

Минобрнауки России
Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр
Российской академии наук»
(КарНЦ РАН)

УТВЕРЖДАЮ

Врио председателя КарНЦ РАН
член-корр. РАН

_____ О.Н. Бахмет

« ____ » _____ 2018 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

«Методы молекулярно-генетических исследований»

Основной образовательной программы высшего образования –
программы подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре
по направлению подготовки

06.06.01 Биологические науки,

профили: **Биохимия, Физиология и биохимия растений**

Принята Ученым советом КарНЦ РАН от 25 мая 2018 г. протокол № 07 .

Пояснительная записка

Рабочая программа дисциплины «Методы молекулярно-генетических исследований» составлена на основании следующих документов:

– Федеральный закон РФ от 29.12.2012 № 273-ФЗ «Об образовании в Российской Федерации»;

– Приказ Минобрнауки России от 19.11.2013 г. № 1259 «Об утверждении Порядка организации и осуществления образовательной деятельности по образовательным программам высшего образования – программам подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре (адъюнктуре)»;

– Приказ Министерства образования и науки Российской Федерации от 30.07.2014 № 871 «Об утверждении федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки (уровень подготовки кадров высшей квалификации)» (в ред. Приказа Минобрнауки России от 30.04.2015 № 464);

– Положение о разработке и утверждении основных образовательных программ высшего образования – программ подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре (программ аспирантуры) и индивидуальных учебных планов обучающихся (принято Ученым советом КарНЦ РАН 27.06.2018, протокол № 8).

Составители программы:

Топчиева Людмила Владимировна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики ИБ КарНЦ РАН;

Лебедева Ольга Николаевна – кандидат биологических наук, доцент заместитель директора по научной работе ИБ КарНЦ РАН.

1. Цели и задачи 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

Факультативная дисциплина – необязательная для изучения (ФТД4).

Период освоения – 3 и 4 семестр.

3. Входные требования для освоения дисциплины (модуля), предварительные условия

ЗНАТЬ: современные методы молекулярно-генетических исследований для выработки правильного научного общебиологического мировоззрения и для корректной и правильной постановки экспериментов.

УМЕТЬ: применить методы для решения задач, поставленных в своем исследовании.

ВЛАДЕТЬ: основными навыками постановки эксперимента с использованием молекулярно-биологических методов.

4. Перечень компетенций выпускника аспирантуры, на формирование которых направлено освоение дисциплины

ПК-1: Способность генерировать теоретические знания и осваивать современные методы фундаментальных и прикладных исследований в области биохимии / физиологии и биохимии растений;

ПК-2: Способность генерировать теоретические знания и осваивать современные методы фундаментальных и прикладных исследований в области экологической биохимии/экологической физиологии растений;

ПК-3: Способность генерировать теоретические знания и осваивать современные методы фундаментальных и прикладных исследований в области изучения белков и пептидов / фотосинтеза растений;

ПК-4: Способность генерировать теоретические знания и осваивать современные методы фундаментальных и прикладных исследований в области изучения процесса роста и развития растений;

ПК-7: Способность планировать, организовывать и осуществлять экспериментальную работу в области биохимии / физиологии и биохимии растений;

5. Планируемые результаты обучения по дисциплине (модулю), соотнесенные с планируемыми результатами освоения образовательной программы (компетенциями выпускников)

ЗНАТЬ: сервисы поиска научной информации в области молекулярной биологии, современные методы молекулярно-генетических исследований; принципы анализа данных и интерпретации результатов, полученных с использованием молекулярно-генетических методов.

УМЕТЬ: используя теоретические знания, средства и сервисы поиска и анализа научной информации генерировать необходимые знания и сведения в области молекулярной биологии; применить современные методы молекулярно-генетических исследований для решения фундаментальных и прикладных научно-исследовательских задач в области биохимии.

ВЛАДЕТЬ: навыками самостоятельной работы с литературой, поиска и анализа и обобщения теоретической и методологической информации в области молекулярной биологии;

молекулярно-генетическими методами изучения структуры, свойств и функций соединений белковой природы, навыками постановки и проведения эксперимента с использованием молекулярно-генетических методов, методами обработки и интерпретации результатов, полученных с использованием молекулярно-генетических методов.

6. Объем дисциплины и виды учебных занятий (в виде таблицы)

Общая трудоемкость дисциплины составляет 6 зачетных единиц, что составляет 216 часов.

