

Раздел Большого практикума «Генная инженерия»

Программа курса

Задачей данного раздела практикума является освоение студентами базовых методов генной инженерии и клеточной биологии. Процесс обучения включает в себя: 1) краткий лекционный курс (2-3 лекции), знакомящий студентов с основными генно-инженерными методами, правилами работы в лаборатории и в стерильном боксе, а также с требованиями техники безопасности; 2) выполнение экспериментальных проектов (индивидуально или в группах из 2-3 студентов), целью которых является экспрессия рекомбинантного белка в прокариотической или эукариотической экспрессионной системе. В ходе выполнения экспериментального проекта студенты получают следующие навыки:

1. Работа в базах данных (Expasy, NCBI, Blast), использование специализированного программного обеспечения для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей и выбора оптимальной стратегии создания экспрессионной ДНК-конструкции.
2. Выделение тотальной и матричной РНК из клеток млекопитающих
3. Реакция обратной транскрипции
4. Стерильная работа в боксе с культурами *E. coli*.
5. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli*. Спектрофотометрическое определение концентрации и чистоты препаратов нуклеиновых кислот.
6. Работа с эндонуклеазами рестрикции и ДНК-модифицирующими ферментами (ДНК-полимеразы, лигазы, полинуклеотидкиназа, фосфатазы). Рестрикционный анализ плазмидной ДНК.
7. Аналитический и препаративный электрофорез препаратов РНК и ДНК в агарозных гелях. Выделение и очистка индивидуальных фрагментов ДНК из агарозного геля.
8. Полимеразная цепная реакция (подбор условий, дизайн праймеров).
9. Лигирование фрагментов ДНК, введение чужеродной ДНК (трансформация) в клетки *E. coli*, отбор трансформантов на селективных средах.
10. Трансформация экспрессионных штаммов *E. coli* соответствующими ДНК-конструкциями.
11. Индуцибельная экспрессия рекомбинантных белков *E. coli*, оптимизация условий экспрессии.
12. Биоинформатический анализ результатов секвенирования ДНК
13. Стерильная работа в культуральном боксе с культурами клеток млекопитающих и насекомых.
14. Введение чужеродной ДНК (трансфекция) в клетки млекопитающих и насекомых, отбор трансфектантов на селективных средах.
15. Выделение первичных клеточных культур из тканей и органов млекопитающих.

Список рекомендуемой литературы:

1. Серебряная Д.В., Розов Ф.Н. Практическая генная инженерия. Учебно-методическое пособие. Москва, «Цифровичок», 2013.
2. pET System Manual, Novagen, 2003.

3. Plasmid DNA, QIAGEN protocol, 2001.
4. Sambrook J. & Russel D.W. Molecular cloning. a laboratory manual, 2001.
5. Watson J.D., et al. Molecular biology of the gene. 5th ed. "Pearson", 2004.
6. Катруха И.А., Альтшулер Е.П., Харитонов А.В. Практическая иммунохимия, Москва, 2017
7. Crowther J(2002) The ELISA Guidebook, Methods in Molecular Biology, vol.149
8. Rapley (2000) The Nucleic acid protocols handbook, Humana press

Раздел «Иммунохимия»

Задачей раздела является ознакомление студентов с основными иммунохимии. Раздел включает в себя теоретическую и практическую части. Теоретическая часть состоит из краткого курса лекций, в котором студенты знакомятся с современными иммунохимическими методами. Практическая часть состоит из задач, выполняемых студентами в группе, состоящей из 2-3 человек или индивидуально. Она включает в себя следующие разделы:

- получение основных навыков работы с гибридомными клетками,
- практическое освоение основных иммунохимических методов: прямой и непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), ИФА сэндвич-типа, Вестерн блоттинг, аффинная хроматография, иммуноцитохимия и иммуногистохимия, клеточный сортинг.
- определение основных характеристик антител, таких как специфичность, чувствительность, стабильность.
- Выращивание клеток млекопитающих в культуре, фиксация их с последующей окраской конъюгатами антител с флуоресцентными метками
- Очистка антител (выделение из асцитной жидкости)
- Приготовление аффинных носителей на основе моноклональных антител
- Выделение белков с помощью аффинных носителей
- Приготовление конъюгатов антител с ферментными, флуоресцентными и иными метками

Формой отчета о проделанной работе является презентация в виде 10-минутного доклада с ответами на вопросы, а также организация мини-конференции с представлением своей работы в виде постера, на которой студенты, а также сотрудники кафедры могут ознакомиться с работой и задать интересующие вопросы.