т.к. внешние фосфатные группы полностью ионизированы уже при pH = 4 (pH внутриклеточной среды близко к нейтральному значению). Кислотно-основные свойства гетероциклических оснований влияют главным образом на состояние и прочность водородных связей и стэкинг-взаимодействий, стабилизирующих вторичную структуру ДНК.

7	Понятие «посттранскрипционные» модификации РНК	Посттранскрипционная модификация - это набор биологических процессов, общих для большинства эукариотических клеток, посредством которых РНК первичный транскрипт химически изменяется после транскрипции из гена для получения зрелой функциональной молекулы РНК, которая затем может покинуть ядро и выполнять любую из множества различных функций в клетке. Наиболее известен процессинг матричных РНК, которые во время своего синтеза подвергаются модификациям: кэпированию, сплайсингу и полиаденилированию. Также модифицируются (другими механизмами) рибосомные РНК, транспортные РНК и малые ядерные РНК.
8	Физико-химические свойства белков	Физико-химические свойства белков: *большая молекулярная масса*, которая колеблется в диапазоне от 6000 до нескольких миллионов дальтон; *амфотерность,* то есть наличие, как кислотных, так и основных свойств. Амфотерность связана с наличием в составе некоторых аминокислот свободных карбоксильных групп, то есть кислотных, и аминогрупп (значение pH, при котором белки проявляют нейтральные свойства, называется *изоэлектрической точкой); растворимость*. Первой причиной растворимости белков является наличие на поверхности молекул белков заряда, благодаря чему белковые молекулы практически не образуют нерастворимые в воде агрегаты. Второй причиной - наличие у белковой молекулы гидратной (водной) оболочки. Гидратная оболочка отделяет белки друг от друга; *высаливание,* то есть способность выпадать в осадок под действием водоотнимающих средств. Высаливание – процесс обратимый. *Денатурация* - это потеря белком нативности. заключается в постоянном или временном нарушении вторичной и третичной структуры белка, но при этом первичная структура сохраняется.
9	Перечислите методы для разделения смеси основных и кислых белков	Методы разделения белков, основанные на различиях в их кислотно-основных свойствах (или различия их электрических зарядов): а) метод электрофореза. значениях pH, т.к. установлено, что если при одном pH препарат белка ведет себя как однородное вещество, то при другом pH этот же препарат может быть неоднородным. б) диск-электрофорез в полиакриламидном геле, при котором смесь белков подвергается одновременному воздействию электрического поля и градиента pH. Он обладает особенно высокой разрешающей способностью в) ионообменная хроматография. В ионообменной хроматографии в качестве носителя используются полимеры, несущие на себе заряд – ионообменные смолы: катионообменные смолы (заряженные отрицательно) – обмениваются катионами; анионообменные смолы (заряженные положительно) – обмениваются анионами.
10	Какую форму имеет вторичная структура белка и за счет каких	Вторичная структура белка формируется за счет образования мн огочисленных водородных связей между атомами водорода NH-групп и атомами кислорода CO-групп разных аминокислотных остатков. Несмотря на то что эти связи слабее ковалентных, их количество обеспечивает стабильность вторичной структуры.

