

# Практическая работа № 1

Задание: Для изучения особенностей питания микроорганизмов удобным модельным объектом является *Aspergillus niger*, который легко получить и использовать в постановке экспериментов, в том числе для определения значения различных минеральных элементов для роста.

Состав питательной среды: 20% раствор сахарозы, 1% раствор сульфата цинка, борная кислота, сульфат марганца, 10% раствор нитрат аммония, дигидрофосфат калия, хлорид калия, дигидрофосфат натрия, сульфат магния, хлорид магния, сульфат железа, хлорид железа (III), сульфат натрия.

Объем среды 30 мл.

При изучении влияния состава минеральной среды на рост культуры были поставлены следующие задачи:

Вариант 1 – полная питательная среда без микроэлементов:

**Вариант 1** – полная питательная среда без микроэлементов, %:

Сахароза-10,0; нитрат аммония- 0,3; дигидрофосфат калия – 0,2; сульфат магния – 0,05; сульфат железа – 0,01.

**Вариант 2**- среда *без углерода*.

**Вариант 3** – среда *без азота* (исключен нитрат аммония)

**Вариант 4** – *без фосфора*, дигидрофосфат калия заменен на эквивалентное содержание хлорида калия;

**Вариант 5** – *без калия*; дигидрофосфат калия заменен на эквивалентное содержание дигидрофосфат натрия;

**Вариант 6** – *без серы*; сульфат магния заменен на эквивалентное содержание сульфат натрия;

**Вариант 7** – *без магния*; сульфат магния заменен на эквивалентное содержание сульфат натрия;

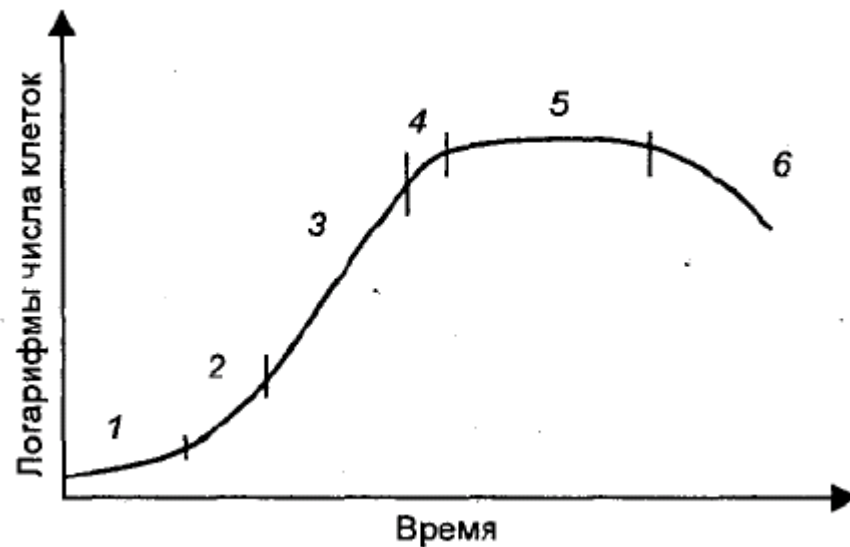
**Вариант 8** – *без железа*; сульфат железа (III) заменен на эквивалентное содержание сульфат натрия;

**Вариант 9** – *полная питательная среда с добавлением цинка*: сульфат цинка – 0,01%;

**Вариант 10** – *полная питательная среда с добавлением марганца*: сульфат марганца – 0,01%;

**Вариант 11** - *полная питательная среда с добавлением борной кислоты*: борная кислота – 0,01%;

**Задача:** Сравните кривые роста микроорганизмов при получении первичных и вторичных метаболитов в биотехнологическом производстве. Назовите фазы роста.



### Задачи:

1. Суперпродуцент – это биообъект промышленного использования. Как можно получить его и какими свойствами он должен обладать в отличие от природного штамма культуры?
2. Проведите сравнительную характеристику каллусных и суспензионных культур при использовании их в качестве субстрата для получения БАВ биотехнологическими методами.
3. Получение субстанции аскорбиновой кислоты является многостадийным процессом, в котором сочетаются методы органического и микробиологического синтеза. Какой предшественник аскорбиновой кислоты получают с использованием биотехнологии и каково значение этого этапа для всего процесса в целом?
4. При получении БАВ рост каллусной ткани в процессе ферментации осуществляется в несколько этапов. В какой фазе необходимо стимулировать активность клеток?
5. В процессе ферментации растительных клеток для увеличения выхода целевого продукта (например, шиконина) было предложено значительно увеличить температуру до 37°C, объем ферментера (более 2000 л), использовать трехлопастную мешалку, увеличить подачу кислорода и повысить влажность среды с 50% до 60-70%. Определите, какие ошибки были допущены при выборе условий ферментации?

# Практическое задание 2

# Задание 1

Биосинтез ЛС или БАВ в условиях производства требует создания стерильных условий при многостадийности всего процесса в целом. При этом для успешного осуществления биосинтеза необходимо не допустить контаминации целевого продукта.

**В условиях поставленной задачи укажите:**

- в чем выражается многостадийность биосинтеза;
- способы предотвращения контаминации целевого продукта;
- схему очистки воздуха, используемую в процессе биосинтеза.



# Задание 2

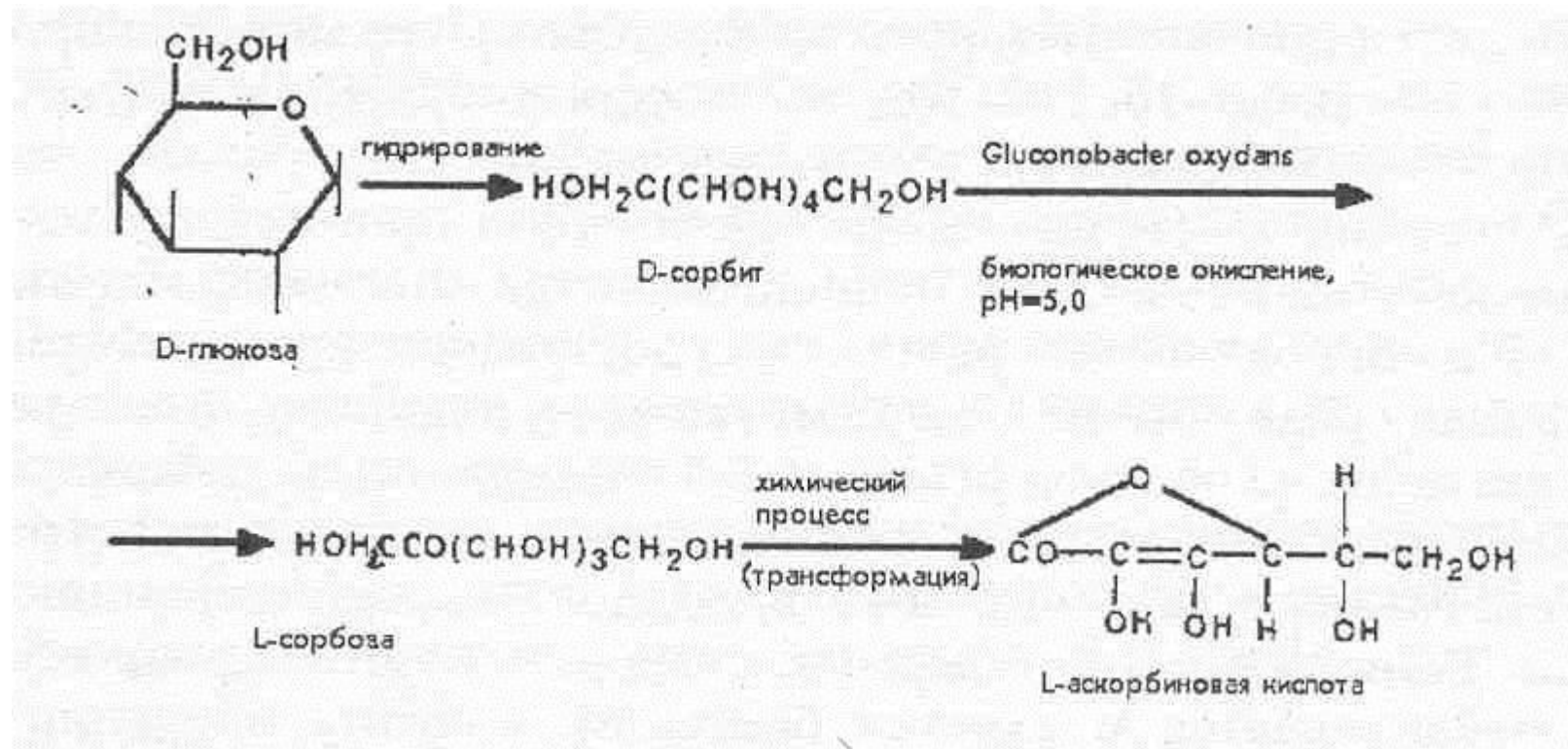
В процессе промышленного производства аскорбиновой кислоты используют многостадийный химический синтез, в который наряду с тонкими химическими реакциями встроена и технологически необходимая биосинтетическая реакция, что является одним из примеров успешного сочетания органического синтеза с биосинтезом.

При проведении технологического этапа биосинтеза на производстве применяют определенные микроорганизмы, осуществляющие биосинтетические реакции. Не менее важными являются оптимизация условий ферментации и контроль за количеством биомассы микроорганизмов в ферментационном аппарате.

## **Проанализируйте ситуацию с точки зрения:**

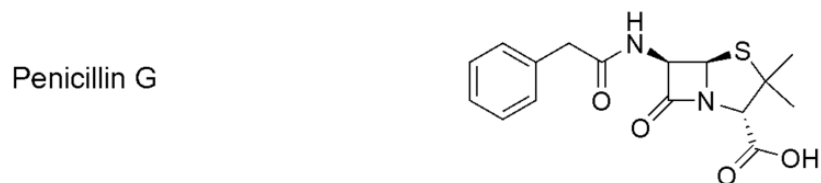
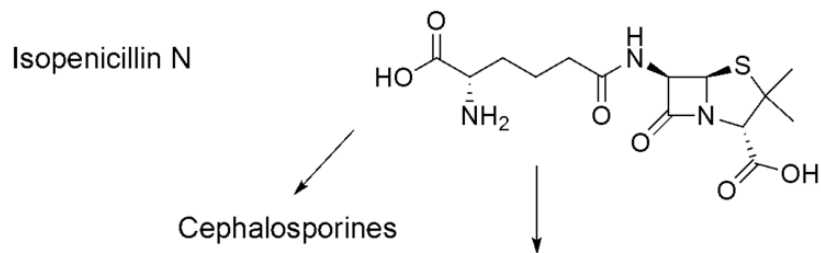
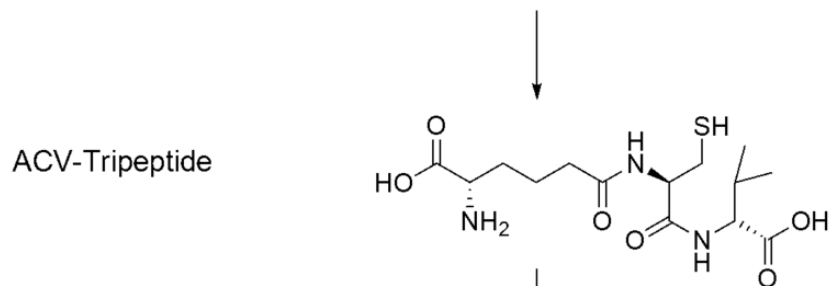
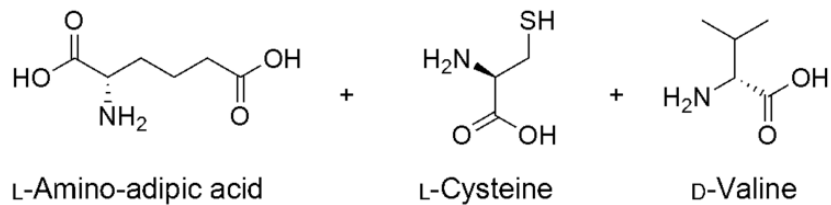
1. химической реакции биотрансформации, определяющей проведение биосинтеза и получение ожидаемого результата при осуществлении биотрансформации;
2. выбора микроорганизмов для биоконверсии и оптимального подбора компонентов питательной среды (источников углерода, азота и фосфора);
3. возможности увеличения выхода целевого продукта.

# Схема получения аскорбиновой КИСЛОТЫ



# Задание 3

При производстве пенициллина в начале ферментации было добавлено в питательную среду определенное количество фенилуксусной кислоты, что привело к снижению выхода целевого продукта. Какая ошибка была допущена в данном процессе?



Биосинтез пенициллина. На первой стадии происходит конденсация трех аминокислот, на второй — окисление трипептида и образование двуциклического интермедиата — пенициллина N, на третьей — трансаминирование и образование пенициллина G

# Задание 4

Для эффективного проведения биотехнологического процесса большое значение имеет питательная среда, в которой микроорганизмы-продуценты БАВ используют в качестве источника азота различные азотсодержащие соединения, содержащие аминный азот или ионы аммония. Какие условия проведения ферментации по источнику азота при получении антибиотиков будут являться оптимальными?

