

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИБ КарНЦ РАН)



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБ КарНЦ РАН
член-корр. РАН

Н.Н. Немова Н.Н. Немова

«18» сентября 2014 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

«Методы молекулярно-генетических исследований»

для обучающихся по Основной образовательной программе высшего образования –

программе подготовки кадров высшей квалификации по направлению

06.06.01 Биологические науки, направленность:

«Биохимия»

Физиология и биохимия растений»

«Физиология»

«Экология»

«Зоология»

Принято Ученым советом ИБ КарНЦ РАН 18.09.2014 г. протокол № 5.

Рабочая программа по дисциплине «Методы молекулярно-генетических исследований» разработана в соответствии с требованиями федерального государственного образовательного стандарта, утвержденного Приказом Минобрнауки РФ от 30 июля 2014 г. № 871 «Об утверждении федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки (уровень подготовки кадров высшей квалификации)». Принята на Ученом совете ИБ КарНЦ РАН 18.09.2014 г. протокол № 5.

Разработчики программы:

Директор ИБ КарНЦ РАН,
главный научный сотрудник
лаборатории экологической
биохимии ИБ КарНЦ РАН
чл.-корр. РАН, профессор, д.б.н.


Н.Н. Немова

Заместитель директора по научной
работе ИБ КарНЦ РАН, старший
научный сотрудник лаборатории
генетики ИБ КарНЦ РАН, доцент,
к.б.н.


О.Н. Лебедева

Ведущий научный сотрудник
лаборатории генетики ИБ КарНЦ РАН,
к.б.н.


Л.В.Топчиева

Заместитель директора по научной
работе ИБ КарНЦ РАН,
руководитель Отдела аспирантуры,
ведущий научный сотрудник
лаборатории экологической биохимии
ИБ КарНЦ РАН, к.б.н.


О.В. Мещерякова

Пояснительная записка

Молекулярная биология опирается на содружество нескольких наук — биологии, физики, химии и генетики. Предметом молекулярно-биологических исследований являются такие важнейшие жизненные процессы как рост, развитие, наследственность и изменчивость. Ключевое значение во всех этих процессах имеют молекулы белков и нуклеиновых кислот. Современную молекулярную биологию и биохимию трудно разграничить друг от друга и от остальных наук, попадающих под определение «физико-химическая биология».

1. Цель освоения дисциплины

Цель освоения дисциплины – ознакомление аспирантов с современными методами молекулярно-генетических исследований и областями их применения.

2. Место дисциплины в структуре основной образовательной программы

Дисциплина относится к вариативным факультативным дисциплинам Блока 1, является необязательной для изучения (код дисциплины: Б1.В.ФД1.)

3. Требования к уровню подготовки аспиранта, завершившего изучение данной дисциплины

Аспиранты, завершившие изучение данной дисциплины, должны:

- знать: современные методы молекулярно-генетических исследований
- уметь: применить методы для решения задач, поставленных в своем исследовании
- владеть: основными навыками постановки эксперимента с использованием молекулярно-биологических методов

4. Объем дисциплины и виды учебной работы

Общая трудоемкость дисциплины составляет 6 зачетных единицы (216 часов), в т.ч.:

Вид учебной работы	Объем часов / зачетных единиц
Обязательная аудиторная учебная нагрузка (всего)	108/4
в том числе:	
лекции	54/1,5
практические занятия	72/2
семинары	18/0,5
Самостоятельная работа аспиранта (всего)	72/2
в том числе:	
Работа с учебной, учебно-методической и научной литературой, подготовка к семинарам и опросам	36/1
Работа с генетическими базами данных	36/1
Всего	216/6
Вид контроля по дисциплине	зачет

5. Содержание дисциплины:

5.1 Наименование и содержание тем лекционных занятий:

№ п/п	Наименование тем лекционных занятий и их содержание	Кол-во час.
1.	Молекула ДНК. Репликация ДНК у эукариот. Репликация ДНК и клеточный цикл. Структурно-функциональные элементы хромосом эукариот: теломера и центромера. Репарация ДНК.	6
2.	Общая, или гомологичная рекомбинация. Сайт-специфичная рекомбинация. Различия молекулярных механизмов общей и сайт-специфичной рекомбинации. Классификация рекомбиназ. Типы хромосомных перестроек, осуществляемых при сайт-специфичной рекомбинации.	6
3.	Транскрипция у эукариот. Пространственная организация хромосом в ядре и регуляция генной активности. Регуляция транскрипции в развитии эукариот.	4
4.	Гормональная регуляция и сигнальные системы, регулирующие экспрессию генов.	2
5.	Механизмы эпигенетической регуляции экспрессии генов. Процессинг РНК. Кепирование, сплайсинг и полиаденилирование транскриптов, синтезируемых полимеразой II. Механизмы сплайсинга. Роль малых ядерных РНК и белковых факторов.	6
6.	Мир РНК и биосинтез белков. Центральная догма молекулярной биологии и генетический код. Принцип комплементарности в структуре ДНК, ее редупликации и транскрипции. Поток генетической информации ДНК → РНК → белок. Информационная (кодирующая) РНК, или мРНК.	4
7.	История расшифровки генетического кода. Основные свойства кода: триплетность, код без запятых, вырожденность. Особенности кодового словаря, семьи кодонов, смысловые и «бессмысленные» кодоны. Некодирующие РНК: открытие, основные виды (рибосомные РНК, тРНК). Малые некодирующие РНК. Современный мир РНК.	4
8.	Основные принципы структуры РНК. Генетические и негенетические функции РНК.	4
9.	Комплементарное воспроизведение первичной структуры в реакциях репликации и обратной транскрипции. Кодирование первичной структуры полипептидов (белков).	4
10.	Пространственное структурообразование белка. Функции специфического узнавания и связывания лигандов. Каталитические функции.	2
11.	Структура рибосом. Активация аминокислот и образование аминоацил-тРНК. Особенности кодирования и включения селеноцистеина в полипептидную цепь белка в процессе элонгации. Транспептидация. Активация аминокислот и образование аминоацил-тРНК. Эпцикл трансляции и рабочий элонгационный цикл.	6
12.	Рибосома как молекулярная машина. Инициация трансляции. Регуляция трансляции у эукариот. Маскирование – демаскирование	6

мРНК в процессах оогенеза, сперматогенеза и клеточной дифференцировки. Терминация трансляции. Белки в клеточной сигнализации.	
Итого часов/зачетных единиц	54/1,5

5.2 Содержание практических занятий:

№ п/п	Наименование тем практических занятий	Кол-во час.
1.	Методы выделения и очистки нуклеиновых кислот. Методы выделения и очистки ДНК плазмид. Методы выделения и очистки эукариотической ДНК. Методы выделения и очистки РНК, мРНК. Оценка качества и количества выделенных нуклеиновых кислот. Электрофорез нуклеиновых кислот.	10
2.	Ферменты, применяемые в молекулярно-генетическом исследовании. Рестриктазы: I, II и III типов. Изошизомеры. Изменение субстратной специфичности рестриктаз в неоптимальных условиях. Построение рестрикционных карт. ДНК-метиلاзы, их использование для получения крупных рестрикционных фрагментов ДНК. ДНК-лигазы. Механизм лигирования ДНК Т4-ДНК-лигазой. ДНК-зависимая ДНК-полимераза I E.coli и ее фрагмент Кленова. Их использование для введения концевой радиоактивной метки, «затупления» концов ДНК и ник-трансляции. Термостабильные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы. РНК-зависимые ДНК-полимеразы (обратные транскриптазы), их использование для получения кДНК.	18
3.	Методы исследования генома. Полимеразная цепная реакция. Создание библиотек ДНК. Методы оценки однонуклеотидных замен ДНК. Полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК. Аллель-специфическая ПЦР. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Дискриминация аллелей по кривым плавления (HMR). Секвенирование. Новые технологии секвенирования. QTL-анализ.	14
4.	Методы исследования транскриптома. ОТ-ПЦР. Создание библиотек кДНК. Нормализация библиотек кДНК. ПЦР в режиме реального времени. Метод дифференциального дисплея. Метод SAGE. Метод EST. Гибридизационные методы для исследования транскриптома: Northern-blot, микрочиповые технологии, защита от РНКаз, флуоресцентная гибридизация in situ (FISH).	12
5.	Использование молекулярно-генетических методов в популяционных исследованиях. Характеристика ДНК маркеров. Микросателлитный анализ. РАПД анализ. AFLP анализ. ПДРФ-анализ.	6
6.	Использование полимеразной цепной реакции для эпигенетических исследований. Метилспецифическая ПЦР. Метилспецифическая ПЦР со статистическими GC-богатыми праймерами. Метилспецифическая ПЦР со специфическими праймерами.	12
Итого часов/зачетных единиц		72/2

