

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ІКБГІ НАН України,
акад. НАН України

М.В.Кучук

27 липня 2021 р.

РОБОЧА ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

КЛІТИННА ТА ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ РОСЛИН

для здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії

галузь знань 09 «Біологія»

спеціальність 091 «Біологія»

профілі підготовки «Біотехнологія», «Цитологія, клітинна біологія, гістологія»


КИЇВ – 2021

Робоча програма навчальної дисципліни «Клітинна та генетична інженерія» для здобувачів вищої освіти ступеня доктор філософії галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія» за профілями підготовки «Біотехнологія», «Цитологія, клітинна біологія, гістологія».

27 липня 2021 року – 10 с.

Розробник:

Кучук М.В., директор ІКБГІ НАН України,
д.б.н., акад. НАН України



(підпис)

Робоча програма дисципліни «Клітинна та генетична інженерія» схвалена на засіданні вченої ради ІКБГІ НАН України (протокол № 5 від 23 травня 2016 року).

Робоча програма дисципліни «Клітинна та генетична інженерія» розглянута та схвалена на засіданні відділу генетичної інженерії ІКБГІ НАН України.

Завідувач відділу акад. НАН України



М.В.Кучук
(підпис)

19 травня 2016 р.

ВСТУП

Навчальна дисципліна «Клітинна та генетична інженерія» є складовою освітньо-наукової програми підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктор філософії галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія» за профілями підготовки «Біотехнологія», «Цитологія, клітинна біологія, гістологія».

Дана дисципліна є обов'язковою навчальною дисципліною за **спеціальністю** 091 «Біологія».

Викладається на II курсі аспірантури **в обсязі – 90 годин (3 кредити ECTS)**, зокрема: лекції – 30 годин, семінари – 10 годин, самостійна робота – 50 години. У курсі передбачено два змістових модулі. Завершується дисципліна заліком.

Мета дисципліни – Метою предмета "Клітинна та генетична інженерія " є ознайомлення студентів з базовими поняттями та сучасними методами клітинної та генетичної інженерії: основні завдання біотехнології рослин; отримання та аналіз генетично модифікованих рослин (конструювання генетичних векторів для трансформації рослин, пряме та опосередковане введення чужорідної ДНК в рослинні клітини, селекція трансформованих рослин та методи аналізу трансгенів, застосування генетично модифікованих рослин); соматична гібридизація рослин; методи культивування рослинних об'єктів *in vitro* (культури недиференційованих клітин та органів); переваги та недоліки застосування продуктів генетичної та клітинної інженерії.

Завдання дисципліни:

1. сформуванню уявлення про сучасні методи клітинної та генетичної інженерії рослин;
2. познайомити з перевагами та недоліками різноманітних методів;
3. дати студентам уявлення про сучасні тенденції в біотехнології рослин для майбутньої професійної орієнтації.

В результаті вивчення навчальної дисципліни аспірант повинен

знати:

- основні методи клітинної та генетичної інженерії рослин;
- переваги та ризики, пов'язані з використанням різних продуктів генетичної та клітинної інженерії в біотехнологічному виробництві.

вміти:

- обирати методи клітинної та генетичної інженерії для вирішення певної дослідницької задачі;
- оцінювати, які нові рослинні системи можна створити за допомогою того чи іншого методу;
- проводити аналіз отриманих рослинних об'єктів;
- самостійно вивчати наукову літературу, в якій описані досягнення сучасної біотехнології рослин.

володіти: методами клітинної та генетичної інженерії рослин.

ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 1 Генетична інженерія

ТЕМА 1. Біотехнологія рослин: основні завдання та можливі шляхи їх вирішення **(2 години)**

ТЕМА 2. Стабільна трансформація ядерного геному рослин **(20 годин)**

ТЕМА 3. Транзйєнтна експресія чужорідних генів в рослинах **(4 години)**

ТЕМА 4. Трансформація позаядерних геномів **(6 годин)**

ТЕМА 5. Аналіз та застосування генетично модифікованих рослин **(14 годин)**

Модульна контрольна робота – **2 год.**

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 2 Клітинна інженерія

ТЕМА 6. Соматична гібридизація вищих рослин. **(18 годин)**

ТЕМА 7. Рослинні системи *in vitro*. **(22 години)**

Модульна контрольна робота – **2 год.**

**СТРУКТУРА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
ТЕМАТИЧНИЙ ПЛАН ЛЕКЦІЙ, СЕМІНАРІВ,
ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ, САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ**