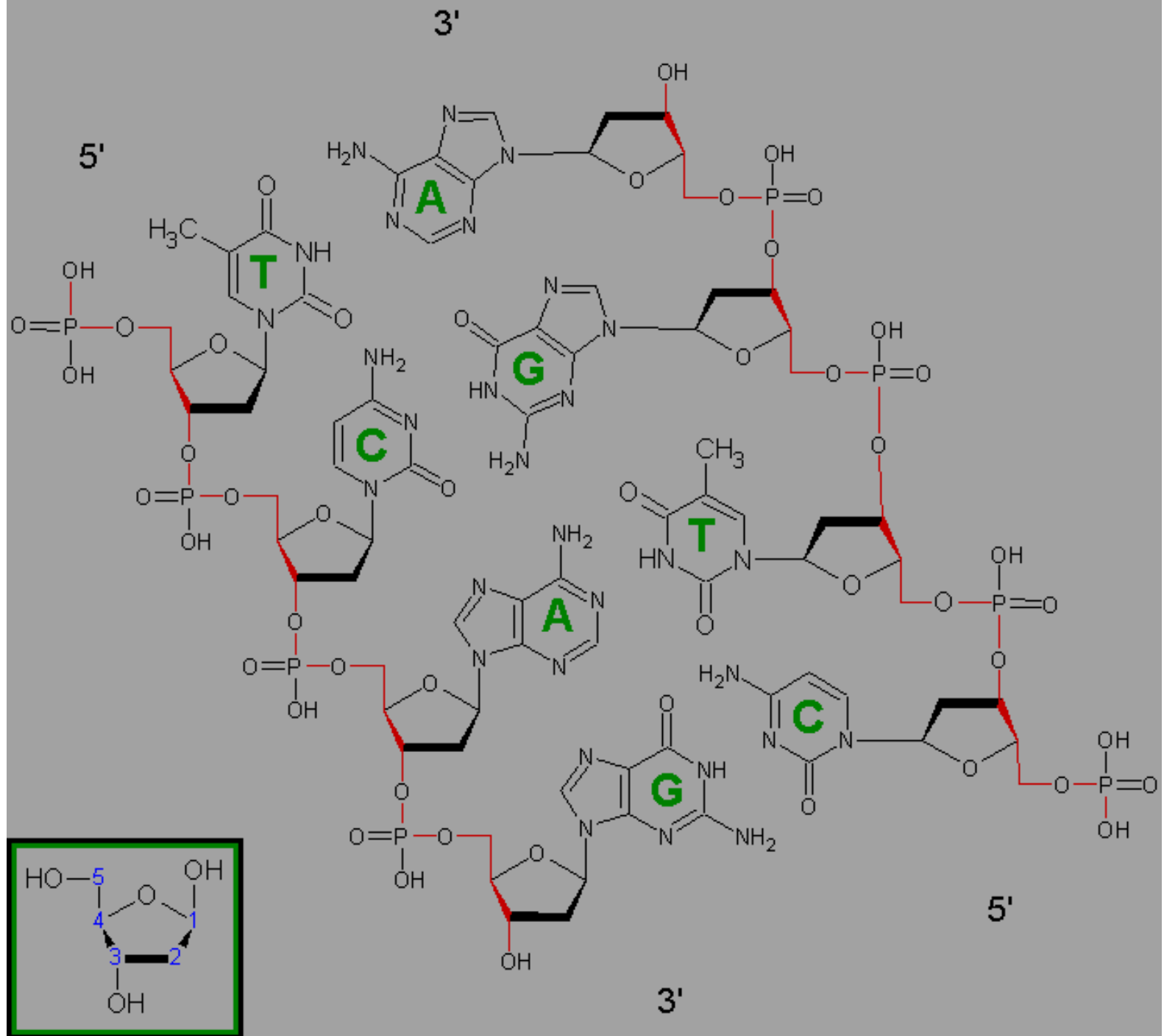
# Домашнее задание

Как известно, производство витамина В12 (кобаламин\*) является чисто биотехнологическим способом его получения, когда в качестве продуцента данного витамина используют пропионовые бактерии из рода *Propionibacterium*, выращиваемые на богатой среде в определенных условиях ферментации с обязательным добавлением предшественника витамина В12 - 5, 6-диметилбензимидазола.

## **В этой ситуации:**

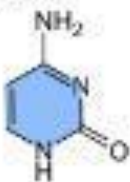
1. сделайте оптимальный выбор метода ферментации и условий ее проведения;
2. докажите необходимость добавления 5,6-диметилбензимидазола в определенное время после начала ферментации и предупредите образование коферментной формы витамина В12;
3. предложите методы выделения и очистки данного витамина, учитывая место его накопления.

**Практическая работа №3**  
**ПЦР. Параметры реакции. Taq-**  
**полимераза. Праймеры. Real-time**  
**ПЦР. Анализ нуклеотидной**  
**последовательности**  
**(OligoAnalyzer 3.1, NCBI BLAST)**