5.3 Содержание семинарских занятий:

№ п/п	Наименование тем семинарских занятий	Кол-во час.
1.	Устный опрос на тему: метод репортерного гена и его использование в биологических исследованиях. Методы визуализации фрагментов ДНК.	2
2.	Семинар-конференция на тему: использование реакции минисеквенирования для идентификации точечных полиморфизмов.	2
3.	Семинар-дискуссия на тему: ДНК-диагностика наследственных заболеваний. Генетическое сцепление и картирование генов. Программа «Геном человека»	2
4.	Семинар на тему: патентование ДНК-последовательностей. Генетические базы данных.	2
5.	Устный опрос по теме: структурно-функциональная организация и полиморфизм митохондриальной ДНК животных.	2
6.	Семинар на тему: структурно-функциональная организация и полиморфизм рибосомной ДНК животных.	2
7.	Устный опрос по теме: микросателлиты и популяционные аспекты судебной медицины.	2
8.	Семинар-дискуссия на тему: Этническая геномика. ДНК маркеры, используемые в этногеномике.	2
9.	Выполнение контрольной работы на тему: гены основного комплекса гистосовместимости и их использование в этногеномике.	2
Итого часов/зачетных единиц		18/0,5

6. Самостоятельная работа аспиранта

№ п/п	Вид и наименование тем самостоятельной работы	Кол-во час.
1.	Работа с учебной, учебно-методической и научной литературой, подготовка к семинарам, подготовка к семинарам, контрольным работам и устным опросам.	36
2.	Работа с генетическими базами данных.	36
Итого часов/зачетных единиц		72/2

Примечание. Аспиранты могут сами предлагать темы самостоятельной работы, касающиеся аспектов темы их исследовательской работы.

7. Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины

Основная литература:

1. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / под ред. Кузнецова В.Вл, Кузнецова В.В., Романова Г.А. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. 487 с.
2. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени. М.: Бином. 2008. 216 с.
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. М., Мир. 2002. 589 с.

4. Darbre Ph.D. Basic molecular biology: essential techniques. John Wiley&Sons. 2001. 194 p.
5. Молекулярная клиническая диагностика. Методы Пер.с англ. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макгию Мью: Мир, 1999. 558 с.
6. Справочник биохимика / Доусон Р., Эллиот Д., Эллиот У, Джонс К.: Пер. с англ. М.: Мир, 1991.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984. 480 с.
8. Нейфах А.А. Тимофеева М.Я. Молекулярная биология процессов развития. М.: Наука, 1977. 312 с.

Дополнительная литература:

1. Третьяков В., Генерозов Э., Громова О., Говорун В. Генетическая паспортизация населения – новая технология профилактики и реабилитации в медицине. Мет. Пособие. ЗАО «Постгеномные и нанотехнологические инновации», ФГУ НИИ физико-химической медицины РосЗдрава. М. 2008.180 с.
2. Молекулярный полиморфизм человека. Структурное и функциональное индивидуальное разнообразие макромолекул: Монография. Т. I, II / Под ред. С.Д. Варфоломеева. М.: РУДН., 2007. 841 с.
3. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. 413 с.
4. Транскрипция и трансляция. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Б. Хеймса и С. Хиггинса. М.: Мир, 1987. 400 с.
5. Сельско-хозяйственная биотехнология. Т.1 / Под ред. В.С. Шевелухи. М.:Евразия+, 2000. 264 с.

Лицензионное программное обеспечение

Access 2010 Russian Open License Pack NoLevel Academic Edition – программа для работы с базами данных;

Пакет программного обеспечения для создания и поддержки генетических баз данных Fingerprinting II Informatix (Bio-Rad, США).

Пакет программного обеспечения для конструирования олигонуклеотидных зондов Primer Premier 5.0 и Beacon Designer 8.

