

КОНСПЕКТ

за провеждане на изпит за докторантура по професионално направление **4.3 Биологични науки (Генетика – Техники за молекулно клониране и генно инженерство)**

ОБЩА ЧАСТ

1. Хибридологичен анализ – определение, условия за провеждане и основни термини и понятия. Моногенно унаследяване – експерименти на Грегор Мендел, монохбридни кръстоски и анализиращи кръстоски. Примери за моногенни белези и болести при човек. Клетъчни механизми, стоящи в основата на моногенното унаследяване. Молекулярни основи на моногенното унаследяване – същност на алелите на молекулно ниво, фенотип и генотип от молекулярна гледна точка и алели на молекулно ниво. Доминантност и рецесивност на молекулно ниво.
2. Пол. Определение. Типове определяне на пола. Определяне на пола с помощта на полови хромозоми. Определяне на пола при растения. Унаследяване, скачено с пола. Хромозомна теория за наследствеността. Експерименти на Томас Морган. Експерименти на Калвин Бриджес. Балансова хипотеза за определянето на пола при *D. melanogaster*. Унаследяване, скачено с пола при човек. Структура и гени, разположени на половите хромозоми при човек. Унаследяване, скачено с пола при човек. X и Y-хромозоми при човек – еволюция, структура и гени.
3. Независимо унаследяване – същност, ди- и полихбридни кръстоски. Приложения на независимото унаследяване. Статистическа обработка на резултатите от генетичен анализ с помощта на метода χ^2 . Създаване на чисти линии животни и сортове растения. Хибридна мощ. Хромозомни основи на независимото унаследяване. Дихибридни кръстоски, при които единият от белезите е скачен с пола. Полигенно унаследяване. Количествени признаци. Полигени (QTLs). Механизми на унаследяване на полигените.
4. Генетична рекомбинация – същност, мейотична рекомбинация, типове гамети и поколения, честота на рекомбинацията. Генетични карти. Определяне на групи на скаченост. Кросинговър. Картиране на гени на основата на честотата на рекомбинацията. Рекомбинационен анализ на молекулни маркери. Тетраден анализ.
5. Въведение в генетичния анализ при бактериите. Същност и предимства. Работа с микроорганизми. Конюгация. Същност. F-фактор. Hfr-щамове. Картиране на гени на основата на конюгацията. F'-плазмиди. Трансформация. Същност. Компетентност. Картиране на гени на основата на трансформацията.
6. Генетичен анализ при бактериофаги. Бактериофаги. Особености на генетичния анализ при бактериофаги. Експерименти на Хърши с фага T2. Експерименти на Бензер с rII-мутациите при бактериофага T4. Трансдукция. Същност и откриване. Вирулентни и умерени фаги. Видове трансдукция – механизми и приложение в генетичния анализ.
7. Функция на гените. Основни положения. Особености при експресията на гените. Типове гени. Видове алели. Пенетрантност и експресивност. Подходи за изследване на взаимодействието на гените. Вътрелокусни взаимодействия - Определение. Видове, примери и разпадания. Плейотропия. Междuloкусни взаимодействия - Определение. Видове, примери и разпадания. Изследване на взаимодействията на гените на молекулно ниво. Основни положения. Комплементационен тест. Обяснение на някои видове разпадания – 9:3:3:1, 9:7, 9:3:4 и 12:3:1. Супресорни мутации. Синтетични летали.

8. ДНК като носител на наследствената информация. Структура на ДНК. Доказване на полуконсервативния механизъм на репликацията на ДНК. Общ принцип на репликацията на ДНК при *E. coli*. Особенности на репликацията на ДНК при еукариоти. Различия с прокариоти. Особенности при дрожди. Особенности при висши еукариоти. Репликацията на краищата на еукариотните хромозоми. Проблеми с репликацията на линейни хромозоми. Теломери и техният синтез. Защита на краищата на еукариотните хромозоми с по-мощта на белтъци. Генетични заболявания, дължащи се на нарушена структура на теломерите и неправилна експресия на теломераза.