	связей она образуется?	*α – спираль* представляет собой правозакрученную спиральную структуру, в одном витке которой укладывается 3,6 аминокислоты. Шаг спирали (расстояние между соседними витками) составляет 0,54 н.м. α - спираль фиксируется водородными связями, которые замыкаются между пептидными связями, образованными каждой 4-ой аминокислотой. Вторичная α - структура укладывается самопроизвольно и определяется первичной структурой белка. *β – структура* имеет вид «гармошки» и стабилизируется водородными связями между удалёнными участками одной полипептидной цепи или между несколькими полипептидными цепями. Выделяют параллельные β – структуры, в которых N и С-концы соответствуют друг другу, и антипараллельные структуры. Примером белков, содержащих преимущественно β – структуры, являются фиброин шёлка, иммуноглобулины. *беспорядочный клубок* - это участки, не имеющие правильной, периодической пространственной организации. Но конформация этих участков также обусловлена аминокислотной последовательностью.
11	Как формируется третичная структура белка и какие связи её образуют?	Третичная структура - специфическая для каждого белка форма укладки полипептидной цепи в пространстве. Данная структура формируется самопроизвольно и определяется первичной структурой. Третичная структура значительно, в десятки раз увеличивает компактность белка. В формировании третичной структуры участвуют нековалентные связи (гидрофобные, ионные) и ковалентные (дисульфидные) связи. В третичную структуру белков входят α - спиральные, β - складчатые структуры, β- петли (в них полипептидная цепь изгибается на 180^0) и неупорядоченный клубок. Совокупность первичной, вторичной, третичной структур составляет *конформацию* белковой молекулы. Прижизненная (нативная) конформация формируется самопроизвольно, и её образование носит название фолдинг. Конформация белков очень не устойчива и формируется при участии особых белков – *шаперонов* (компаньонов).
12	Какие аминокислотные остатки имеются в глобулярной структуре белка?	Подавляющая часть того, что известно о трехмерных белковых структурах, относится к водорастворимым глобулярным белкам. Водорастворимые белки легче выделять в виде отдельных молекул и их структуру легче изучать и рентгеном — в кристаллах, и спектроскопией ЯМР (ядерного магнитного резонанса) — в растворах. Поэтому, говоря о "структуре белка", "формировании структуры белка" и т.д. — часто, на самом деле, имеют в виду закономерности, доказанные лишь для водорастворимых глобулярных белков. Радикалы неполярных аминокислот в водной среде имеют тенденцию слипаться друг с другом (за счет гидрофобных взаимодействий). Такое слипание сворачивает белок в *глобулы* – некие компактные образования. Радикалы неполярных аминокислот в водной среде имеют тенденцию слипаться друг с другом (за счет гидрофобных взаимодействий). Такое слипание сворачивает белок в *глобулы* – некие компактные образования. Участки, богатые полярными аминокислотами, в водной среде, наоборот, стремятся

		развернуться как можно сильнее – за счет этого они не имеют устойчивой третичной структуры
13	Растворимость белковых структур	Растворимость белков в воде зависит от формы, молекулярной массы, величины заряда, соотношения полярных и неполярных функциональных групп на поверхности белка. Кроме этого, растворимость белка определяется составом растворителя, т.е. наличием в растворе других растворённых веществ. Например, некоторые белки легче растворяются в слабом солевом растворе, чем в дистиллированной воде. С другой стороны, увеличение концентрации нейтральных солей может способствовать выпадению определённых белков в осадок. Денатурирующие агенты, присутствующие в растворе, также снижают растворимость белков.
14	Понятие «денатурация белка». Факторы и агенты денатурации биополимеров. Изменение нативных свойств белков после денатурации	Денатурация белков — изменение нативной конформации белковой молекулы под действием различных дестабилизирующих факторов. Аминокислотная последовательность белка не изменяется. Приводит к потере белками их естественных свойств (растворимости, гидрофильности и др.). Обычно денатурация вызывается повышением температуры, действием сильных кислот и щелочей, солей тяжёлых металлов и многозарядных ионов. К физическим факторам могут быть отнесены: температура, действие высокого давления, многократное замораживание и оттаивание, ультразвуковые волны, УФ-лучи, ионизирующая радиация. Эти изменения не затрагивают первичную структуру, однако при этом биологическая активность белка утрачивается. В ряде случаев денатурированный белок в клетке может быть подвергнут ренатурации, т. е. свернут обратно в первоначальную пространственную структуру.
15	Температура денатурации ДНК. Оптическая активность аминокислот и азотистых оснований	При повышении температуры до 70–80ºС полинуклеотидные цепи ДНК расходятся (денатурация ДНК, плавление ДНК), при постепенном охлаждении возможно восстановление двуспиральной структуры в случае наличия комплементарных полинуклеотидных цепей – ренативация ДНК (отжиг ДНК). Денатурацию проводят при температуре 94–95° С. Понижение темпера-туры до 93° С приводит к неполной денатурации и невозможности осуществле-ния ПЦР, повышение до 96° С и выше – к быстрому разрушению фермента. Пе-ред осуществлением ПЦР проводят первоначальную денатурацию матричной ДНК при температуре 94–95° С в течение 4–10 мин.
16	Дайте характеристику метода определения относительной молекулярной массы белка.	Для выражения молекулярной массы белков используют также специальную единицу – дальтон. Дальтон (Да) – единица массы, практически равная массе атома водорода (т.е. 1,0000 по шкале атомных масс). Килодальтон (кДа) – единица массы, равная 1000 дальтон. Масса большинства белков лежит в пределах от 10 до 100 кДа. При определении молекулярной массы белков методами седиментационного анализа используют аналитические ультрацентрифуги (первая ультрацентрифуга была сконструирована в 1923 г. Т. Сведбергом), в которых удается создать центробежные ускорения (g), в 200000 и более раз