№ з/п	Назва	Кількість годин			
		лекції	семінари	практичні	самостійна робота
Змістовий модуль 1 Генетична інженерія рослин					
1	Тема 1. Агробактерії як інструменти генетичної інженерії рослин.	2	-	-	2
2	Тема 2. Генетичні вектори для трансформації рослин.	2	-	-	4
3	Тема 3. Методи прямого введення чужорідної ДНК в рослинні клітини.	2	-	-	4
4	Тема 4. Шляхи підвищення ефективності експресії перенесених генів в рослинах.	2	2	-	4
5	Тема 5. Транз'єнтна експресія чужорідних генів в рослинах.	2	-	-	4
6	Тема 6. Генетична трансформація пластоми.	2	-	-	4
7	Тема 7. Методи аналізу генетично модифікованих рослин.	2	-	-	4
8	Тема 8. Застосування генетично модифікованих рослин в дослідницькій роботі та в біотехнологічному виробництві.	2	2	-	4
9	Модульна контрольна робота 1		2	-	-
Разом за змістовим модулем 1		16	6		30
Змістовий модуль 2 Клітинна інженерія рослин					
10	Тема 9. Культура ізольованих протопластів та соматична гібридизація вищих рослин.	2	-	-	4
11	Тема 10. Методи аналізу соматичних гібридів.	2	-	-	2
12	Тема 11. Застосування соматичних гібридів у дослідницькій роботі.	2	-	-	2
13	Тема 12. Культури недиференційованих рослинних клітин як об'єкт біотехнології.	2	-	-	4
14	Тема 13. Культури трансгенних коренів.	2	-	-	2
15	Тема 14. Методи отримання рекомбінантних білків з рослинних систем.	2	-	-	4
16	Тема 15. Переваги та ризики, пов'язані з використанням продуктів генетичної та клітинної інженерії в біотехнологічному виробництві.	2	2	-	2
17	Модульна контрольна робота 2. Залік.		2	-	-
Разом за змістовим модулем 2		14	10	-	20
ВСЬОГО		30	10	-	50

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 1

Генетична інженерія рослин

Тема № 1. Агробактерії як інструменти генетичної інженерії рослин – 2 год.
Особливості життєдіяльності *Agrobacterium tumefaciens* та *A. rhizogenes*.
Механізм утворення пухлин у рослин: корончаті гали та бородаті корені.
Природні та модифіковані плазмідні агробактерій. Роль окремих частин Ti- та Ri-плазмід в процесі трансформації рослинних клітин. Ділянка вірулентності та T-ДНК. Роль рослинних білків в процесах транспорту та інтеграції T-ДНК.
Література [1,2,9]

Тема 2. Генетичні вектори для трансформації рослин – 2 год.
Бінарні вектори для агробактеріальної трансформації рослин. Основні складові частини вектора. Гени в межах T-ДНК: селективні та неселективні маркерні гени, цільові гени. Регуляторні елементи, які забезпечують експресію перенесених генів в рослинній клітині. Конструювання векторів на основі вірусів рослин.
Література [1,2,4,9,10]

Тема 3. Методи прямого введення чужорідної ДНК в рослинні клітини – 2 год.
Біобалістичний метод. Електропорація. Введення ДНК при обробці поліетиленгликолем. Мікроін'єкція ДНК та перенос ізольованих хромосом в протопласти.
Література [1,2]

Тема 4. Шляхи підвищення ефективності експресії перенесених генів в рослинах – 2 год.
Фактори, які перешкоджають накопиченню високих кількостей рекомбінантних білків в рослинах. Пост-транскрипційне замовкання генів. Внутрішньоклітинні протеїнази. Конструювання векторів для високоефективної експресії перенесених генів. Використання сигналів внутрішньоклітинної локалізації цільових білків та супресорів замовкання генів.
Література [3,11,12]

Тема 5. Транз'єнтна експресія чужорідних генів в рослинах – 2 год.
Явище тимчасової (транз'єнтної) експресії перенесених генів. Переваги транз'єнтної експресії з точки зору дослідницької роботи та біотехнологічного виробництва. Способи проведення транз'єнтної експресії чужорідних генів в рослинах.
Література [13]

Тема 6. Генетична трансформація пластоми – 2 год.
Особливості організації та експресії генетичного матеріалу пластид. Переваги проведення експресії чужорідних генів в пластидах. Способи генетичної

трансформації пластоми. Вектори для введення чужорідної ДНК в пластом. Селективні маркерні гени, які використовують для відбору рослин з трансформованим пластомом.