9. Свойства на РНК. Класове РНК молекули и техните функции. Общи принципи на синтеза на РНК. Механизъм на транскрипцията при прокариоти (*E. coli*) – инициация, елонгация и терминация. Инициацията на транскрипцията при еукариоти. Елонгация, терминация и зреене на РНК при еукариоти. Редактиране на РНК.

10. Молекулярен механизъм на транслацията при про- и еукариоти. Основни положения в регулацията на генната експресия. Нива на регулация. Видове генна експресия. Оперони. Механизми на контрол над генната експресия при бактерии. Основни механизми, регулиращи транскрипцията при бактериите. Клетъчни механизми. Типове контрол с помощта на регулаторни белтъци и ефекторни молекули. Примери за регулация на моделни оперони.

11. Откриване на подвижните генетични елементи. Експерименти на Барбара Макклинтък. . Подвижни генетични елементи при прокариоти. Подвижни генетични елементи при еукариоти. Динамика на геномите, дължаща се на подвижни генетични елементи.

12. Изменчивост на организмите – класификация на видовете изменчивост. Обща характеристика и класификация на мутациите. Генни мутации. Хромозомни мутации (Геномни мутации (плоидии). (аберации). Отклонения от разпаданията при хромозомни и геномни мутации. Модификационна изменчивост.

13. Трансформация. Трансформация на *E. coli*. Първи опити. Схема за получаване на компетентни клетки с CaCl_2 и трансформация. Електропорация. Трансформация на Грам-положителни бактерии (*Bacillus subtilis* и актиномицети). Особенности на трансформацията (трансфекцията) на еукариотни клетки

14. Полимеразна верижна реакция. Принцип на основната реакция. LA-PCR. Hot start PCR. Други варианти на PCR - Мултиплексна ПВР, спрегната ПВР (Nested PCR), Обратна ПВР (Inverse PCR), In situ ПВР, Асиметрична ПВР, ПВР в емулсия, Метилационно специфична ПВР, Изотермална ПВР - LAMP (loop-mediated isothermal amplification) с Bst поли-мераза от *Bacillus stearothermophilus*, Амплифициране in vitro на цели геноми – MDA метод (multiple displacement amplification)

15. Съединяване на ДНК молекули. Видове ДНК лигази, които се използват рутинно. Механизъм на реакцията на лигиране. Оптимизиране на условията на лигазната реакция - По отношение на съвместимостта на краищата – тъпи и лепливи. Концентрация на ДНК. Температура на реакцията. Използване на добавки. Двойни рестрикции

16. Модифициране на краищата преди лигиране. Дефосфорилиране. „Подкастриране“ и запълване на едноверижните участъци. Модифициране посредством линкери и адаптори. Закачане на хомополимерни опашки

17. Клониране на PCR фрагменти. Невъзможност за директно клониране на PCR фрагменти. Получаване на тимидинирани вектори. Включване на мишенни последователности в праймерите за PCR

18. Плазмиди. Биология на плазмидите. Определение за плазмид. Структура на плазмидите. Брой на копията в клетка. Характеристики придавани на гостоприемника от природните плазмиди. Класификация на плазмидите. Репликация на плазмидите. Организация на генома на плазмидите. Особености на репликация на плазмидите. Репликация на плазмиди с тесен кръг гостоприемници – ColE1. Репликация на плазмиди с широк кръг гостоприемници – pSC101. Фактори, регулиращи стабилното унаследяване. Плазмидни вектори. Желани качества на плазмидните вектори. Номенклатура. Примери за често използвани плазмидни вектори за клониране на фрагменти. pBR322. pUC – семейство. Често използвани маркери за селекция. Класификация на плазмидите вектори

19. Бактериофагът λ . Опити на André Lwoff и отк-риване на лизогенията. Биологичен цикъл. Организация на генома на бактериофага λ . Взимане на решение за лизогенен или литичен път на развитие. Вектори, базирани на бактериофага λ - Предимства и недостатъци на фаговите вектори, Типове вектори, базирани на бактериофага λ : λ -инсерционни вектори λ -вектори чрез заместване, космидни вектори. Пакетиране *in vitro*.