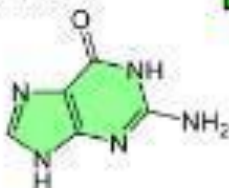


Cytosine



**C**

Guanine



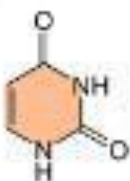
**G**

Adenine



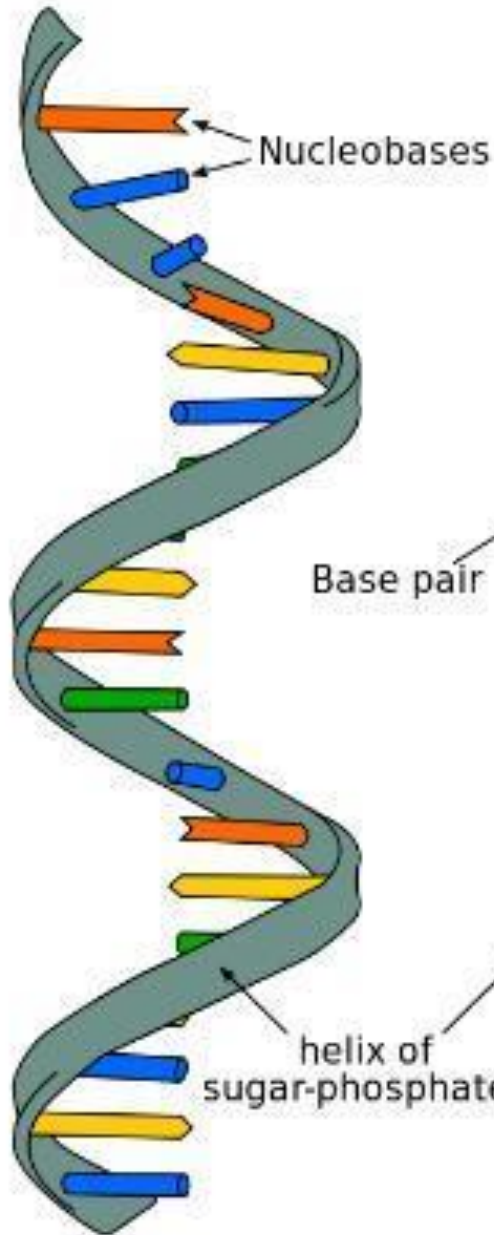
**A**

Uracil



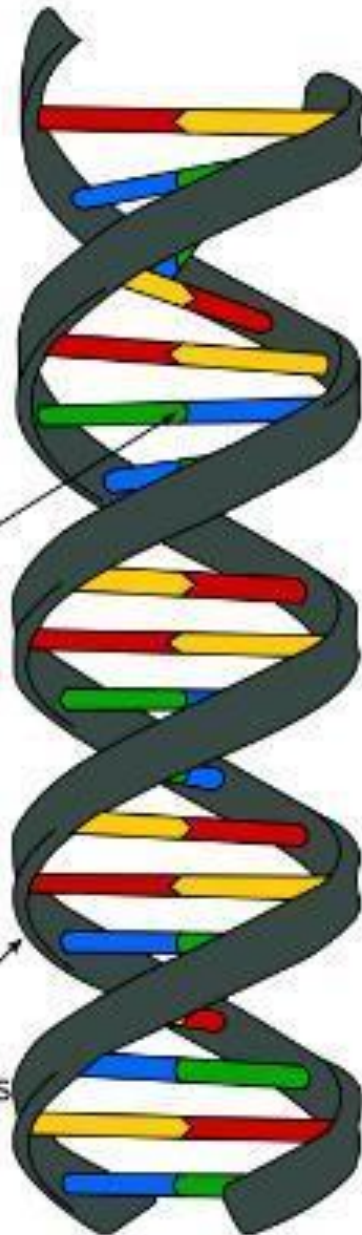
**U**

Nucleobases  
of RNA



**RNA**

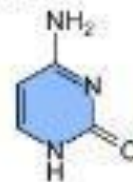
Ribonucleic acid



**DNA**

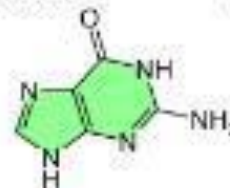
Deoxyribonucleic acid

Cytosine



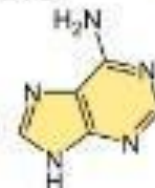
**C**

Guanine



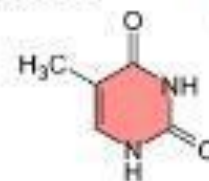
**G**

Adenine



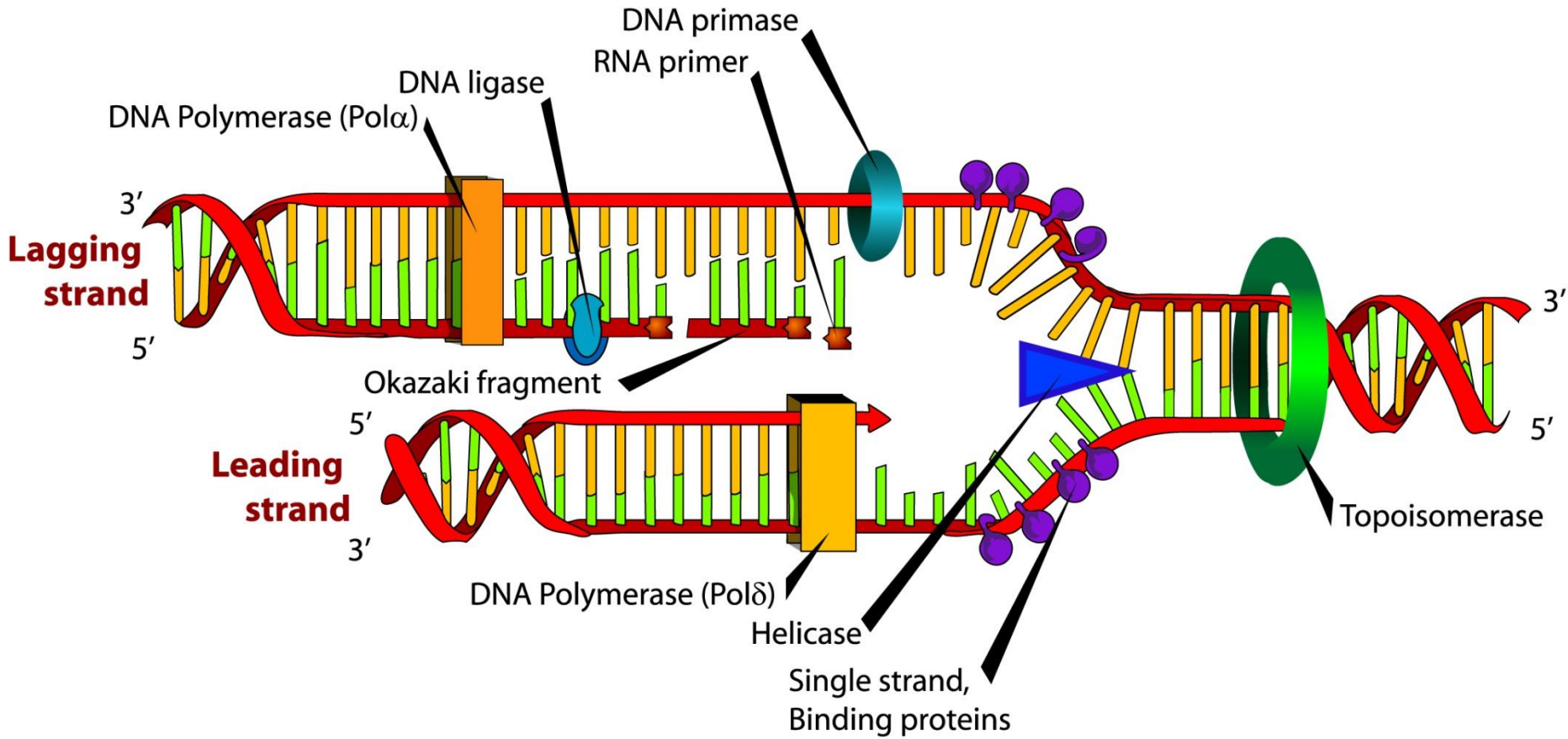
**A**

Thymine



**T**

Nucleobases  
of DNA



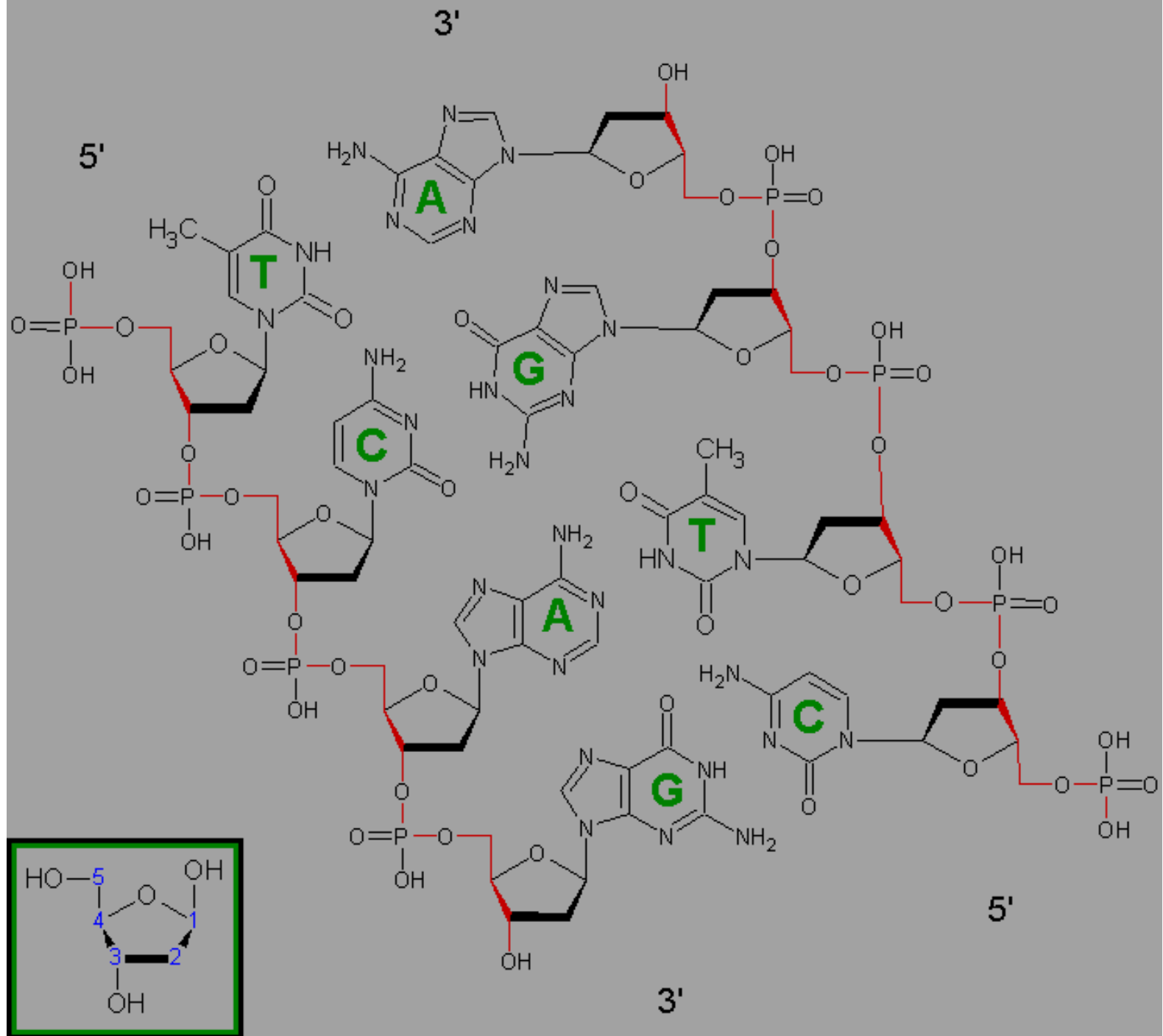
## Стандартные обозначения полиморфных позиций:

Символ	Обозначает	Объяснение
R	A или G	puRine
Y	C или T	pYrimidine
M	A или C	aMino
K	G или T	Keto
S	C или G	сильное /Strong/ взаимодействие - три водородные связи
W	A или T	слабое /Weak/ взаимодействие - две водородные связи
H	(A, C, T) но не G	H следует за G в алфавите
B	(C, G, T) но не A	B следует за A в алфавите
V	(A, C, G) но не T(U)	V следует за T(U) в алфавите
D	(A, G, T) но не C	D следует за C в алфавите
N	(A, G, C, T)	любое основание / Nucleotide

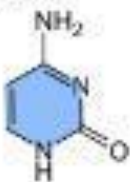
[http://molbiol.ru/scripts/01\\_12.html](http://molbiol.ru/scripts/01_12.html)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**Практическая работа №4**  
**ПЦР. Параметры реакции. Taq-**  
**полимераза. Праймеры. Real-time**  
**ПЦР. Анализ нуклеотидной**  
**последовательности**  
**(OligoAnalyzer 3.1, NCBI BLAST)**

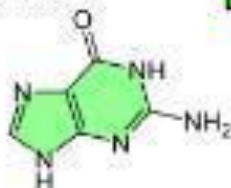


Cytosine



**C**

Guanine



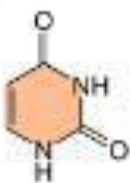
**G**

Adenine



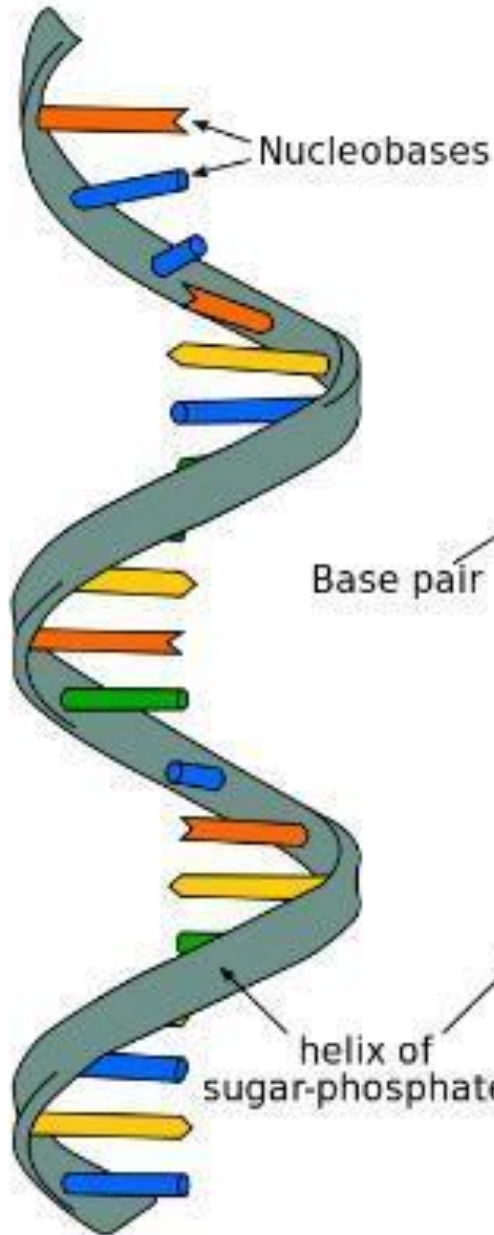
**A**

Uracil

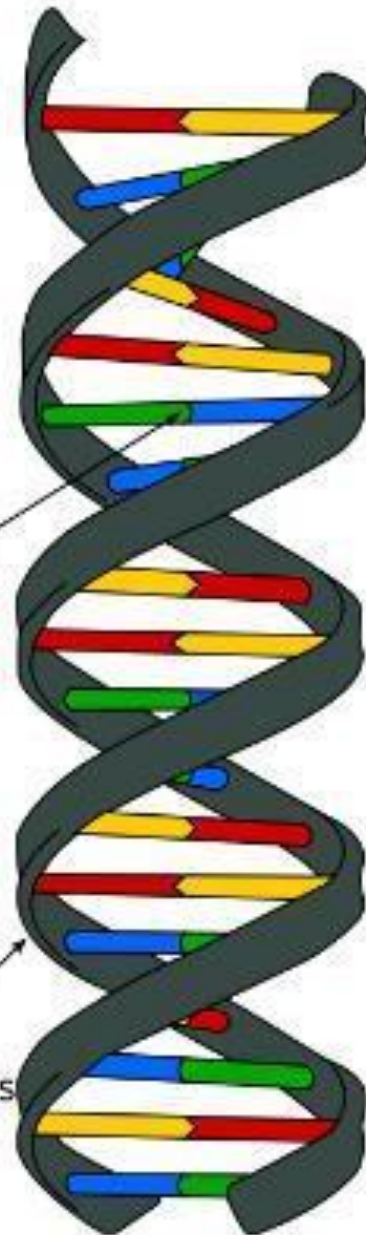


**U**

Nucleobases  
of RNA

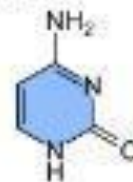


**RNA**  
Ribonucleic acid



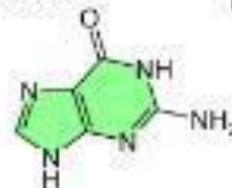
**DNA**  
Deoxyribonucleic acid

Cytosine



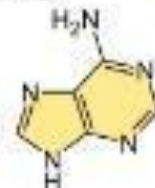
**C**

Guanine



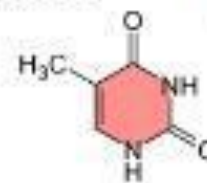
**G**

Adenine



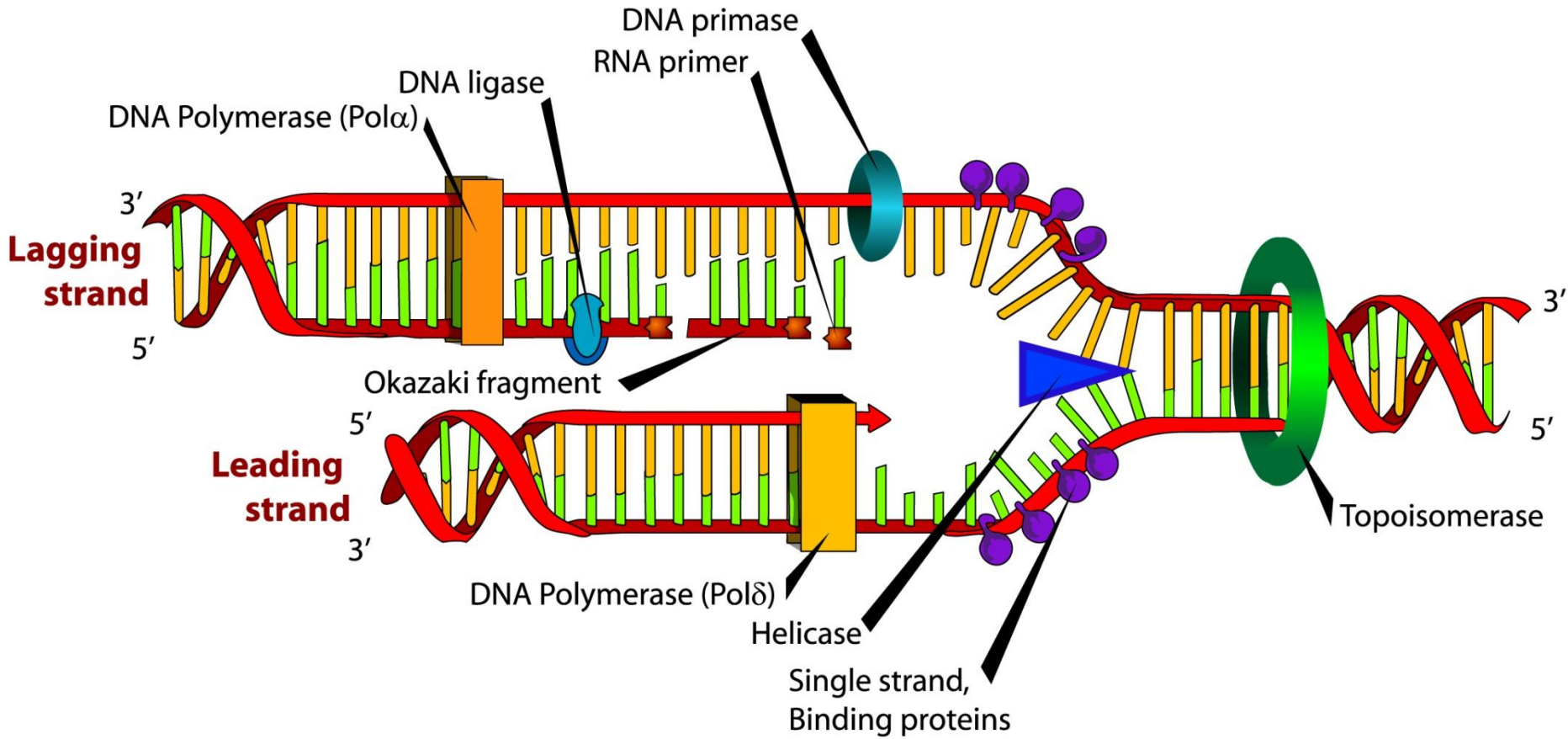
**A**

Thymine



**T**

Nucleobases  
of DNA



## Стандартные обозначения полиморфных позиций:

Символ	Обозначает	Объяснение
R	А или G	puRine
Y	С или T	pYrimidine
M	А или C	aMino
K	G или T	Keto
S	С или G	сильное /Strong/ взаимодействие - три водородные связи
W	А или T	слабое /Weak/ взаимодействие - две водородные связи
H	(A, C, T) но не G	H следует за G в алфавите
B	(C, G, T) но не A	B следует за A в алфавите
V	(A, C, G) но не T(U)	V следует за T(U) в алфавите
D	(A, G, T) но не C	D следует за C в алфавите
N	(A, G, C, T)	любое основание / Nucleotide