		превышающие ускорение земного притяжения. Обычно молекулярную массу вычисляют по скорости седиментации молекул белка или седиментационному равновесию.
17	Что такое двухнитевая ДНК? Какими типом связи соединяются нити друг с другом в молекуле ДНК?:	Нуклеотиды соединены между собой ковалентно в длинные *полинуклеотидные* цепи. Эти цепи в подавляющем большинстве случаев попарно объединяются при помощи водородных связей во вторичную структуру, получившую название *двойной спирали*. Внутри одной цепи ДНК соседние нуклеотиды соединены фосфодиэфирными связями, которые формируются в результате взаимодействия между 3'-гидроксильной (3'—OH) группой молекулы дезоксирибозы одного нуклеотида и 5'-фосфатной группой (5'—PO_3) другого. У подавляющего большинства живых организмов ДНК состоит не из одной, а из двух полинуклеотидных цепей. Эти две длинные цепи закручены одна вокруг другой в виде двойной спирали, стабилизированной водородными связями, образующимися между обращёнными друг к другу азотистыми основаниями входящих в неё цепей. В природе эта спираль, чаще всего, правозакрученная. Направления от 3'-конца к 5'-концу в двух цепях, из которых состоит молекула ДНК, противоположны (цепи «антипараллельны» друг другу). Диаметр двойной спирали составляет от 22 до 24 Å, или 2,2—2,4 нм, длина каждого нуклеотида — 3,3 Å (0,33 нм). В двойной спирали различают малую (12 Å) и большую (22 Å) бороздки.
18	Рестрикционный анализ ДНК	Одним из первых и важнейших из шагов молекулярной биологии стала возможность разрезать молекулы ДНК, причем в строго определенных местах. Этот метод был изобретен при изучении в 1950—1970-е годы такого феномена: некоторые виды бактерий при добавлении в среду чужеродной ДНК разрушали ее, в то время, как их собственная ДНК оставалась невредимой. Оказалось, что они для этого используют ферменты, позднее названные *рестрикционными нуклеазами* или *рестриктазами*. Существует множество видов рестриктаз: к 2007-му году их было известно более 3000. Важным свойством каждого подобного фермента является его способность разрезать строго определенную — *целевую* — последовательность нуклеотидов ДНК. Рестрикционный анализ – изучение ДНК с применением эндонуклеаз рестрикции, то есть ферментов, которые вносят в ДНК двуцепочечный разрыв, но только в тех местах, где встречается специфическая для каждой конкретной рестриктазы последовательность нуклеотидов.
19	Классификация эндонуклеаз рестрикции, различающихся по сайтам узнавания, структуре белка и условиям ферментативной активности	Выделяют три основных типа (или класса) ферментов рестрикции, сайты узнавания для которых могут быть симметричными (палиндромными) и несимметричными: 1. Эндонуклеазы рестрикции первого типа (например, *Eco*K из *Escherichia coli* K12) узнают определённую последовательность нуклеотидов и разрезают двуцепочную молекулу ДНК неподалёку от этой последовательности в произвольной точке, и само место разреза не строго