20. Бактериофагът M13. Строеж на фаговата частица. Организация на генома. Репликативен цикъл. Вектори, базирани на бактериофага M13. M13 „инсерционни“ вектори. Фейджмидни вектори. Фазмидни вектори - λ ZAP

21. Мегавектори. Необходимост от вектори с голям капацитет. Изкуствени дрождеви хромозоми – YAC - Приложение и капацитет, Механизъм за клониране в YAC-вектор, Недостатъци. P1-базирани изкуствени хромозоми - Бактериофагът P1, PAC-вектори – схема за клониране, Предимства. Изкуствени бактериални хромозоми – Същност, Примери за PAC вектори и класическа схема за клониране

22. Експресионни вектори. Роля на промоторите за хетероложната експресия. σ 70-промоторите. Структура. Фактори, които влияят на силата на промотора. Терминатори на транскрипцията. Конструирани на изкуствени промотори за хетероложна експресия. Структура на експресионните вектори. Видове експресионни вектори. Използване на фагови промотори.

23. Секвениране на ДНК. Първи опити. Метод на Maxam и Gilbert. Принцип на chain terminator метод на Sanger. Оригинален метод. Подобрения на оригиналния метод. Методи за автоматично секвениране, базирано на Sanger. Общи принцип на автоматичните секвенатори. “Four dyes system” на Applied Biosystems. ALF система на Pharmacia – маркиран праймер, 4 реакции. LI-COR two dye near infrared система – едновременно секвениране и на двете вериги. Автоматични секвенатори базирани на капиларна електрофореза. Basecaling.

24. Работа с библиотеки. Традиционни стратегии при клонирането на гени. Определение за библиотека. Типове библиотеки. Геномни библиотеки. Структура и размер на геномите. Начини за получаване на ДНК фрагменти за геномни библиотеки. Изчисляване на представителността на библиотеката. Вектори, използвани при геномните библиотеки. Случайни, “arrayed” и подредени библиотеки. λ ДНК библиотеки. Съображения за използване-то им. Еукариотна иРНК. Получаване на иРНК за генни библиотеки. Получаване на λ ДНК. Насочено клониране. Получаване на библиотеки, базирани на ПВР. Същност и предимства. Схема за получаване на намножена библиотека. Tth-полимераза. Субтрактивни библиотеки.

25. Отбор на клонове. Проблеми и подходи при отбора. Директно селектиране. Идентифициране на клон в рамките на библиотека с помощта на хибридизация на нуклеинови киселини. Принцип на хибридизацията. Хибридизация на колонии и плаки. Избор на сонда. Синтез и използване на

олигонуклеотидни сонди. Използване на хетероложни сонди. Рескрининг. Имуноскрининг. Същност. Получаване на антитела. Стъпки. Приложимост.

СПЕЦИАЛИЗИРАНА ЧАСТ

26. Количествена ПВР (quantitative PCR, qPCR или Real-Time PCR). Предпоставки. Класически вариант. Принцип на количественото определяне и основни понятия. qPCR системата TaqMan™. qPCR с молекулни маяци. qPCR със скорпионови сонди. RT-qPCR. Принцип на апаратурата за qPCR. RT-PCR. Видове обратни транскриптази. Варианти за праймери – random, oligo-dT и 3'-ген-специфични. Класически вариант на обратна транс-крипция. Съвременни схеми за RT-PCR. Едноен-зимни системи, базирани на Tth и Tfl полимерази.