[http://molbiol.ru/scripts/01\\_12.html](http://molbiol.ru/scripts/01_12.html)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



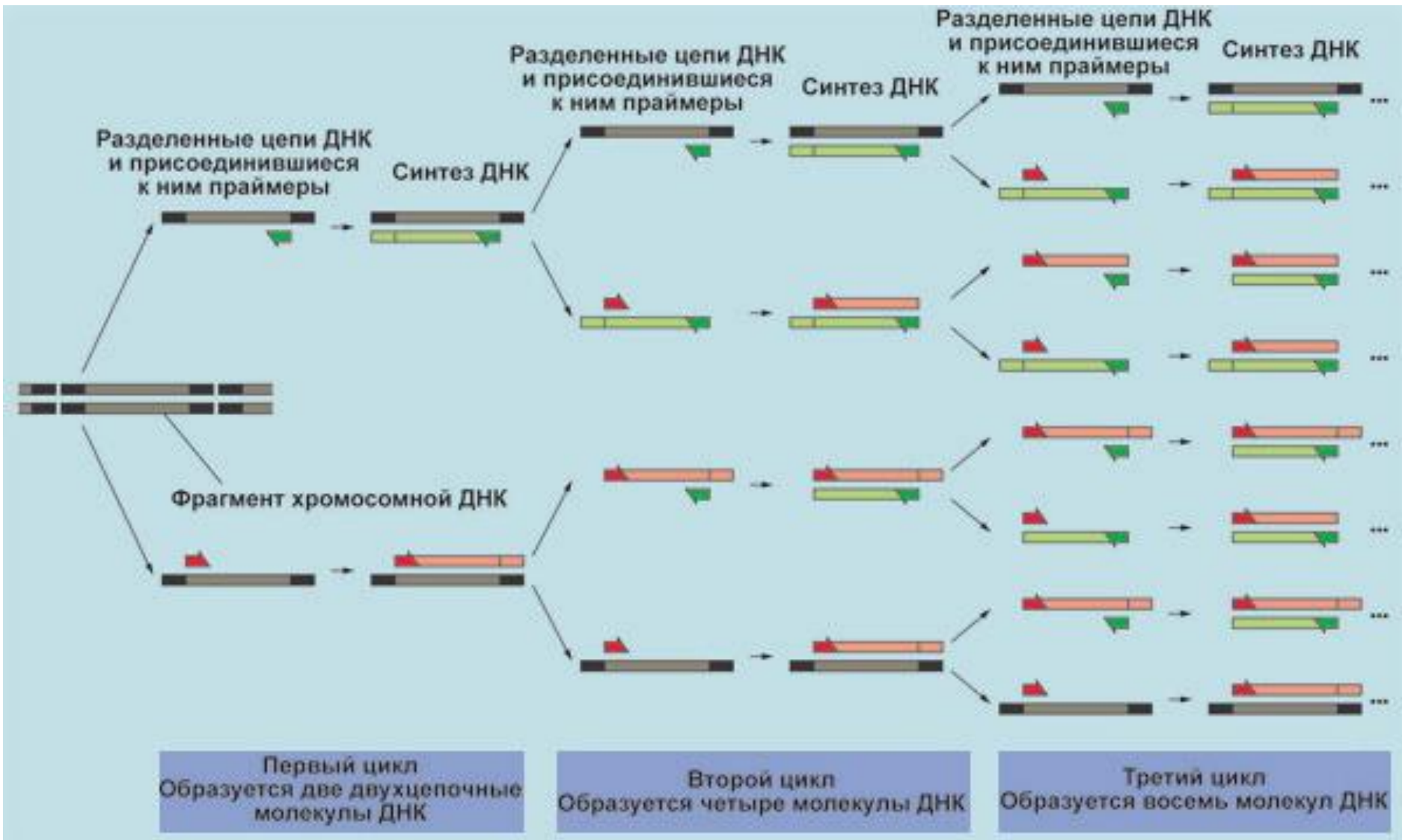


Схема ПЦР реакции

$$T_m = 77.1 + 11.7 \lg[K^+] + \frac{41(G + C) - 528}{L} - 0.75[\%DMSO]$$

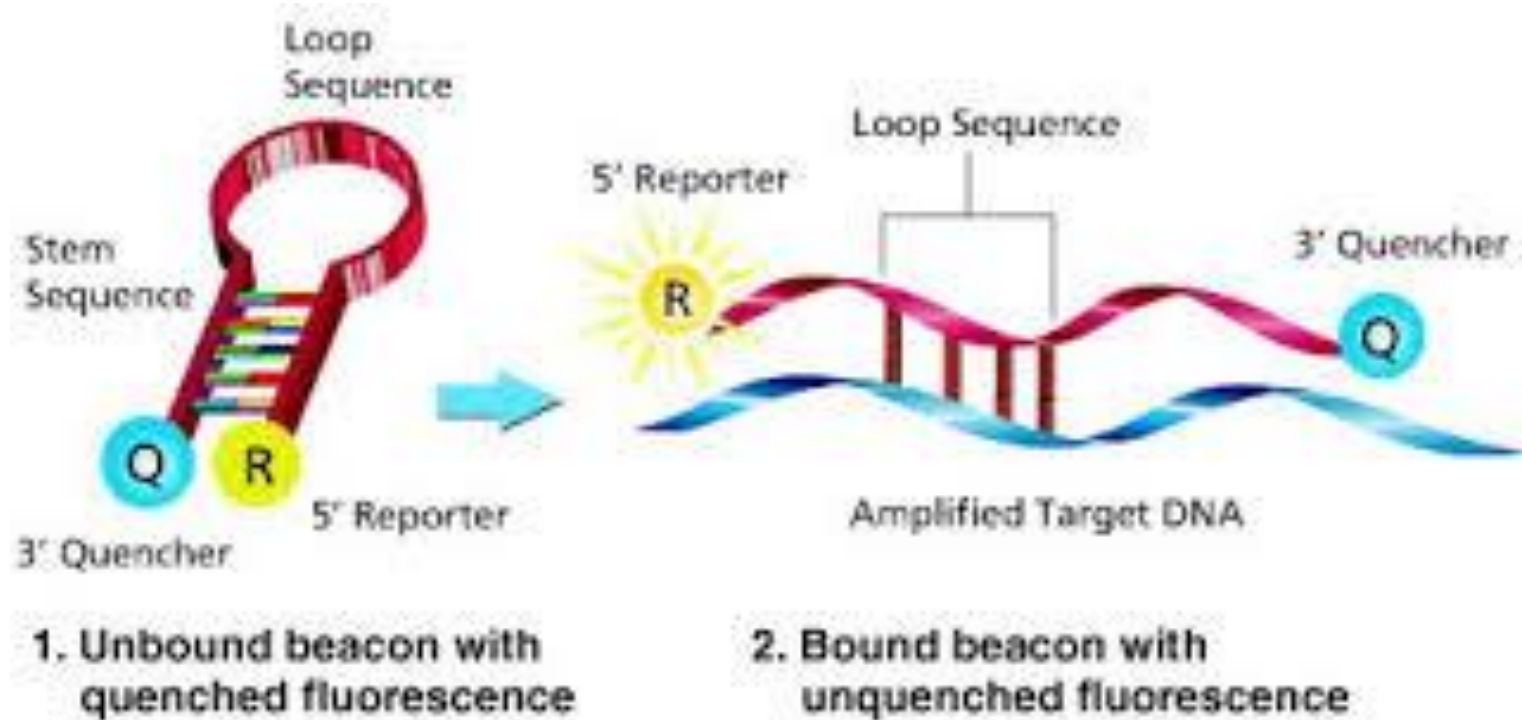
где  $L$  — длина праймера (количество нуклеотидов);

$K^+$  — молярная концентрация ионов калия;

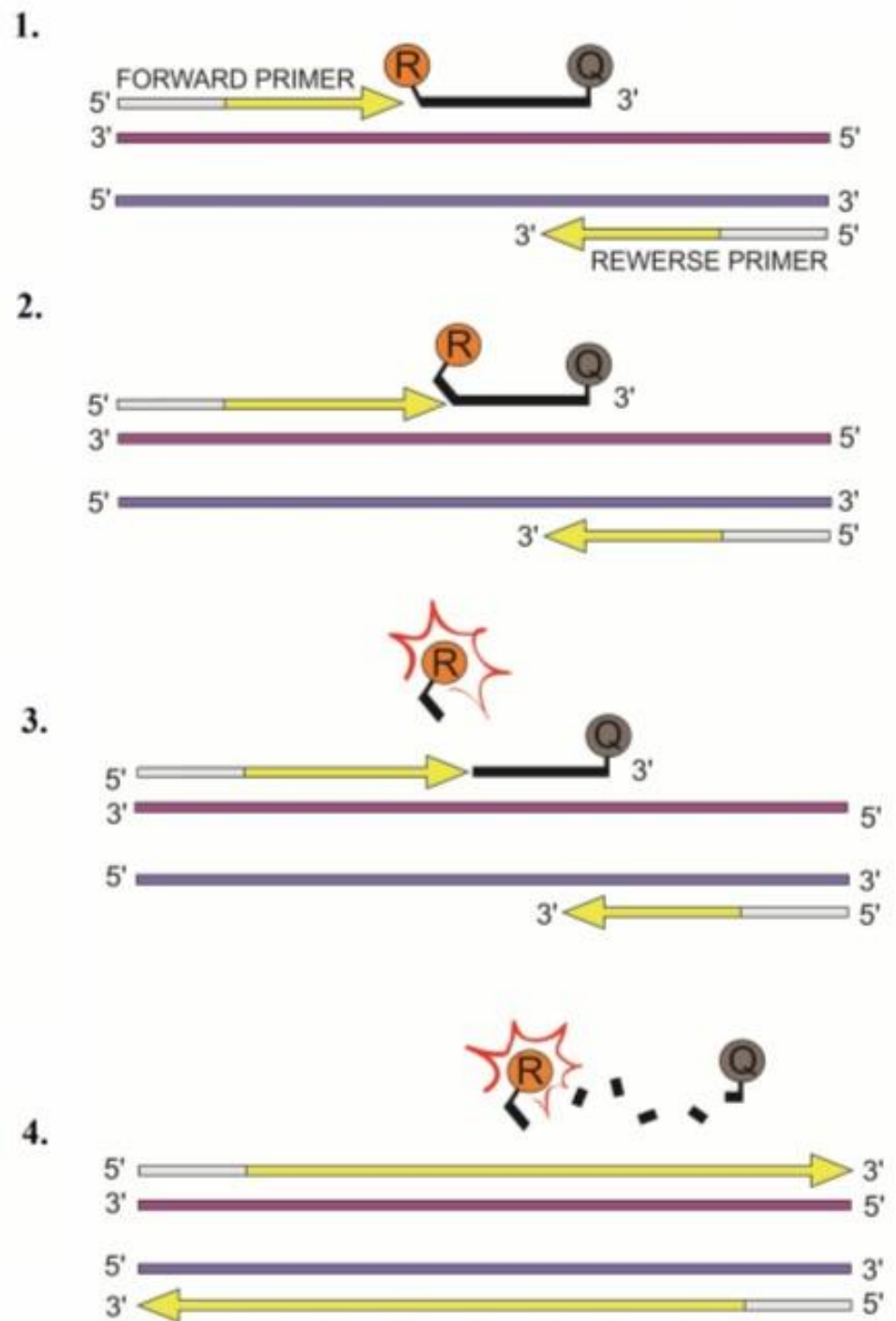
$G+C$  — сумма всех гуаниновых и цитозинового оснований в праймере