		специально. Обладают рестриктазной, метилазной и АТФазной активностями. 2. Эндонуклеазы рестрикции второго типа (например, *Eco*RI, XbaI) узнают определённую последовательность и разрезают двойную цепь ДНК в определённой фиксированной точке внутри этой последовательности. Эндонуклеазы рестрикции этого типа узнают палиндромные последовательности, которые обладают центральной осью и считываются одинаково в обе стороны от оси симметрии. Не обладают АТФазной активностью. 3. Эндонуклеазы рестрикции третьего промежуточного типа (например, *Eco*PI) узнают нужную последовательность и разрезают двуцепочную молекулу ДНК, отступив определённое число нуклеотидных пар от её конца (или в нескольких точках на разном удалении от сайта узнавания). При этом образуются фрагменты ДНК либо с ровными (тупыми) концами, либо с выступающими (липкими) 5'- или 3'-концами.
20	Свойства изошизомеров и гетероизошизомеров, крупнощепящих и мелкощепящих рестриктаз	Изошизомеры. Существует классификация ферментов рестрикции, основывающаяся на их специфичности к субстрату. Изошизомеры — это рестриктазы с разным происхождением, но одинаковой субстратной специфичностью. Такие рестриктазы могут быть выделены даже из отдаленных таксонов бактерий. Открытие изошизомеров опровергло предположение о строгой таксоноспецифичности рестриктаз, утверждавшее, что участки распознавания для этих ферментов у разных видов микроорганизмов уникальны. Неошизомерами называются рестриктазы, имеющие общий участок распознавания, но разные сайты рестрикции. Например, для ферментов SmaI и XmaI специфична последовательность CCCGGG, но в одном случае разрезание проходит посередине (CCC/GGG), а в другом расщепляется связь между первым и вторым нуклеотидами (C/CCGGG). Гетероизошизомеры. Рестрицирующие эндонуклеазы, выделенные из различных микроорганизмов, которые узнают на ДНК одни и те же последовательности, но производят разрывы в разных точках в пределах того же сайта. Например: XmaI (C↓CCGGG) и SmaI (CCC↓GGG). Большинство рестрицирующих эндонуклеаз класса II узнают последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому эти ферменты делят на мелко- и крупнощепящие. Мелкощепящие эндонуклеазы узнают тетрануклеотид и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупнощепящие, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар.
21	Палиндромные сайты рестрикции	Последовательности нуклеотидов двуцепочечной ДНК, узнаваемые эндонуклеазами рестрикции II типа (сайты рестрикции) часто представляют собой *палиндромы*. Палиндром – это когда в двух цепях ДНК последовательности одинаковые, но идут в противоположных направлениях. Точки узнавания рестриктазами симметричны относительно поворота на 180ºС, то есть последовательность нуклеотидов слева направо

		в одной нити ДНК такая же, как справа налево в другой. Палиндромные участки узнавания и разрезания могут быть представлены также пятью парами, где средний нуклеотид может быть любым из четырех нуклеотидов (HinfI), Расщепление происходит в фиксированном положении внутри сайта рестрикции или непосредственно вблизи него. При этом различные фрагменты вызывают образование как липких, так и тупых концов на фрагментах ДНК.
22	Типы ферментов и использование их в генной инженерии при картировании геномов, клонировании генов, генотипировании в качестве «молекулярных ножниц».	Ферменты, используемые для манипуляций с фрагментами ДНК условно можно разделить на следующие группы: Гидролазы-специфически расщепляют ДНК, Наиболее важными гидролазами в генной инженерии являются эндонуклеазы рестрикции . При этом одни рестриктазы расщепляют цепи ДНК симметрично, и на концах фрагментов образуются "тупые" концы. Другие рестриктазы вносят разрывы нессиметрично, так что на концах полученных фрагментов образуются короткие одноцепочечные участки - так называемые "липкие" концы. Лигазы – соединяют фрагменты ДНК, Чаще всего используется ДНК- лигаза. Этот фермент относится к системе репарации клетки и служит для сшивания разрывов в одно- и двухцепочечных молекулах ДНК. ДНК-лигаза может сшивать фрагменты как с "липкими", так и с "тупыми" концами. Синтетазы – достраивают недостающую цепь ДНК на одноцепочечной матрице ДНК или РНК, Из этих ферментов чаще используется ДНК-полимераза I и обратная транскриптаза.
23	Метод оценки рестрикционного анализа.	Физическое картирование обеспечивается в основном методом рестрикционного картирования, которое часто сочетается с методом саузерн-блот гибридизации. Метод рестрикционного анализа заключается в следующем: Выделяется чистая геномная (хромосомная) ДНК бактерии и обрабатывается эндонуклеазами рестрикции по отдельности каждой, попарно, по несколько в различных сочетаниях. Длины полученных рестриктных фрагментов анализируются с помощью гель-электрофореза. Методом перебора с учетом всех вариантов фрагментов распределяем сайты распознавания эндонуклеазами рестрикции на молекуле ДНК. Каждый процесс индивидуален.
24	Электрофорез белков и нуклеиновых кислот	Основные типы электрофореза. *Рутинный электрофорез.* Традиционная и наиболее широко используемая клиническая лабораторная техника для разделения белков и нуклеиновых кислот. *Электрофорез с помощью акриламида* (также известного как ПАГЭ) обычно используется для разделения белков на основе молекулярного размера и соотношения заряда и массы. С помощью вертикальных плит или геля, встроенных в вертикальные стержни или цилиндры, исследователи могут отделить ДНК из 100 пар оснований или меньше и проанализировать отдельные белки. *Капиллярный электрофорез* осуществляется в капиллярах субмиллиметрового диаметра (т.е. в чрезвычайно тонких капиллярных трубках из плавленого кремнезема с внутренним диаметром от 25 до 100 мм) и сочетает в себе электрофорез и высокоэффективную жидкостную хроматографию для