27. Срязване и съединяване на ДНК молекули. Методи за неспецифично накъсване. Откриване на СРМ. Системи за рестрикция и модификация. Характеризиране на СРМ от Arber и Dussoix 1962. Опити с щамове E. coli K и C. Рестрикционни ендонуклеази. Класификация на СРМ. Рестриктази, използвани в ГИ. Наименования. Механизъм на срязването. Типове краища, които се образуват. Шизомерни ензими. Рестриктази даващи съвместими краища. Star activity – високо рН и/или ниска йонна сила. Фактори, влияещи върху честотата на рестрикция. Проверка на качеството на рестриктазите за наличие на екзонуклеази

28. Системи за клониране базирани на мястоспецифична рекомбинация. Мястоспецифични рекомбинази. Роля на мястоспецифичните рекомбинази. Продукти, получени в резултат на мястоспецифична рекомбинация. Примери за мястоспецифични рекомбинази. Приложение на мястоспецифичните рекомбинази за клониране без рестриктази и лигази. Методи за клониране, основаващи се на топоизомерази. Топоизомераза от Vaccinia. TA клониране на PCR-фрагменти с помощта на топоизомераза от Vaccinia

29. Алтернативни начини за клониране при ВАС и РАС векторите. Необходимост от прилагане на рекомбинационно инженерство in vivo. Принцип на рекомбинационното инженерство. Схема на рекомбинационно инженерство in vivo с използването на фагови рекомбинази

30. Вектори, използвани за синтеза на РНК. Принцип на синтеза in vitro на РНК-молекули. Удобства на фаговите промотори. Примери- rLITMUS и rGEM. Приложения на in vitro синтеза на РНК

31. Вектори, използвани за синтез на белтъци. Фактори, влияещи върху нивата на хетероложна експресия на белтък - Фактори, влияещи върху нивата на транскрипция и Фактори, влияещи върху нивата на трансляция. Протеолитични системи на клетка-та. Токсичност на самия хетероложно експресиран белтък.

32. Индуцируеми системи за хетероложна експресия на белтъци. Необходимост от индуцируемост на хетероложната експресия. Примери за индуцируеми системи: Експресионната система рЕТ-DE3, сI857 – промотори, Система, базирана на промотора на триптофановия оперон под контрола на сI, Системата рBAD

33. Други методи за секвениране. Пиросеквениране. Секвениране чрез microarray хибридизация. Приложения. Новогенерационно секвениране. Същност. Платформи за NGS - Illumina (Solexa) NGS, Roche 454, Ion torrent, SOLiD, Сравнение на отделните платформи.

34. Приложения на секвенирането. Основни приложения. Секвениране на гени. Секвениране на цели геноми. Подходът „случаен изстрел“. Секвениране на геноми посредством предварително сглобяване на контиги.

35. Мутагенеза. Необходимост от изучаване на биологичните механизми посредством мутанти. Методи за неспецифична мутагенеза. Място-специфична мутагенеза. Място-специфична мутагенеза посредством метода на удължаване на праймера. Класически вариант – single primer method – Принцип, Варианти, Неудобства и недостатъци. Място-специфична мутагенеза посредством удължаване на праймера чрез използване на няколко праймера. Касетна мутагенеза - Общ принцип, особености, Касетна мутагенеза с изродени бази

36. Методи за място-специфична мутагенеза, бази-рани на PCR. Метод на Higuchi. Метод на Sarkar и Sommer (1990). PCR методи за MCM на фрагменти носени от плазмид. Методи за случайно въвеждане на мутации посредством PCR

37. Молекулно клониране при дрожди. Дрождите като моделен. Първи опити с *Saccharomyces cerevisiae*. Изследвания след секвенирането на генома на *Saccharomyces cerevisiae*. Трансформация на дрожди. Общи особености на трансформацията на дрожди и гъби. Липса на естествена компетентност. Индуциране на компетентност. Включване на чуждата ДНК посредством конюгация. Съдба на включената чужда ДНК