# Флуоресцентное детектирование -

1. Интеркалятор дцДНК
2. Molecular beacon

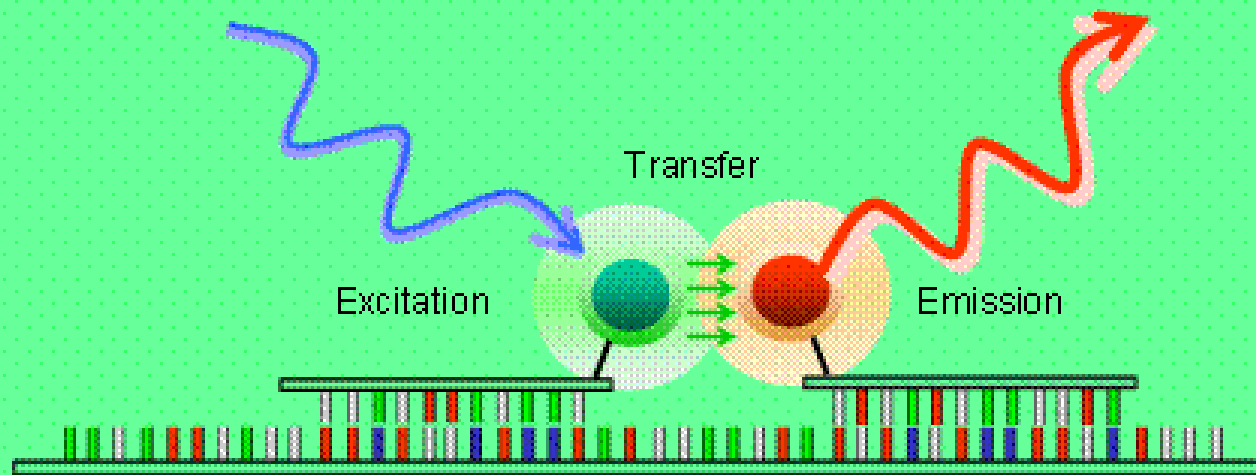


# 3. Taqman

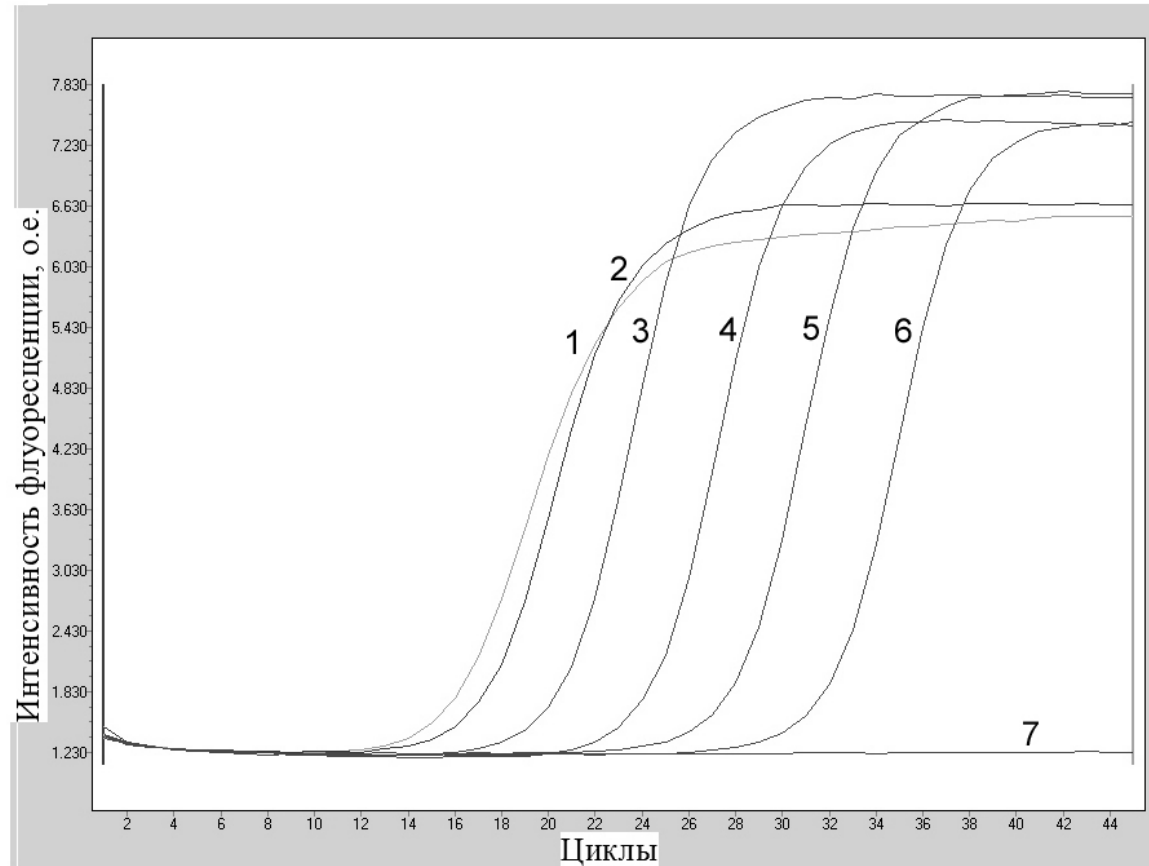


## 4. FRET-Probe

### FRET Probes



# Real-time PCR

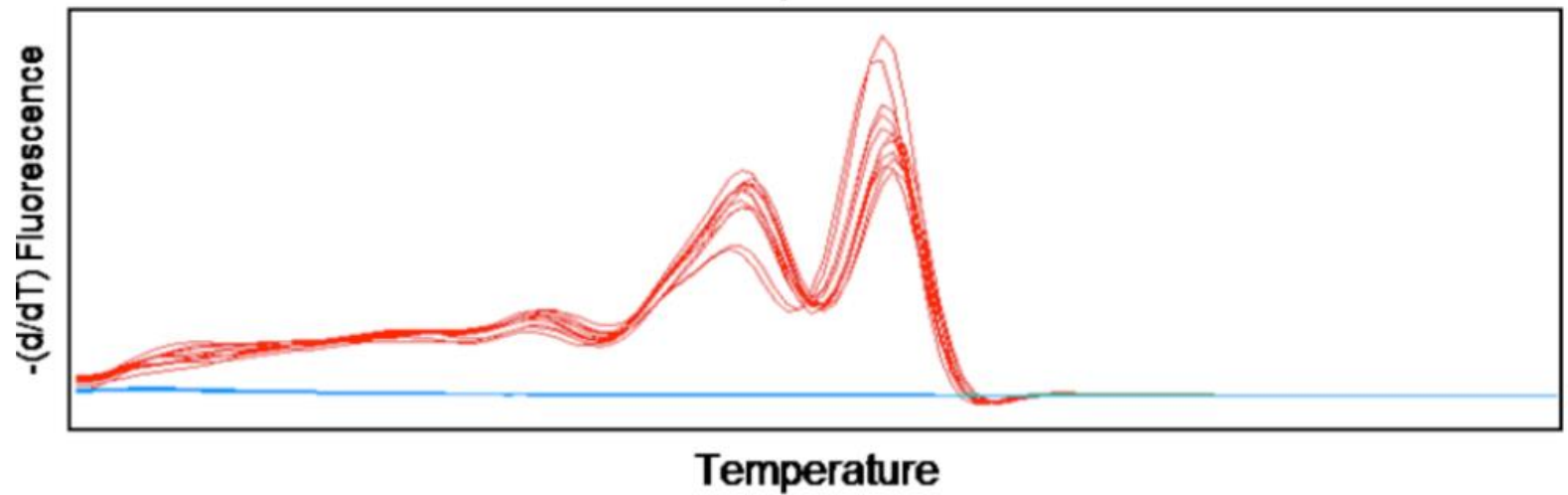
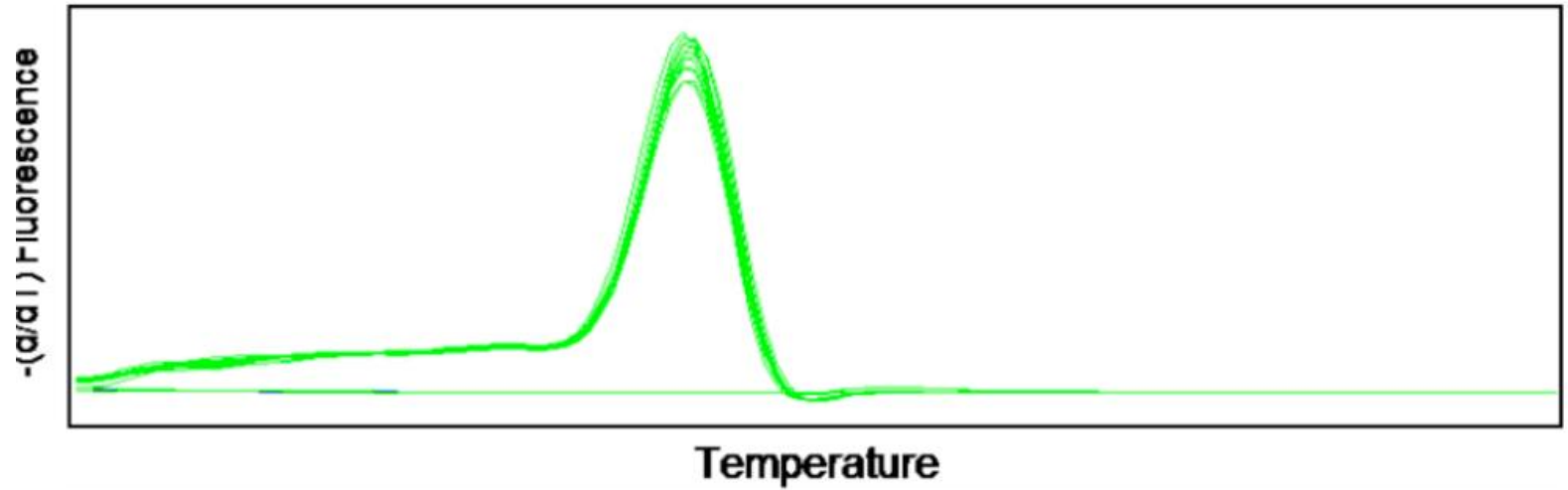


## Кинетические кривые амплификации (Roche)

1, 2 – исследуемые образцы

3-6 последовательные разведения контрольной кДНК 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000,

7 – отрицательный контроль



Кривые плавления (Melting curve)

# Самостоятельная работа

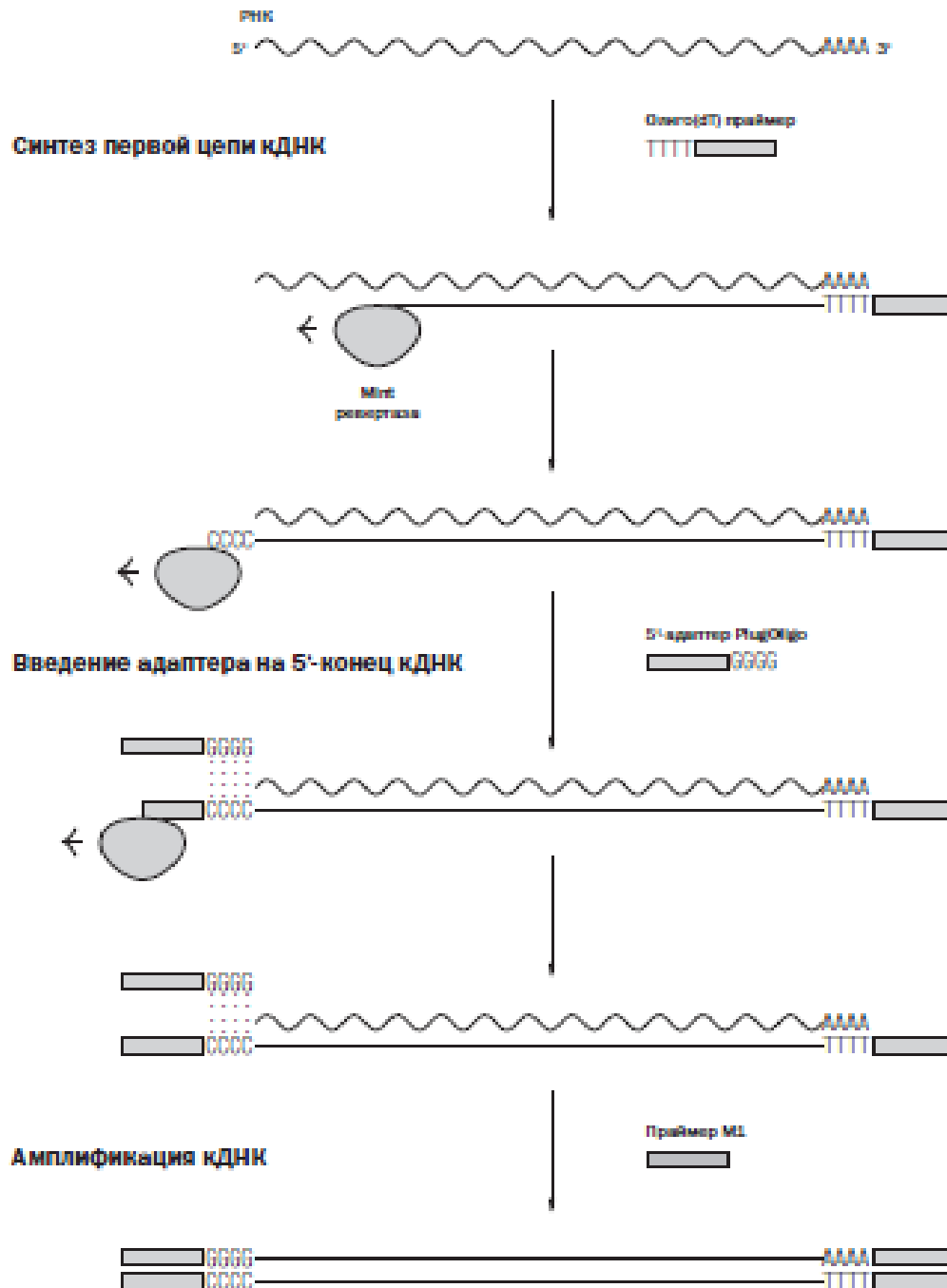
- <https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>
- [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=)