Література [1-3]

Тема 7. Методи аналізу генетично модифікованих рослин - 2 год.

Методи доведення наявності трансгенів. Полімеразна ланцюгова реакція. Блот-гібридизація ДНК за методом Саузерна. Дослідження експресії трансгенів на рівні транскрипції (ПЛР у комбінації із зворотною транскрипцією, нозерн-блот гібридизація) та трансляції (вестерн-блот гібридизація, аналіз продуктів маркерних генів, визначення активності цільових білків).

Література [1,2,4,18,19]

Тема 8. Застосування генетично модифікованих рослин в дослідницькій роботі та в біотехнологічному виробництві – 2 год.

Визначення функцій окремих генів в рослинному організмі. Експресія нових генів або супер-експресія додаткових генів рослини. Пригнічення експресії власних генів рослини шляхом транскрипції в антисенс-орієнтації або індукції пост-транскрипційного замовкання. Вивчення функцій регуляторних елементів: промоторів, нетрансльованих ділянок транскриптів, сигналів внутрішньоклітинної локалізації білків. Дослідження міжбілкових взаємодій.

Література [3,4]

Модульна контрольна робота 1 – 2 год.

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 2

Клітинна інженерія рослин

Тема 9. Культура ізольованих протопластів та соматична гібридизація вищих рослин – 2 год.

Виділення та культивування протопластів вищих рослин. Злиття протопластів різних видів рослин. Асиметрична гібридизація. Методи селекції соматичних гібридів. Використання мутантних та генетично модифікованих батьківських рослин.

Література [5-7]

Тема 10. Методи аналізу соматичних гібридів – 2 год.

Аналіз ядерного геному. Цитогенетичні дослідження. Визначення ізоформ ферментів. Вивчення організації геномів хлоропластів та мітохондрій. Аналіз ДНК за допомогою ендонуклеаз рестрикції, ПЛР, блот-гібридизації. Аналіз вторинних метаболітів.

Література [5-7]

Тема 11. Застосування соматичних гібридів у дослідницькій роботі – 2 год.

Вивчення ядерно-цитоплазматичних взаємодій. Дослідження просторової організації ядерного геному. Поява нових метаболітів. Отримання віддалених гібридів.

Література [5-7]

Тема 12. Культури недиференційованих рослинних клітин як об'єкт біотехнології – 2 год.

Калусні та суспензійні культури недиференційованих рослинних клітин. Накопичення цінних метаболітів в культурах недиференційованих клітин. Шляхи підвищення продуктивності: елісітація, генетична трансформація. Культури недиференційованих клітин як джерело рекомбінантних білків.

Література [8,14]

Тема 13. Культури трансгенних коренів – 2 год.

Отримання культур бородатих коренів. Переваги культур трансгенних коренів з точки зору біотехнологічного виробництва: генетична стабільність та можливість секреції цільового продукту. Утворення нових метаболітів.

Література [2,15]

Тема 14. Методи отримання рекомбінантних білків з рослинних систем – 2 год.

Переваги рослинних систем з точки зору виробництва рекомбінантних білків. Підходи, які дозволяють досягти високого рівня накопичення цільового білку: вдосконалення генетичних конструкцій, трансформація пластоми, транз'єнтна експресія. Методи очищення рекомбінантних білків. Афінна хроматографія з використанням білкових міток. Їстівні вакцини.

Література [16,17]

Тема 15. Переваги та ризики, пов'язані з використанням продуктів генетичної та клітинної інженерії в біотехнологічному виробництві – 2 год.

Вивчення впливу продуктів генетичної інженерії на здоров'я людей та стан довкілля. Методи контролю за розповсюдженням трансгенів. Законодавче регулювання застосування генетично модифікованих рослин.