8. Материально-техническое обеспечение дисциплины

Подготовка аспирантов по факультативной дисциплине «Методы молекулярно-генетических исследований» осуществляется на базе группы молекулярной биологии, которая располагает материально-технической базой, соответствующей действующим санитарно-техническим нормам и обеспечивающей проведение всех видов теоретической и практической подготовки, предусмотренных учебным планом аспиранта, а также эффективное выполнение диссертационной работы. Имеется комната для проведения лекций и семинаров, презентационное оборудование, компьютеры с выходом в интернет, оргтехника и др. Основное оборудование:

Комплекс оборудования для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РВ-ОТ-ПЦР) и классической полимеразной цепной реакции совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) на базе лаборатории генетики, в том числе:

Оборудование для выделения нуклеиновых кислот (в стерильных условиях): Стерильный ламинарный шкаф СЛШ-МЗ (бокс) 2 А класса безопасности (АМС

МЗМО, Россия). Оснащен системой очистки воздуха (HEPA фильтр), рабочая зона внутри стерильного ламинарного шкафа обеззараживается УФ лампой. Используется на стадии выделения нуклеиновых кислот и подготовки проб для ПЦР.

ПЦР-бокс W4879 (Sigma, США) – предназначен для организации изолированного от внешней среды пространства при проведении работ с использованием полимеразной цепной реакции.

Стерильный ламинарный шкаф Kojair (Bioline, Finland) 2 класса безопасности. Оснащен HEPA фильтрами для очистки воздуха, обеспечивающими класс чистоты ISO -5 в соответствии со стандартом ISO -14644-1. Используется на стадии выделения нуклеиновых кислот и подготовки проб для ПЦР.

Центрифуга 5417C (Eppendorf, Германия) (2 шт). Рассчитана на 1,5 мл пробирки (30 проб), максимальная скорость 14000 об/мин. Используется для осаждения в процессе выделения нуклеиновых кислот.

Центрифуга Rotina 35R (Hettich Zentrifugen, Германия). С охлаждением, максимальное число оборотов в минуту: 15000. Используются для осаждения нуклеиновых кислот.

Центрифуга Liston C2201 (Россия) Низкоскоростная настольная центрифуга. Рассчитана на пробирки 10-15 мл. Используется на стадии получения плазмы и фракции лейкоцитов из цельной крови.

Вортекс непрерывного/импульсного режима Bio-Vortex V-1 (Biosan, Латвия) – используются для перемешивания во время процедуры выделения нуклеиновых кислот.

Термостат EchoTherm (Torrey Pines Scientific, США). Диапазон температур 4°C-70°C, есть таймер. Используется для поддержания необходимых температур во время проведения процедуры обратной транскрипции, выделения ДНК, обработки РНК ДНКазой.

Твердофазный термостат «Гном» (ДНК-Технологии, Россия). Программируемый, рассчитан на использование пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 и 0,5 мл. Диапазон температур от комнатной до 99°C. Используется для поддержания необходимых температур во время проведения процедуры обратной транскрипции, выделения ДНК, обработки РНК ДНКазой.

Спектрофотометр “SmartSpec Plus”, (BioRad, США). Однолучевой, с диапазоном длин волн 200-800 нм. Используется для определения концентраций нуклеиновых кислот (РНК, ДНК, кДНК) и белка. Встроенное программное обеспечение прибора позволяет ему на основании спектральных данных определять концентрацию и степень чистоты нуклеиновых кислот и белков (для этого имеются стандартные встроенные функции).

Низкотемпературный морозильник UF240-86E, вертикальный (Snijders scientific, Нидерланды). Диапазон температур от -60°C до -86°C. Используется для хранения образцов ДНК, РНК, кДНК, а также биологического материала до момента анализа.

Система многоступенчатой очистки воды Milli-Q (Millipore, США). Получение деионизованной, стерильной воды для работы с нуклеиновыми кислотами.

Система определения ПЦР в реальном времени ICycler iQ5 (Bio-Rad, США). Система предназначена для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с регистрацией продуктов реакции в режиме реального времени. Методика ПЦР в реальном времени является наиболее передовой технологией ПЦР, поскольку позволяет осуществлять количественную оценку уровня экспрессии генов в исследуемом материале. Система позволяет оценить уровень экспрессии гена, провести скрининг точковых мутаций и провести «мультиплексную» ПЦР, что позволяет детектировать в одной пробирке одновременно несколько продуктов ПЦР.