**Практическая работа №5  
Синтез кДНК на матрице  
суммарной РНК (обратная  
транскрипция). Секвенирование -  
определение последовательности  
нуклеотидов**

# Синтез кДНК на матрице суммарной РНК.

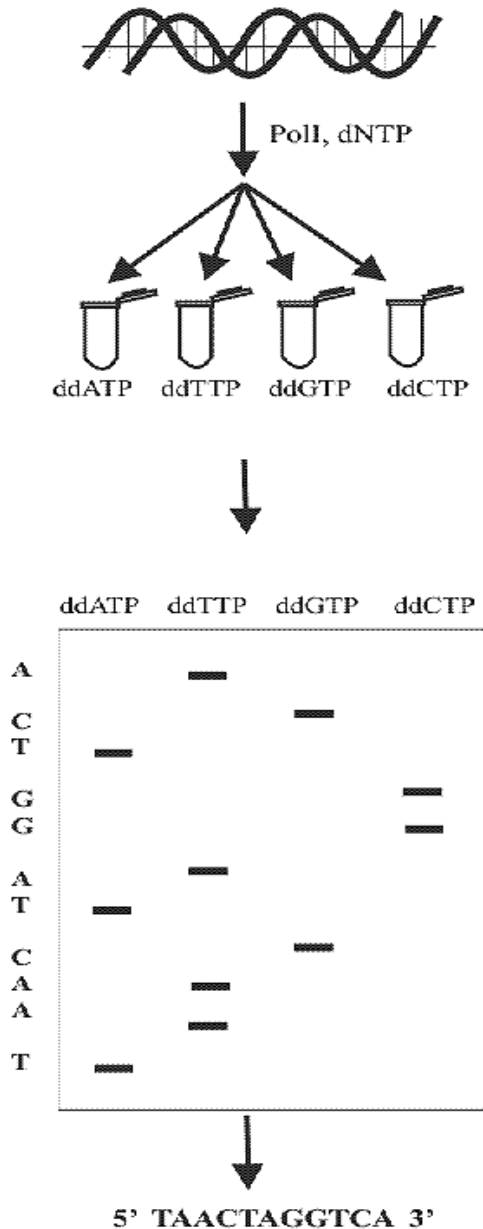
Метод template switching cDNA synthesis



# Метод Сенгера.

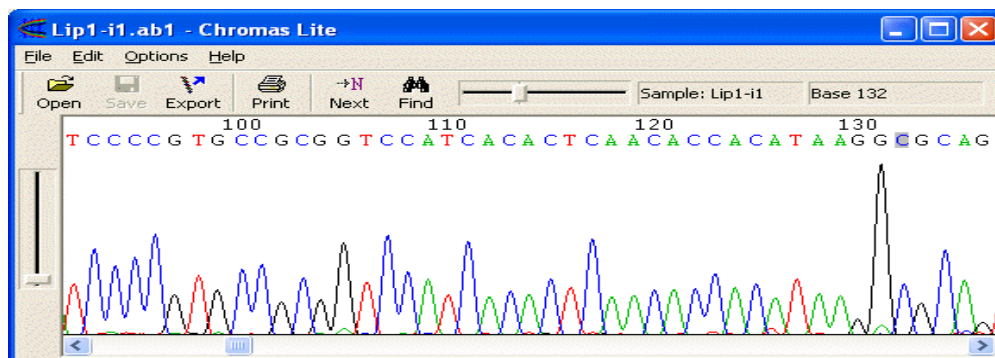
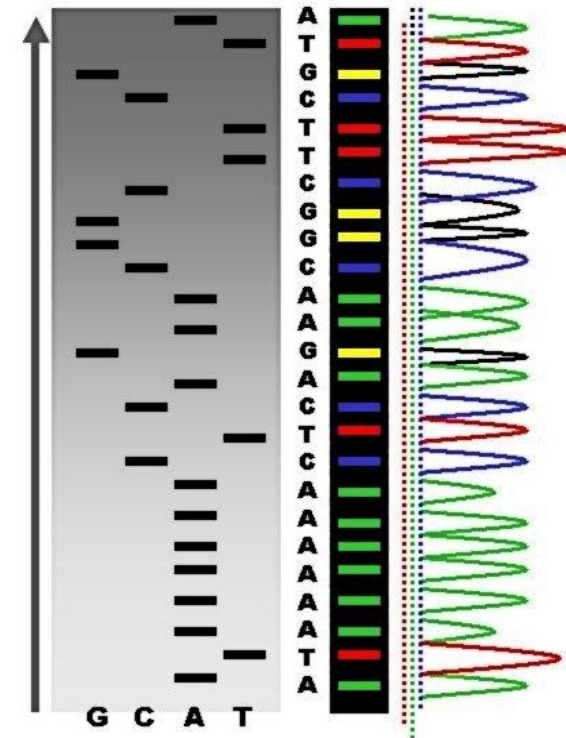
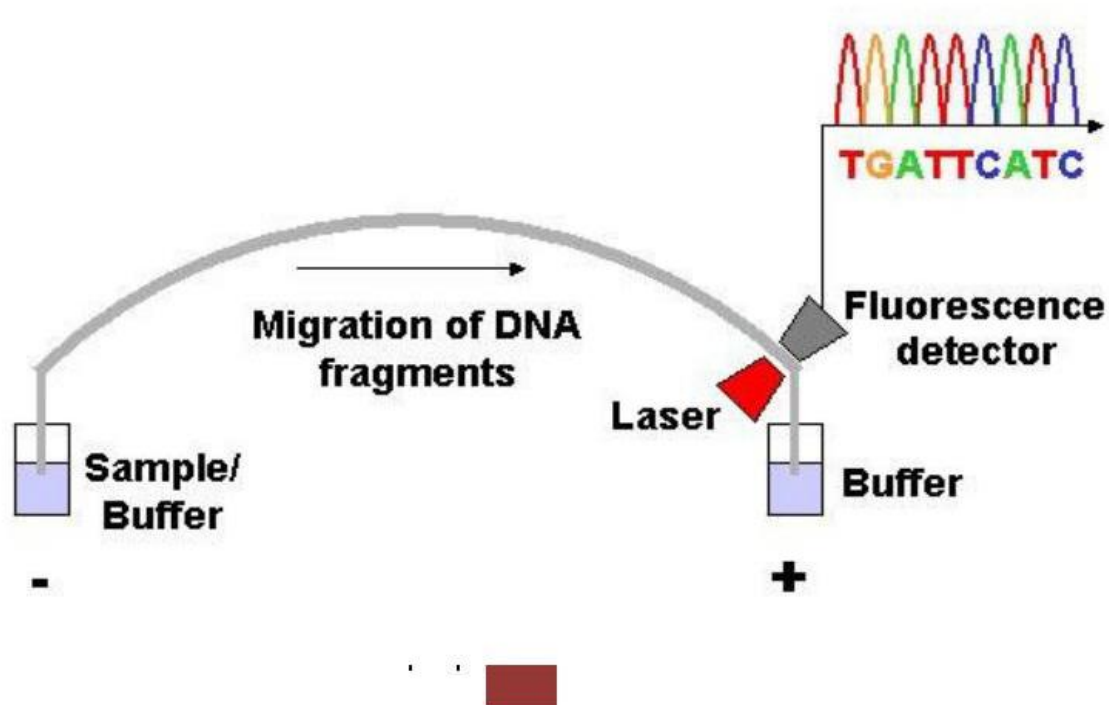
Метод терминирующих аналогов трифосфатов.

Метод обрыва цепи



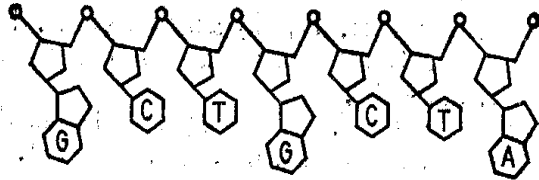
Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 5463

# Принцип работы автоматического секвенатора

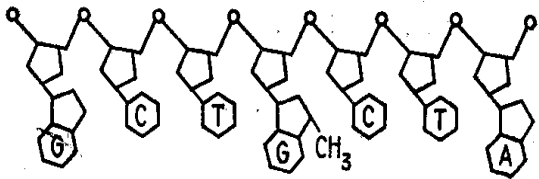


# Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту: метод химической дегградации

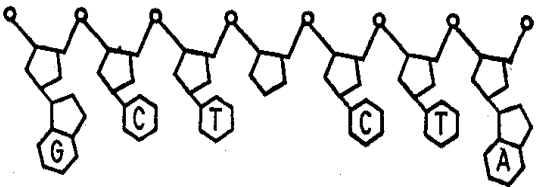
Фрагмент ДНК



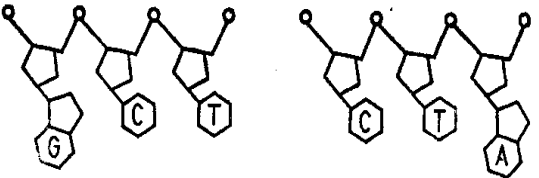
Модификация азотистого основания



Отщепление или замещение модифицированного основания



Разрыв сахаро-фосфатной цепи ДНК



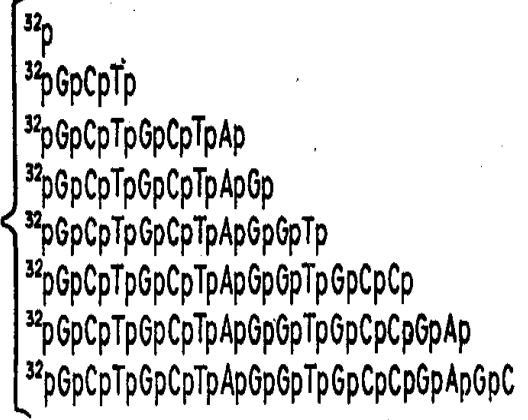
## ШАГ1

Модификация звеньев

ДНК с 5'-концевой <sup>32</sup>P меткой 5' <sup>32</sup>P Gp Cp Tp Gp Cp Tp Ap Gp Gp Tp Gp Cp Cp Gp Ap Gp C 3'

Положение гуаниловых звеньев G G G G G G

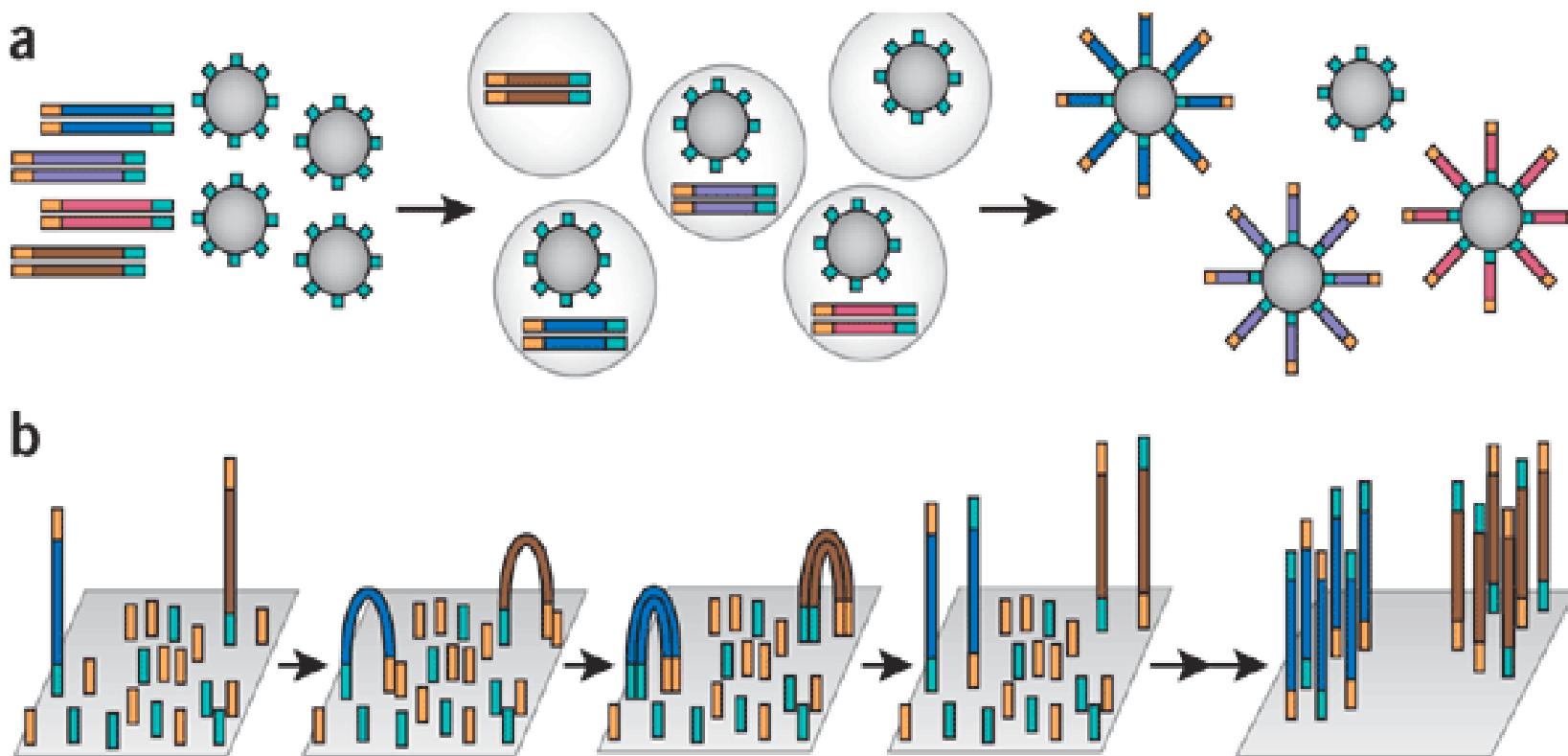
Продукты химической дегградации



## ШАГ2

Химическая дегградация

# NGS-секвенирование



Выращивание колоний ДНК посредством ПЦР

A) в эмульсии (для пиросеквенирования, SOLiD);