		облегчения разделения анализируемых веществ. *Изоэлектрическая фокусировка (ИЭФ).* Если нужно разделить амфотерные соединения (например, белки) с более высоким разрешением, используют химические инфузионные гели для создания градиента pH по всей поверхности геля и применяет чрезвычайно высокое напряжение для облегчения миграции белковых молекул до точки, где их чистый заряд равен нулю (изоэлектрическая точка). *Иммунофиксационный электрофорез Электрофорез импульсного полевого геля (PFGE)* эффективно разделяет фрагменты ДНК, применяя электрический ток, который постоянно меняет направление на гелевой матрице.
25	Принципы метода электрофоретического разделения фрагментов и молекул биополимеров	Физический принцип метода заключается в следующем. Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависят от pH среды. Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала, например стеклянную трубку, начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т. е. сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам рабочего канала (или его участка), отнесенной к его длине (В/см). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают разные скорости, и в этом — сущность процесса электрофореза. Постепенно исходный препарат, состоявший из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одной и той же скоростью. В современных приборах рабочий канал заполняют гелем, наличие сетки которого вносит важную дополнительную деталь в электрофоретическую миграцию молекул
26	Применение в методе электрофореза интеркалирующих флуоресцентных красителей, маркеров молекулярной массы	Интеркалирующие красители используются для неспецифического детектирования продуктов ПЦР. При взаимодействии с двухцепочеными ДНК их флуоресценция значительно возрастает. Наиболее распространенными интеркалирующими красителями являются этидиум бромид и SYBR Green I. Они имеют ряд недостатков: высокая фоновая флуоресценция, низкая температурная стабильность и ингибирование ПЦР. К принципиальным недостаткам можно отнести влияние концентрации красителя на оптимальную температуру гибридизации праймеров и температуру плавления ампликонов. Красители следующих поколений (YO-PRO-1, SYBR® Gold, SYTO, BEBO, BOXTO и EvaGreen) разрабатывались для нивилирования этих недостатков. Этидиум бромид - это интеркалирующий краситель, который широко используется в лаборатории молекулярной биологии для визуализации ДНК в методе агарозного гель-электрофореза. Спектр поглощения имеет максимум на 210 нм и 285 нм, максимум флуоресценции приходится на 605 нм. Такие спектральные характеристики оказались очень удобны для визуальной оценки результатов агарозного гель-электрофореза.