Література [1,18,19]

Модульна контрольна робота 2 – 2 год. Залік.

КОНТРОЛЬ ЗНАНЬ І РОЗПОДІЛ БАЛІВ, ЯКІ ОТРИМУЮТЬ ЗДОБУВАЧІ

Контроль здійснюється за модульно-рейтинговою системою. У змістовий модуль 1 входять теми 1-8, у змістовий модуль 2 – теми 9-15. Види контролю - поточний і підсумковий. Поточний контроль здійснюється під час проведення навчальних занять і має на меті регулярну перевірку засвоєння слухачами навчального матеріалу. Форми проведення поточного контролю під час

навчальних занять: усне опитування, тестовий контроль, самооцінювання, перевірка практичних навичок.

Оцінювання за формами поточного контролю:

Максимальна кількість балів	Змістовий модуль 1		Змістовий модуль 2		Залік	Підсумкова оцінка
	Поточний контроль	Тест 1	Поточний контроль	Тест 2		
	10	20	10	20	40	100
Сума	30		30		40	100

Для аспірантів, які набрали за результатами поточного контролю у двох змістових модулях сумарно меншу кількість балів, ніж критичний мінімум 30 балів, проходження додаткового тестування є обов'язковим для допуску до заліку.

Підсумковий контроль проводиться на останньому практичному занятті і складається із суми балів усіх змістових модулів.

Загальна оцінка за вивчення курсу складається із суми оцінок, отриманих при підсумковому контролі, та оцінки, отриманої на заліку.

Шкала оцінювання академічної успішності аспіранта

Рівень досягнень (бали за освітню діяльність)	Оцінка ЄКТС/ECTS	Оцінка за національною шкалою (National grade)
90 – 100	A	відмінно (Excellent)
75 – 89	B	добре (Good)
60 – 74	C	задовільно (Satisfactory)
1 – 59	D	незадовільно (Fail)

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна література

1. Кучук Н.В. Генетическая инженерия высших растений. – К., Наукова думка, 1997.
2. Генная инженерия растений (под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена). - М., Мир, 1991.
3. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. – М.: Наука, 2000.
4. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы, Т.1. – М.: Наука, 2004.
5. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Слияние протопластов и генетическое конструирование протопластов. – К., Наукова думка, 1982.
6. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. - К., Наукова думка, 1984.

7. Сидоров В.А., Глеба Ю.Ю. Соматическая гибридизация пасленовых. - К., Наукова думка, 1985.
8. Fontanel A., Tabata M. Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures. Present aspects and prospects. // Nestle Research News 1986/87. – Vevey: Nestec Ltd., 1987. – P.93–103.

Додаткова література

9. Gelvin S.B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 2004. - Vol.67 - P.16-37
10. Miki B., VcHugh S. Selectable marker genes i transgenic plants: applications, altenatives and biosafety // J. Biotech. – 2004 – VI. 107 – P. 193-232.
11. Streatfield S.J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. // Plant Biotechnol. J. - 2007. -Vol. 5 – P. 2-15.
12. Benchabane M., Goulet C., et al. Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. // Plant Biotechnol J - 2008. - Vol. 6 - P.633-48.
13. Sheludko Y.V. *Agrobacterium*-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants. // Recent Patents on Biotechnology. – 2008. – Vol. 2. – P. 198-208.
14. Vanisree M., Lee C.-Y., Lo S.F. et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue culture // Bot. Bull. Acad. Sin. – 2004 – Vol. 45 – P. 1-22.
15. Hashimoto T., Yun D.J. Yamada Y. Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures // Phytochemistry. – 1993. – Vol. 32. – P. 713–718
16. Larrick J.W., Thomas D.W. Producing proteins in transgenic plants and animals. // Curr. Opin. Biotechnol. – 2001. – Vol. 12. – P. 411-418.
17. Daniell H., Streatfield S.J., Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. // Trends in Plant Sci. – 2001. – Vol. 6. – P. 219–226.
18. Elenis et al. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms // Anal Bioanal Chem - 2008. -Vol. 392 - P. 347-354.
19. Marmiroli et al. Methods for detection of GMOs in food and feed // Anal Bioanal Chem - 2008. - Vol. 392 - P. 369-384.