Вид учебной работы	Объем часов / зачетных единиц
Объем дисциплины (всего)	216 / 6 з.е.
Аудиторная учебная нагрузка (всего), в том числе:	144 / 4 з.е.
лекции	36
практические занятия	108
семинары	-
Самостоятельная работа аспиранта (всего)	72 / 2 з.е.
Вид итогового контроля по дисциплине	Зачет

7. Структура дисциплины по темам (разделам) с указанием отведенного на них количества академических часов, видов учебных занятий, форм текущего контроля

Приложение

8. Содержание тем (разделов) дисциплины

Лекционные занятия

№	Тема занятия	Кол-во час.
1.	Организация генома, информационные молекулы генома (ДНК, РНК). Структура хроматина. Хромосомы. Гены эукариот: мозаичное строение. Повторяющиеся последовательности. Изохоры, метилирование, гиперчувствительные сайты. Репликация ДНК. Ферменты, участвующие в репликации ДНК. Репликативное метилирование ДНК. Транскрипция. Структура эукариотического промотора. Типы РНК- полимераз у эукариот и синтезируемые ими РНК. Факторы транскрипции. Медиаторный комплекс транскрипции. Эnhансеры и сайленсеры. ДНК-связывающие белки, участвующие в регуляции транскрипции: белки, содержащие гомеодомены, лейциновую «застежку», «цинковые пальцы». Особенности организации генов у прокариот и эукариот. Механизмы регуляции экспрессии генов. Некодирующие РНК: открытие, основные виды (рибосомные РНК, тРНК). Малые некодирующие РНК. Репарация ДНК.	10
2.	Методы исследования генома. Полимеразная цепная реакция. Использование полимеразной цепной реакции для эпигенетических исследований (Метилспецифическая ПЦР, Метилспецифическая ПЦР со статистическими GC-богатыми праймерами, метилспецифическая ПЦР	8

	со специфическими праймерами). ПЦР в режиме реального времени. Секвенирование ДНК. Секвенирование по Сэнгеру. Пиросеквенирование. NGS секвенирование.	
3.	Методы исследования транскриптома. Обратная транскрипция. Фермент ревертаза. Синтез комплементарной цепи. Создание библиотек кДНК. Нормализация библиотек кДНК. ОТ-ПЦР. 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). NGS секвенирование для анализа транскриптома.	8
4.	Изменчивость и мобильность генома. Полиморфные сайты рестрикции. Микросателлитные и минисателлитные повторы. Alu повторы в геноме. Ретротранспозоны. Однонуклеотидные замены. Методы выявления геномного полиморфизма, использование генетических маркеров для оценки генетического разнообразия (ПЦР-ПДРФ-анализ, микросателлитный анализ, аллель-специфическая ПЦР, полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК, дискриминация аллелей по кривым плавления (HMR)).	8
5.	Базы нуклеотидных последовательностей. Статистические программы для анализа генетических характеристик популяций.	2
	Итого	36

Практические занятия

№	Тема занятия	Кол-во час.
1.	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.	18
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 T4-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. Обратная транскрипция.	4
3.	Полимеразная цепная реакция. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.	18

4.	ПЦР-ПДФ-анализ, микросателлитный анализ, аллель-специфическая ПЦР, полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК, дискриминация аллелей по кривым плавления (HMR).	34
5.	Секвенирование ДНК. Секвенирование по Сэнгеру.	8
6.	Работа в базе нуклеотидных последовательностей.	4
7.	Ознакомление с программами для дизайна праймеров и зондов для ПЦР (Primer Premier 5.0 и Beacon Designer 3.2). Конструирование праймеров и зондов.	4
8.	Устный опрос на тему: метод репортерного гена и его использование в биологических исследованиях. Методы визуализации фрагментов ДНК.	2
9.	Семинар-конференция на тему: использование реакции минисеквенирования для идентификации точечных полиморфизмов.	2
10.	Семинар-дискуссия на тему: ДНК-диагностика наследственных заболеваний. Генетическое сцепление и картирование генов. Программа «Геном человека»	2
11.	Семинар на тему: патентование ДНК-последовательностей. Генетические базы данных.	2
12.	Устный опрос по теме: структурно-функциональная организация и полиморфизм митохондриальной ДНК животных.	2
13.	Семинар на тему: структурно-функциональная организация и полиморфизм рибосомной ДНК животных.	2
14.	Устный опрос по теме: микросателлиты и популяционные аспекты судебной медицины.	2
15.	Семинар-дискуссия на тему: Этническая геномика. ДНК маркеры, используемые в этногеномике.	2
16.	Выполнение контрольной работы на тему: гены основного комплекса гистосовместимости и их использование в этногеномике.	2
	Итого	108

9. Методические материалы для текущего контроля

Тесты по теме «Хранение и защита генетической информации»