		Ультрафиолетовый спектр невидим для глаз наблюдателя, а флуоресценция приходится на видимую область.
27	Идентификация фрагментов ДНК и РНК методами гибридизации в геле	Идентификация фрагментов ДНК и РНК методами гибридизации в геле является либо конечным этапом диагностики, либо необходимым элементом дальнейшего анализа. Для идентификации и выделения, интересующих исследователя клонов бактерий с химерной ДНК разработан метод гибридизации в бактериальных колониях. Для этого на многочисленные колонии бактерии, выращенные на твердой среде, сначала накладывают нитроцеллюлозный фильтр. Часть бактерий прилипает к фильтру. После лизиса клеток, денатурации и фиксирования ДНК фильтр инкубируют в растворе с радиоактивно меченым зондом. По окончании гибридизации фильтр отмывают от избытка зонда и выявляют образовавшийся меченый гибридный комплекс путем контакта с рентгеновской пленкой. Сравнивая положение пятна на радиоавтографе с положением колоний на чашке, выбирают ту из них, которая дала положительный сигнал.
28	Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов	Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) — способ исследования геномной ДНК путём разрезания ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путём гель-электрофореза (электрофореза ДНК). При использовании данного исследования получаются различные результаты от различных образцов, и при помощи ПДРФ можно идентифицировать некоторые различия в последовательности нуклеотидов ДНК, в случае, когда они располагаются в сайте рестрикции. Ввиду того, что технологии секвенирования ДНК могут охарактеризовать ДНК очень точно, ПДРФ был разработан как первый и дешёвый метод для массового применения. Анализ разнообразия ПДРФ является важным инструментом в картировании генома, локализации генов, ответственных за генетические заболевания, определения риска заболевания, получения генетических отпечатков и определения родства.
29	Денатурирующий градиентный гель-электрофорез	Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE) - метод, с помощью которого фрагменты частичных 16S-рДНК-амплифицированных фрагментов одинаковой длины, но разной последовательности могут быть разрешены электрофоретически из-за их различного поведения плавления в гелевой системе, содержащей градиент денатурантов. Это форма электрофореза, при которых для денатурации образца при его перемещении по акриламидному гелю используется химический градиент. DGGE разделяет гены одинакового размера на основе их различной денатурирующей способности, которая определяется последовательностью их пар оснований. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE) проводится путем нанесения небольшого образца ДНК (или РНК) на гель для электрофореза,содержащий денатурирующий агент.
30	Методы гибридизации при	Метод молекулярной гибридизации (ДНК-гибридизация, ДНК-зонды) основан на свойстве генетического материала

	идентификации биомолекул. Саузерн-блоттинг, Вестерн-блоттинг	образовывать двойную спираль с комплементарно соединенными азотистыми основаниями. Если при этом взяты цепочки молекулы ДНК из различных источников, то говорят о гибридизации, например при отжиге ДНК и РНК. Гибридизацию можно осуществлять в растворе или на фильтре (капроновом или нитроцеллюлозном). При этом один из препаратов ДНК иммобилизуют на нитроцеллюлозных фильтрах, на которых молекула ДНК адсорбируется. Фильтры с адсорбированной одноцепочечной ДНК обрабатывают таким образом, чтобы предотвратить дальнейшую адсорбцию одноцепочечных молекул. Для идентификации гена молекулу ДНК генома расщепляют с помощью ферментов рестриктаз на куски размером примерно по 15-20 тысяч пар нуклеотидов. Расщепленный таким образом геном подвергается электрофоретическому фракционированию в агарозном геле. После этого фракции ДНК денатурируют нагреванием и переносят из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр, где их иммобилизуют. Процесс переноса ДНК напоминает промокание **(**блоттинг**) и** называется методом *блоттинга по Саузерну***.** Иммобилизованную таким образом ДНК можно гибридизовать **н**а месте с радиоактивным зондом. Со специфическим зондом будут гибридизироваться только комплементарные ему фрагменты. *Вестерн-блоттинг* — аналитический метод, используемый для определения в образце специфичных белков. На первом этапе используют электрофорез белков в полиакриламидном геле для разделения денатурированных полипептидов по длине (как правило, в присутствии SDS) или по трехмерной структуре белка (в нативном состоянии). Далее белки переносят на нитроцеллюлозную или PVDF-мембрану, затем детектируют с использованием антител, специфичных к заданному белку. При проведении вестерн-блоттинга можно использовать все те же ферменты и субстраты, что и в ИФА.

Тестовые вопросы по дисциплине

Вопрос 1. Понятие «липкие концы» в молекуле ДНК применительно к генетической инженерии отражает:

а) комплементарность нуклеотидных последовательностей

б) взаимодействие нуклеиновых кислот и гистонов

в) реагирование друг с другом SH-групп с образованием дисульфидных связей

г) гидрофобное взаимодействие липидов.