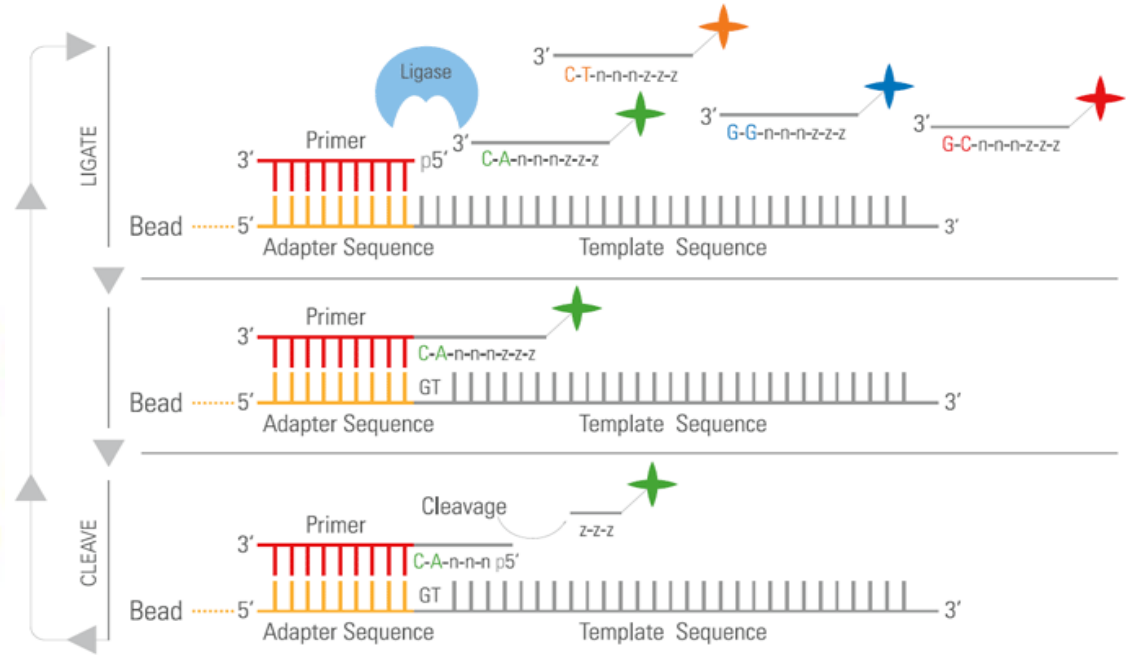
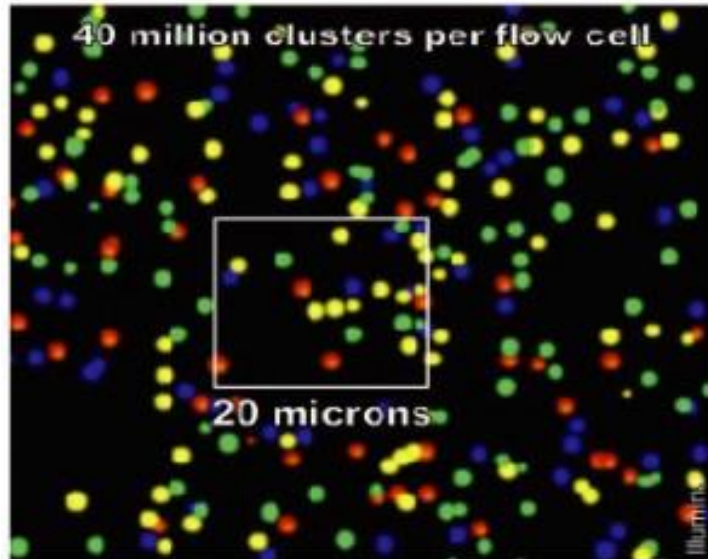
B) на стекле (bridge PCR, для Illumina)

[http://oftalmic.ru/technology\\_ngs.php](http://oftalmic.ru/technology_ngs.php)

# Illumina

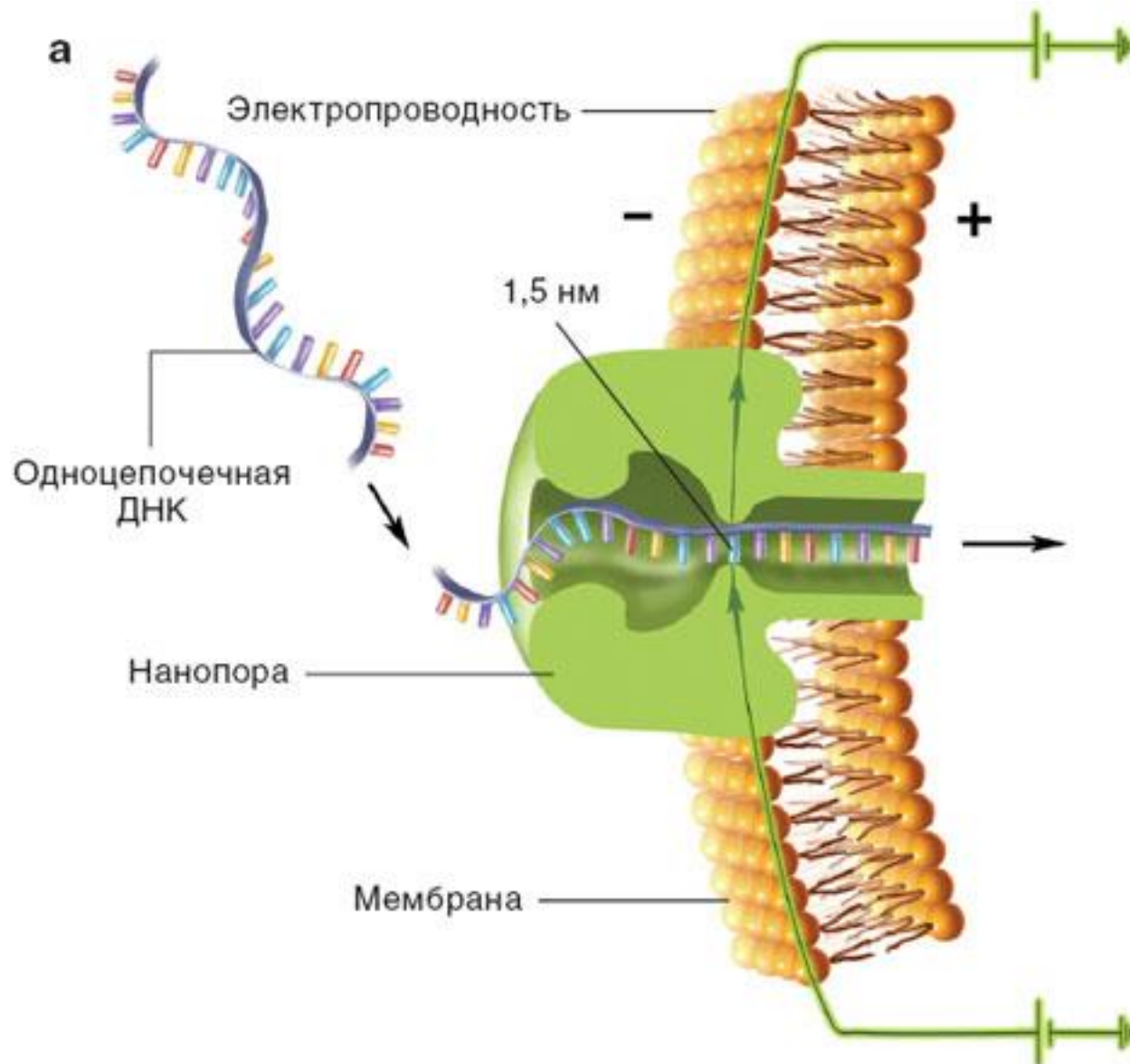
vs

# SOLiD



Компания **Illumina, Inc.** ([NASDAQ: ILMN](https://www.nasdaq.com/markets/stocks/quotes/ILMN)), основана в апреле [1998 года](#), занимается разработкой, производством и внедрением систем анализа генетического разнообразия и биологических функций. Illumina производит линейку продуктов и услуг для [секвенирования](#), [генотипирования](#) и изучения [экспрессии генов](#). Клиенты Illumina — центры изучения [геномов](#), фармацевтические компании, университетские центры, организации, осуществляющие клинические исследования, а также биотехнологические компании. Illumina производит инструменты, которые позволяют исследователям осуществлять генетические исследования, необходимые для [медицины](#), геномики и [протеомики](#).

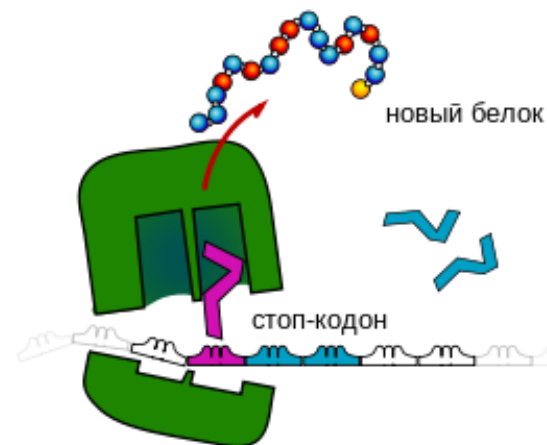
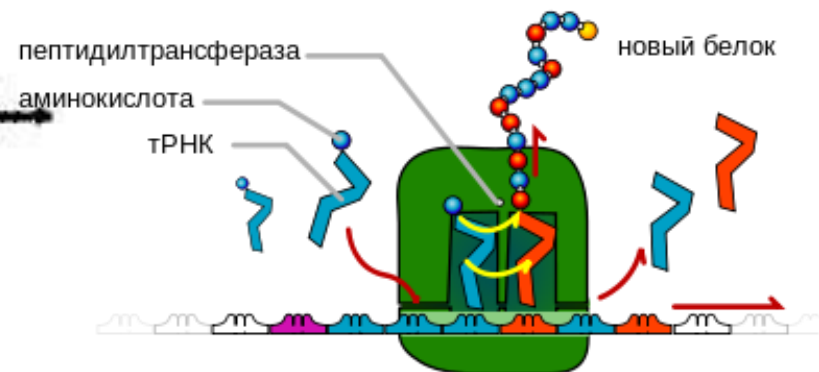
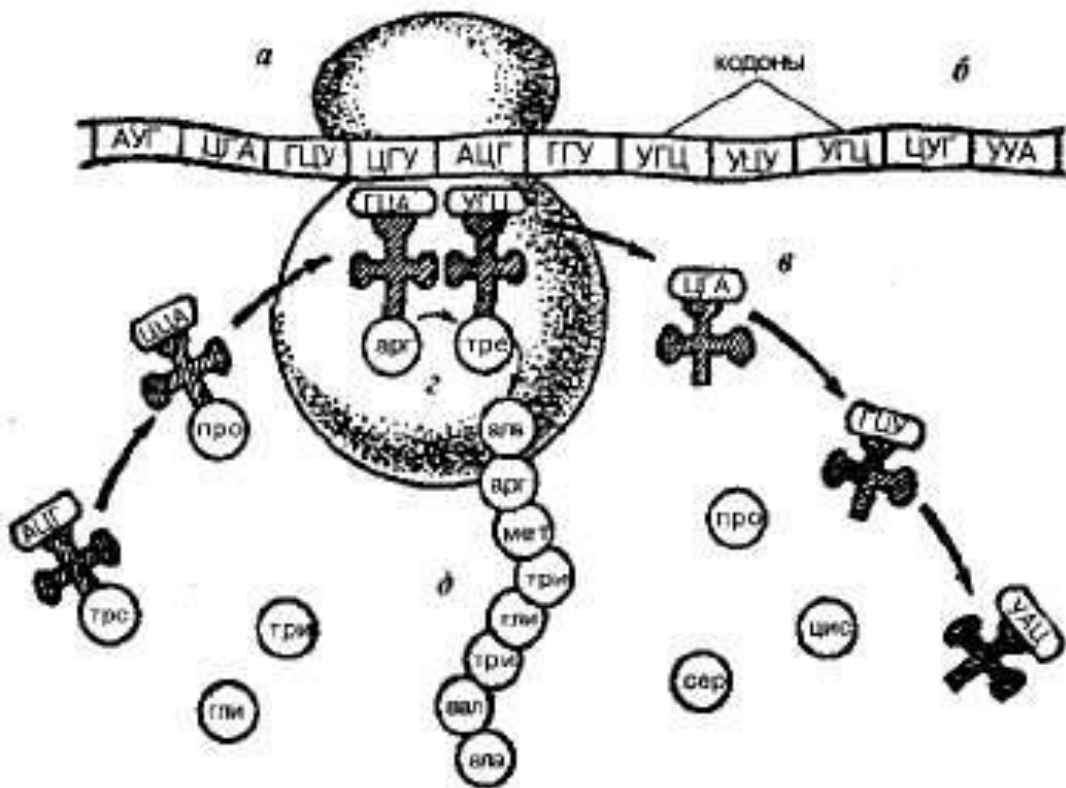
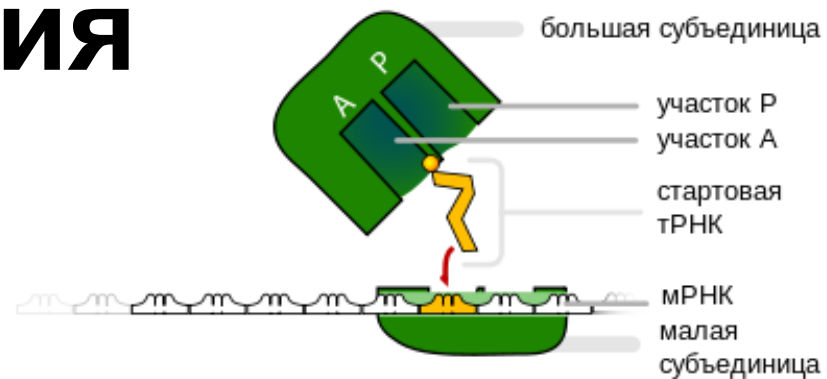
# Секвенирование четвертого поколения