Система iQ5– принадлежит к новому поколению приборов ПЦР в реальном времени. Преимуществом данного оборудования является высокая специфичность, чувствительность, универсальность и автоматизация регистрации результатов, что дает быстроту и качество результатов исследования.

Амплификатор MaxyGene Gradient (AxyGene, США)(2шт) обеспечивает электрический нагрев и охлаждение фрагментов ДНК и изменение химического состава веществ. Предназначен для проведения полимеразной цепной реакции. На любой стадии программы можно установить градиент до 24°C слева направо через рабочий блок, при этом скорость нагрева/охлаждения может находиться в пределах до 3°C/2°C в секунду. Фиксация микропланшетов или пробирок на термоблоке осуществляется с помощью нагреваемой верхней крышки. Её использование устраняет необходимость использования масла и гарантирует равномерность контакта с блоком.

Гомогенизатор MagNALyser (Roche, Германия) Прибор в автоматическом режиме гомогенизирует образцы и разрушает клетки, облегчая процесс получения супернатанта, используемого для последующего выделения и очистки нуклеиновых кислот. В прибор помещаются специальные пробирки, содержащие керамические и стеклянные шарики, исследуемый материал и лизирующие реактивы. Производительность за одну постановку - 16 образцов за несколько минут (до 10 минут). Используется для широкого разнообразия типов обрабатываемых образцов (ткани растений и животных, цельная кровь, клетки крови, пищевые продукты, бактерии, грибы и др). MagNA Lyser проводит гомогенизацию в специальной герметично закрытой пробирке, благодаря чему предотвращает контакт с инфицированным материалом

9. Вопросы к зачету по дисциплине “Методы молекулярно-генетических исследований”

1. Методы выделения и очистки нуклеиновых кислот.
2. Методы выделения и очистки ДНК плазмид.
3. Методы выделения и очистки эукариотической ДНК.
4. Методы выделения и очистки РНК, мРНК.
5. Оценка качества и количества выделенных нуклеиновых кислот. Электрофорез нуклеиновых кислот.
6. Ферменты, применяемые в молекулярно-генетическом исследовании.
7. Рестриктазы: I, II и III типов.
8. Изошизомеры. Изменение субстратной специфичности рестриктаз в неоптимальных условиях. Построение рестрикционных карт.
9. ДНК-метилазы, их использование для получения крупных рестрикционных фрагментов ДНК. ДНК-лигазы. Механизм лигирования ДНК T4-ДНК-лигазой.
10. ДНК-зависимая ДНК-полимераза I E.coli и ее фрагмент Кленова. Их использование для введения концевой радиоактивной метки, «затупления» концов ДНК и ник-трансляции. Термостабильные ДНК-зависимые ДНК- полимеразы.
11. РНК-зависимые ДНК-полимеразы (обратные транскриптазы), их использование для получения кДНК.
12. Методы исследования генома. Полимеразная цепная реакция.
13. Создание библиотек ДНК.
14. Методы оценки однонуклеотидных замен ДНК.
15. Полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК.
16. Аллель-специфическая ПЦР.
17. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ).
18. Дискриминация аллелей по кривым плавления (НМР).
19. Секвенирование.
20. Новые технологии секвенирования. QTL-анализ.
21. Методы исследования транскриптома. ОТ-ПЦР. Создание библиотек кДНК. Нормализация библиотек кДНК. ПЦР в режиме реального времени. Метод дифференциального дисплея. Метод SAGE.

22. Метод EST. Гибридизационные методы для исследования транскриптома: Northern-blot, микрочиповые технологии, защита от РНКаз, флуоресцентная гибридизация in situ (FISH).
23. Использование молекулярно-генетических методов в популяционных исследованиях. Характеристика ДНК маркеров. Микросателлитный анализ.
24. РАПД анализ.
25. AFLP анализ.
26. ПДРФ-анализ.
27. Использование полимеразной цепной реакции для эпигенетических исследований.
28. Метилспецифическая ПЦР.
29. Метилспецифическая ПЦР со статистическими GC-богатыми праймерами.
Метилспецифическая ПЦР со специфическими праймерами.