Вопросы к контрольной работе по теме «Выделение и очистка нуклеиновых кислот»

Вопросы к устным опросам

1. История возникновения и развития молекулярной биологии.
2. Молекулярные основы генетической рекомбинации и её виды.
3. Значение мобильных элементов в эволюции.
4. Транскрипция у эукариот.
5. Структура рибосом. Трансляция.
6. ДНК: кодирующие и некодирующие участки. Сателлитная ДНК.
7. Регуляторные области генов.
8. Интрон-экзонная организация генов эукариот. Сплайсинг.
9. Основы генетической изменчивости. Хромосомные и генные мутации.
10. Эпигенетическая изменчивость. Молекулярные основы эпигенетической изменчивости.
11. Генетическая инженерия.

12. Генная терапия.

Темы рефератов:

1. Программа «Геном человека».
2. Различные механизмы сплайсинга. Автосплайсинг. Trans-сплайсинг. Альтернативный сплайсинг. Роль альтернативного сплайсинга в функциональной активности белков.
3. РНК-интерференция. si РНК. mi РНК. Использование РНК-интерференции в биологических экспериментах.
4. Реорганизация хроматина и регуляция экспрессии генов.
5. Химический синтез олиго- и полинуклеотидов.
6. Естественный, химический и радиационный мутагенез.
7. Редактирование генома с CRISPR/Cas9
8. Получение нокаутных/трансгенных мышей. Их использование в биологических и биомедицинских экспериментах.
9. Картирование генома человека. Методы.
10. Картирование генома растений. Методы.

10. Методические материалы для оценивания итоговых результатов обучения по дисциплине

Вопросы к зачету

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.

11. Учебная литература

Перечень основной литературы

- 1) Darbre Ph.D. Basic molecular biology: essential techniques. John Wiley&Sons. 2001. 194 p.
- 2) Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. М., Мир. 2002. 589 с.
- 3) Инге-Вечтомов. Генетика с основами селекции. СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. 720 с. М.
- 4) Лебедева М.А., Творогова В.Е., Тиходеев О.Н. Эпигенетические механизмы и их роль в развитии растений // Генетика. 2017. Т. 53, № 10. С. 1115-1131.
- 5) Люин Б. Гены. М.: Бином. Лаборатория знаний. 2011.
- 6) Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984. 480 с.
- 7) Молекулярная клиническая диагностика. Методы Пер.с англ. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макгию Мю: Мир, 1999. 558 с.
- 8) 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.
- 9) Нуклеиновые кислоты от А до Я. Редактор С. Мюллер, М. Бином. 2013.
- 10) Павлов С.Д., Животовский Л.А. Выявление аллельных вариантов микросателлитных маркеров методами капиллярного и традиционного электрофореза // Генетика. 2016. Т. 52, №4. С. 482-487.
- 11) Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени. М.: Бином. 2008. 216 с.
- 12) Сингер, П. Берг Гены и геномы (в 2-х томах) М. Мир. 1998.
- 13) Спирин А.С.. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот. М: Высшая школа, 1990.
- 14) Спирин А.С.. Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка. М: Академика, 2009.
- 15) Топчиева Л.В., Федоренко О.М. Методические подходы для изучения молекулярных механизмов адаптации // Труды КарНЦ РАН. 2014. №5. С. 30-43.
- 16) Щуко А.Г., Веселов А.А., Юрьева Е.Н., Волкова Н.В., Шабанов Г.А., Рыбченко А.А., Почтаренко Е.В. Эпигенетика и способы ее реализации // Сибирский научный медицинский журнал. 2017. Т. 37, № 4. С. 26-36.

Перечень дополнительной литературы

- 1) Антонова О.С., Корнева Р.А., Белов Ю.В., Курочкин В.Е. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии // Научное приборостроение. 2010. Т. 20, №1. С. 3-9.
- 2) Рубцова Г.А., Пономарева Е.В., Афанасьев К.И., Шайхаев Е.Г., Холодова М.В.,
- 3) Столповский Ю.А. Популяционно-генетические основы сохранения генофондов domestцированных видов животных // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17, № 4/2. С. 900-915.