Вопрос 2. Поиск новых рестриктаз для использования в генетической инженерии объясняется:

а) различиями в каталитической активности

б) различным местом воздействия на субстрат

в) видоспецифичностью

г) высокой стоимостью.

Вопрос 3. Успехи генетической инженерии в области создания рекомбинантных белков больше, чем в создании рекомбинантных антибиотиков, что объясняется:

а) более простой структурой белков

б) трудностью подбора клеток хозяев для биосинтеза антибиотиков

в) большим количеством структурных генов, включенных в биосинтез антибиотиков

г) проблемами безопасности производственного процесса.

Вопрос 4. Фермент лигаза используется в генетической инженерии поскольку:

а) скрепляет вектор с оболочкой клетки хозяина

б) катализирует включение вектора в хромосому клеток хозяина

в) катализирует ковалентное связывание углеводно-фосфорной цепи ДНК гена с ДНК вектора

г) катализирует замыкание пептидных мостиков в пептидогликане.

Вопрос 5. Пептидные связи имеются в молекуле

а) РНК

б) ДНК

в) АТФ

г) белка

д) жира

Вопрос 6. Пептидная связь замыкается между атомами:

а) углерода и углерода

б) углерода и кислорода

в) углерода и азота

г) азота и азота

Вопрос 7. Дисульфидные связи участвуют в образовании

а) первичной структуры белка

б) вторичной структуры белка

в) третичной структуры белка

г) четвертичной структуры белка

Вопрос 8. Главной структурой, определяющей все свойства белков является

а) первичная

б) вторичная

в) третичная

г) четвертичная

Вопрос 9. Какой метод больше всего подходит для разделения смеси основных и кислых белков?

а) дифференциальное ультрацентрифугирование

б) хроматография

в) электрофорез

г) гель-фильтрация

Вопрос 10. Пептид, состоящий только из остатков диаминокарбоновой кислоты – лизина (полилизин) будет:

а) хорошо растворим в воде и при электрофорезе двигаться к положительному полюсу

б) хорошо растворим в воде и при электрофорезе двигаться к отрицательному полюсу

в) нерастворим в воде и при электрофорезе оставаться на старте.

Вопрос 11. Важнейшие функции белков в клетке:

а) информационная и регуляторная

б) строительная и ферментативная

в) энергетическая и строительная

Вопрос 12. Что является функцией РНК

а) регуляция процессов в клетке

б) участие в синтезе белка

в) ускорение химических реакций

Вопрос 13. Укажите верное утверждение термина «фолдинг» - это::

а) процесс жизни молекулы белка от биосинтеза до отмирания

б) этапы «жизни» белка.

в) укладка белка в свою естественную (нативную) форму после биосинтеза полипептидной цепи

г) процесс денатурации белка.

Вопрос 14. Какого типа фибриллярных белков не существует?

а) коллагеновые

б) глобиновые

в) альфа-кератины

г) бета-кератины

Вопрос 15. Две нити молекулы ДНК соединяются друг с другом следующим типом связи:

а) ковалентной

б) водородной

в) пептидной

г) дисульфидной

Вопрос 16. Какие изменения в триплете вызовут наименьшее влияние на молекулу белка

а) замена первых нуклеотидов в триплетах

б) замена вторых нуклеотидов в триплетах

в) замена третьих нуклеотидов в триплетах

Вопрос 17. В зависимости от природы носителя различают:

а) жидкостный (свободный)

б) смешанный

в) колоночный

г) зональный

Вопрос 18. Укажите правильное результат структуры нуклеиновых кислот при электрофореза в агарозе:

а) нативная двунитевая молекула ДНК имеет более жесткую структуру (палочкообразную) и движется медленнее

б) нативная двунитевая молекула ДНК имеет более жесткую структуру (палочкообразную) и движется быстрее

в) нативная однонитевая молекула ДНК имеет нежесткую структуру (палочкообразную) и движется медленнее таких же размеров двухнитевой молекулы ДНК

г) кольцевые ДНК бактерий (плазмидная) в нативном состоянии имеют структуру кольца, свернутого в «жгут», что увеличивает ее компактность (I форма), движется быстрее

д) «жгут» разворачивается, превращаясь в кольцо, если в одной из двух цепей имеется единичный разрыв в сахаро-фосфатной цепи, (II форма), движется медленнее