**Практическая работа №6**  
**Трансляция. Генетический**  
**код. Рамка считывания.**  
**Решение задач.**

# Трансляция



# Генетический код

1. Триплетность
2. Неперекрываемость
3. Однозначность
4. Вырожденность
5. Знаки пунктуации: UAG UAA UGA
6. Универсальность
7. Компактность, непрерывность
8. Точка старта: AUG (ATG)
9. Однонаправленность (в пределах гена)

# Генетический код

		ВТОРАЯ БУКВА					
		U	C	A	G		
ПЕРВАЯ БУКВА	U	UUU } Фенил-аланин F UUC } UUA } Лейцин L UUG }	UCU } UCC } Серин S UCA } UCG }	UAU } Тирозин Y UAC } UAA } Стоп-кодон UAG } Стоп-кодон	UGU } Цистеин C UGC } UGA } Стоп-кодон UGG } Триптофан W	ТРЕТЬЯ БУКВА	U
	C	CUU } Лейцин L CUC } CUA } CUG }	CCU } CCC } Пролин P CCA } CCG }	CAU } Гистидин H CAC } CAA } Глутамин Q CAG }	CGU } CGC } Аргинин R CGA } CGG }		C
	A	AUU } Изолейцин I AUC } AUA } AUG } Метионин M старт-кодон	ACU } ACC } Треонин T ACA } ACG }	AAU } Аспарагин N AAC } AAA } Лизин K AAG }	AGU } Серин S AGC } AGA } Аргинин R AGG }		A
	G	GUU } Валин V GUC } GUA } GUG }	GCU } GCC } Аланин A GCA } GCG }	GAU } Аспарагиновая кислота D GAC } GAA } Глутаминовая кислота E GAG }	GGU } GGC } Глицин G GGA } GGG }		G

\*GUG – м.б. старт-кодоном в начале, кодирует не валин, а метионин

# Рамка считывания

5' gagttttatcgcttccatgacgcagaagtt

---

5' gagttttatcgcttccatgacgcagaagtt  
E F Y R F H D A E V

---

5' gagttttatcgcttccatgacgcagaagtt  
S F I A S M T Q K

---

5' gagttttatcgcttccatgacgcagaagtt  
V L S L P \* R R S

---

ctcaaaatagcgaagggtactgcatcttcaa5'  
H K I A E M V Y F N

---

ctcaaaatagcgaagggtactgcatcttcaa5'  
T K D S G H R L L

---

ctcaaaatagcgaagggtactgcatcttcaa5'  
N \* R K G S T S T

---

# Частота встречаемости кодонов для различных организмов

Аминокислота	Кодон	Организм						
		HUM	MUS	DRO	ATH	YSC	PICH	ECO
Arg	CGA	6.2	6.6	8.5	6.3	3.0	4.4	4.1
	CGC	10.6	9.5	18.1	3.8	2.6	2.2	18.3
	CGG	11.5	10.4	8.2	4.9	1.8	2.0	6.5
	CGU	4.6	4.7	8.8	9.0	6.4	6.8	18.8
	AGA	11.9	11.6	5.2	18.9	21.3	20.2	4.5
	AGG	11.9	11.9	6.3	10.9	9.3	6.6	2.6
Leu	CUA	7.1	7.9	8.2	9.9	13.4	10.9	4.5
	CUC	19.7	20.2	13.8	16.1	5.4	7.5	10.1
	CUG	39.9	39.9	38.3	9.8	10.5	15.1	45.8
	CUU	13.1	13.2	8.9	24.1	12.3	15.7	12.6
	UUA	7.6	6.5	4.4	12.7	26.2	15.6	15.0
	UUG	12.8	13.3	16.1	20.9	27.1	31.2	12.9
Ser	UCA	12.2	11.6	7.8	18.2	18.7	15.4	10.0
	UCC	17.7	18.0	19.5	11.2	14.2	16.2	9.3
	UCG	4.5	4.3	16.7	9.3	8.6	7.1	8.5
	UCU	15.1	16.0	7.0	25.1	23.4	23.9	11.0
	AGC	19.4	19.6	20.5	11.3	9.7	7.7	15.0
	AGU	12.1	12.5	11.5	14.0	14.2	12.8	10.8
Thr	ACA	15.0	15.8	11.1	15.7	17.8	13.7	10.8
	ACC	19.0	19.1	21.3	10.3	12.6	14.3	21.3
	ACG	6.1	5.8	14.5	7.7	8.0	6.0	13.8
	ACU	13.0	13.6	9.5	17.6	20.2	22.3	11.0

# Преобразование белковой последовательности в нуклеотидную для разных организмов

Аминокислота	нуклеотид	Организм						
		HUM	MUS	DRO	ATH	YSC	PICH	ECO
Arg	1	C <sup>58</sup> A <sup>42</sup>	C <sup>57</sup> A <sup>43</sup>	C <sup>79</sup> A <sup>21</sup>	A <sup>55</sup> C <sup>45</sup>	A <sup>69</sup> C <sup>31</sup>	A <sup>64</sup> C <sup>36</sup>	C <sup>87</sup> A <sup>13</sup>
	2	G						
	3	G <sup>41</sup> A <sup>32</sup> C <sup>19</sup> U	G <sup>41</sup> A <sup>33</sup> C <sup>17</sup> U	C <sup>33</sup> G <sup>26</sup> A <sup>25</sup> U	A <sup>47</sup> G <sup>29</sup> U <sup>17</sup> C	A <sup>55</sup> G <sup>25</sup> U <sup>14</sup> C	A <sup>58</sup> G <sup>20</sup> U <sup>16</sup> C	U <sup>34</sup> C <sup>33</sup> G <sup>17</sup> A
		8	9	16	7	6	5	16
Leu	1	C <sup>80</sup> U <sup>20</sup>	C <sup>80</sup> U <sup>20</sup>	C <sup>77</sup> U <sup>23</sup>	C <sup>64</sup> U <sup>36</sup>	U <sup>56</sup> C <sup>44</sup>	C <sup>51</sup> U <sup>49</sup>	C <sup>72</sup> U <sup>28</sup>
	2	U						
	3	G <sup>53</sup> C <sup>20</sup> A <sup>15</sup> U	G <sup>53</sup> C <sup>20</sup> A <sup>14</sup> U	G <sup>61</sup> C <sup>15</sup> A <sup>14</sup> U	G <sup>33</sup> U <sup>26</sup> A <sup>24</sup> C	A <sup>42</sup> G <sup>40</sup> U <sup>13</sup> C	G <sup>48</sup> A <sup>28</sup> U <sup>16</sup> C	G <sup>58</sup> A <sup>19</sup> U <sup>12</sup> C
		13	13	10	17	6	8	10
Ser	1	U <sup>61</sup> A <sup>39</sup>	U <sup>61</sup> A <sup>39</sup>	U <sup>61</sup> A <sup>39</sup>	U <sup>72</sup> A <sup>28</sup>	U <sup>73</sup> A <sup>27</sup>	U <sup>75</sup> A <sup>25</sup>	U <sup>60</sup> A <sup>40</sup>
	2	C <sup>61</sup> G <sup>39</sup>	C <sup>61</sup> G <sup>39</sup>	C <sup>61</sup> G <sup>39</sup>	C <sup>72</sup> G <sup>28</sup>	C <sup>73</sup> G <sup>27</sup>	C <sup>75</sup> G <sup>25</sup>	C <sup>60</sup> G <sup>40</sup>
	3	C <sup>46</sup> U <sup>34</sup> A <sup>15</sup> G	C <sup>46</sup> U <sup>35</sup> A <sup>14</sup> G	C <sup>48</sup> U <sup>22</sup> G <sup>20</sup> A	U <sup>44</sup> C <sup>25</sup> A <sup>20</sup> G	U <sup>42</sup> C <sup>27</sup> A <sup>21</sup> G	U <sup>44</sup> C <sup>29</sup> A <sup>19</sup> G	C <sup>38</sup> U <sup>34</sup> A <sup>15</sup> G
		6	5	9	10	10	9	13

В индексах указаны вероятности присутствия данного нуклеотида в процентах.

# Решение задач

- [http://molbiol.ru/scripts/01\\_13.html](http://molbiol.ru/scripts/01_13.html)
- [http://molbiol.ru/scripts/01\\_19.html](http://molbiol.ru/scripts/01_19.html)



# Зачетная работа

1. Сравните кривые роста микроорганизмов при получении первичных и вторичных метаболитов в биотехнологическом производстве.
2. Для эффективного проведения биотехнологического процесса большое значение имеет питательная среда, в которой микроорганизмы-продуценты БАВ используют в качестве источника азота различные азотсодержащие соединения, содержащие аминный азот или ионы аммония. Какие условия проведения ферментации по источнику азота при получении антибиотиков будут являться оптимальными?
3. В биотехнологическом производстве лекарственных средств большое значение имеет питательная среда. Предложите оптимальную питательную среду в биосинтезе антибиотиков.
4. Суперпродуцент – это биообъект промышленного использования. • Как можно получить его и какими свойствами он должен обладать в отличие от природного штамма культуры?
5. Проведите сравнительную характеристику каллусных и суспензионных культур при использовании их в качестве субстрата для получения БАВ биотехнологическими методами.

6. В процессе ферментации растительных клеток для увеличения выхода целевого продукта (например, шиконина) было предложено значительно увеличить температуру до 37°C, объем ферментера (более 2000 л), использовать трехлопастную мешалку, увеличить подачу кислорода и повысить влажность среды с 50% до 60-70%. Определите, какие ошибки были допущены при выборе условий ферментации?

Организация любого биотехнологического производства ЛС предполагает подготовительный и основной этапы работы. Какие виды работ необходимо провести в данном случае?

7. При производстве пенициллина в начале ферментации было добавлено в питательную среду определенное количество фенилуксусной кислоты, что привело к снижению выхода целевого продукта. Какая ошибка была допущена в данном процессе?

8. В условиях биотехнологического производства какие витамины группы В могут быть получены с использованием микробиологического синтеза?

9. При получении БАВ рост каллусной ткани в процессе ферментации осуществляется в несколько этапов. В какой фазе необходимо стимулировать активность клеток?

9. Для оптимизации процесса биосинтеза пенициллина в питательную среду добавляют аминокислоты. Как это может отразиться на количественном выходе целевого продукта, если добавить лизин в значительных концентрациях?

10. Производство витамина В12 относится к чисто биотехнологическому способу его получения, когда в качестве продуцента данного витамина используются пропионовые бактерии. Предложите оптимальный метод ферментации и условий ее проведения.