- 4) Храмеева Е.А. Дальние взаимодействия в геномах эукариот и регуляция сплайсинга. Диссертация на соиск. уч. степени канд. биол. наук. М. 2014.
- 5) Патрушев Л.И., Коваленко Т.Ф. Функции некодирующих последовательностей генома млекопитающих // Успехи биологической химии. 2014. Т. 54. С. 39-102.
- 6) Разин С.В., Гаврилов А.А., Ульянов С.В. Регуляторные элементы эукариотического генома, контролирующие транскрипцию // Молекулярная биология. 2015. Т. 49, №2. С. 212-223.
- 7) Равин Н.В., Шестаков С.В. Геном прокариот // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т.17, № 4/2. С. 972-984.
- 8) Дымшиц Г.М., Саблина О.В. «Разорванные» гены и сплайсинг // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18, № 1. С. 71-80.
- 9) Киселева Н.П., Киселев Ф.Л. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов в вирус-ассоциированных опухолях человека // Успехи молекулярной онкологии. 2014. №1. С. 48-55. <https://elibrary.ru/item.asp?id=22662131>

12. Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»

Наименование ресурса и ссылка

Отчистка нуклеиновых кислот

[режим доступа:

http://www.skygen.com/obzory/13_ochistka_nukleinovyh_kislot_mnogoobrazie_metodov_i_podhodov/]

Электронный ресурсы научной библиотеки КарНЦ РАН

[режим доступа: <http://library.krc.karelia.ru/>]

Электронная научная библиотека eLIBRARY.RU

[режим доступа: <http://elibrary.ru/defaultx.asp>]

Электронная юбиблиотека ОБН РАН

[режим доступа: <http://www.sevin.ru/library/>]

Библиотека по естественным наукам РАН

[режим доступа: <http://www.benran.ru/>]

Электронная научная библиотека Wiley Online Library

[режим доступа: <http://onlinelibrary.wiley.com/>]

Электронная научная библиотека издательства Springer

[режим доступа: <http://www.springer.com/gp/>]

Электронная научная библиотека издательства Elsevier

[режим доступа: <http://www.elsevier.com/>]

Библиографическая и реферативная база данных Scopus

[режим доступа: <http://www.scopus.com/>]

Национальная библиотека Республики Карелия

[режим доступа: <http://library.karelia.ru/>]

Медико-биологический информационный портал и поисковая система Medline

[режим доступа: <http://www.medline.ru/medsearch/>]

Национальная библиотека США по Медицине PubMed

[режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>]

13. Материально-техническое обеспечение

Оборудование для молекулярно-генетических исследований:

Система ПЦР в режиме реального времени, система анализа РНК IQ iCycler (Bio-Rad)

Амплификатор (термоциклер) МахуGene II Therm-1000 (Axygene)

Система Areol и CytoVision Areol SL-50 (Genetix, Великобритания)

Система генетического анализа CEQ 8000 в комплекте (Beckman Coulter)

Комплексная лаборатория иммуноферментного анализа АИФ-Ц-01С

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, исполнения C1000 Touch в комплекте с модулем реакционным оптическим CFX96

Система высокой очистки воды Simplicity с УФ лампой

Лабораторная микроцентрифуга MiniSpin plus

Микроцентрифуга-вортекс "Микроспин" FV-2400, 2800 об/мин, роторы R-1,5, R-0.5/0.2

Термостат твердотельный с таймером ТТ-2 "Термит";

Модуль HRM Manager для анализа кривых плавления

Бокс микробиологической безопасности БМБ-II-"Ламинар-С" в исполнении БМБ-II-"Ламинар-С.»-1.2

Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С."

Термостат твердотельный с таймером ТТ-2 "Термит".

14. Перечень лицензионного программного обеспечения

1. Access 2010 Russian Open License Pack NoLevel Academic Edition – программа для работы с базами данных;
2. Power Point 2007 – программа для создания презентаций.
3. Пакет программного обеспечения для создания и поддержки генетических баз данных Fingerprinting II Informatix (Bio-Rad, США).
4. Пакет программного обеспечения для конструирования олигонуклеотидных зондов Primer Premier 5.0 и Beacon Designer 8.

15. Критерии оценивания для итогового контроля по дисциплине

Результаты зачета оцениваются на «зачтено», «незачтено» по следующим основаниям:

«Зачтено» ставится, если ответ построен логично, в соответствии с планом, показано знание универсальных, общепрофессиональных и профессиональных вопросов, терминов и понятий, установлены содержательные межпредметные связи, выдвигаемые положения обоснованы, приведены примеры, показан аналитический и комплексный подход к раскрытию материала, сделаны содержательные выводы, продемонстрировано знание основной и дополнительной литературы.

«Незачтено» ставится, если ответ построен не логично, план ответа соблюдается непоследовательно, отвечающий не раскрыты профессиональные знания и умения. Научное обоснование вопросов подменено рассуждениями дилетантского характера. Ответ содержит ряд серьезных неточностей и грубых ошибок. Не обнаружен аналитический и комплексный подход к раскрытию материала, сделанные выводы поверхностны или неверны, не продемонстрировано знание основной и дополнительной литературы.