е) Форма III (линейная) ДНК движется быстрее

Вопрос 19. Для разделения и изучения молекулярной структуры белков используют метод ступенчатого электрофореза, характеризующийся:

а) полимеризацией на пластине одного геля

б) полимеризацией на пластине двух гелей

в) разделение белков только по их общему электрическому заряду

г) разделение белков по их общему электрическому заряду и по их молекулярной массе

д) возможностью разделение белков только по их молекулярной массе

Вопрос 20. Электрофоретическую подвижность белков (Rf′) исследуют:

а) в полиакриламидном геле (ПААГ)

б) в альгинатном

в) в агарозном геле

г) в целлюлозе

д) в силикагеле.

Вопрос 21. Для однозначного определения молекулярной массы белка по скорости его миграции при электрофорезе полипептидную цепочку распрямляют обработкой раствора белков:

а) раствора хлорида натрия

б) раствором трихлоруксусной кислоты

в) трехкратным додецилсульфата натрия

д) раствором ферментов протеаз

Вопрос 22. При денатурации происходит нарушение нативной конформации белков в результате:

а) разрыва слабых ионных связей

б) разрыва водородных связей

в) разрыва гидрофобных взаимодействий

г) разрыва пептидных связей

Вопрос 23. Белки, способные узнавать частично денатурированные белки и, связываясь с ними, восстанавливать их нативную конформацию или транспортировать их в лизосомы, называются:

а) прионы
б) альбумины
в) гистоны
д) шапероны
е) протеиды

Вопрос 24. Инфекционные агенты белковой природы, вызывающие изменение конформации своего клеточного аналога, имеет в основном b-складчатую структуру, называются:

а) прионы
б) альбумины
в) гистоны
д) шапероны
е) протеиды.

Вопрос 25. Для высаливания белков используют:

а) соли щелочноземельных металлов
б) сахароза
в) кислоты
г) соли тяжелых металлов

26. Для очистки раствора белка от низкомолекулярных примесей используют:

а) высаливание
б) диализ
в) электрофорез
г) ультрацентрифугирование

Вопрос 27. Диаминомонокарбоновой кислотой является:

а) лейцин
б) лизин
в) серин
г) глицин

Вопрос 28. Метод аффинной хроматографии основан на … белков

а) амфотерности
б) способности к ионизации
в) величине молекулярной массы
г) специфическом взаимодействии с лигандами

Вопрос 29. Конформация полипептидной цепи, стабилизируемая разнообразными связями между радикалами аминокислот, является … структурой

а) первичной
б) вторичной
в) третичной
г) четвертичной

Вопрос 30. Белки-шапероны играют важную роль:
а) в процессе синтеза белков на рибосомах как катализаторы
б) в формировании третичной и четвертичной структур во время синтеза белка
в) в узнавании частично денатурированных белков и их восстановлении в нативную конформацию
г) транспортировать их в лизосомы для дальнейшего гидролиза.

Ключ к тестовым заданиям:

№ Вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ответ	а	б, в	в	б	г	в	в, г	а	в	в
№ вопроса	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ответ	б	б	а, в	б	б	а	а, г	а, г, е	б, г	а
№ вопроса	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Ответ	в	а, б, в	д	а	а	б	б	г	б	б, в, г

Методика оценки сформированности компетенции
Оценка сформированности компетенции проводится по 100 – бальной системе.
Схема оценивания

Шкала оценивания	Критерии оценивания
Пороговый уровень (как обязательный для всех выпускников по завершении освоения ОП ВО) – *оценивается по шкале 53-79 баллов (оценка «удовлетворительно»)*	Характерно частичное знание. Количество верных ответов заключается в интервале 16 – 23 тестовых вопроса.
Повышенный продвинутый уровень (относительно порового уровня) – *оценивается по шкале 80-92 балла (оценка «хорошо»)*	Характерно сформированное, но содержащее отдельные пробелы знание. Количество верных ответов заключается в интервале 24 – 27 тестовых вопроса.
Повышенный превосходный уровень (относительно порового уровня) – *93-100 баллов (оценка «отлично»)*	Характерно полностью сформированное знание. Количество верных ответов заключается в интервале 28 – 30 тестовых вопроса.