38. Репликативни вектори при дрожди. Условия, на които трябва да отговарят дрождевите вектори. 2 μ -плазмид. Вектори, създадени на базата на 2 μ м плазмиди: YEps – yeast episomal plasmids, YRps – yeast replicating plasmids, YCps – yeast centromere plasmids. Изкуствени дрождеви хромозоми. Структура на YAC-хромозомите. Принцип на клонирането в YAC вектор. Създаване на кръгови YAC. TAR – transformation associated recombination. Роля на рекомбинационното инженерство за клонирането в YAC

39. Трансфекция на животински клетки. Приложения на трансфекцията на животински клетки. Стратегии за включване на ДНК в животински клетки. Методи за химическа трансфекция-Калциево-фосфатен метод, Трансфекция с помощта на полиплекси, Трансфекция с помощта на липозоми и липоплекси. Физични методи за трансфекция – Електропорация, Ултразвукова трансфекция, Пряк пренос, Биолистика при животински клетки. Съдба на ДНК след навлизането ѝ в клетката

40. Маркери за селекция при животински клетки. Ендогенни маркери за селекция – принцип и принцип на селекцията на NAT. Примери за някои от най-често използваните ендогенни маркери. Доминантни маркери. Амплификационни маркери

41. Получаване на трансгенни животни. Принципна схема. Пронуклеарно микроинжектиране при мишки. Инфектиране на миши ембриони с ретровируси. Трансфекция на ембрионални стволови клетки. Насочена трансгенеза (gene targeting). Същност. Вектори. Механизми на интегриране. Селекция. Механизми за въвеждане на фини мутации (subtle mutations). Приложения на насочената трансгенеза. Трудности при животни и птици. Клонирание на животни чрез ядрен пренос. Трансформация на овоцити от *Xenopus*. Генен пренос при риби. Трансгенеза при *Drosophila* с помощта на P-елементи.

42. Генно инженерство при растения. Въведение. Системи за трансформиране на растения, базирани на *Agrobacterium tumefaciens*. Вектори, базирани на плазмидите при *Agrobacterium*. Стратегии за превъзможване на недостатъците на Ti – плазида. Маркери за селекция. Фактори, влияещи върху експресията на трнсгена. Отбор. Принципно подходи при трансформацията. Обезоръжаване на Ti- век-тора. Векторът pBIN19. Недостатъци на системите базирани на

плазмиди при *Agrobacterium*. Трансформация посредством пряк генен пренос при растения. Директен трансфер в ядрото. Трансфер на трансгена в хлоропласти. Вирусни вектори: Caulimovirus-базирани вектори, Geminivirus, Растителни РНК-ови вируси

43. Търговски приложения на растителната транс-генеца. Късно зреене (намалена полигалактуроназа при домати с помощта на антисенс РНК). Устойчивост към насекоми. Устойчивост към хербициди. Устойчивост към вируси. Устойчивост към плесен. "Terminator technology"

ПРЕПОРЪЧИТЕЛНА ЛИТЕРАТУРА:

1. **Griffiths et al.**, "An Introduction to Genetic Analysis", 10th edition. *W. H. Freeman and Company*, 2012
2. **Griffiths et al.**, "An Introduction to Genetic Analysis", 11th edition. *W. H. Freeman and Company*, 2015
3. **Klug et al.**, "Concepts of Genetics", 10th edition, *Pearson*, 2012
4. **Snustad and Simmons**, "Principles of Genetics", 6th edition, *John Wiley & Sons, Inc.*, 2012
5. **Primrose, S.B. and Twyman, R.M.**. "Principles of Gene Manipulation and Genomics." 7th Ed. 2006. *Blackwell Publishing*
6. **Brown, T. A.** "Gene Cloning and DNA Analysis. An Introduction." 5th/6th Ed. 2006/2011. *Blackwell Publishing*
7. **Dale, J.W. and Schantz, M.** "From Genes to Genomes. Concepts and Applications of DNA Technology." 2002. *John Wiley & Sons*
8. **Reece, R.J.** "Analysis of Genes and Genomes." 2004. *John Wiley & Sons*

София, м. декември 2022 г.

Изготвил:

/доц. д-р Светослав Димов/