

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное учреждение
высшего профессионального образования
"Казанский (Приволжский) федеральный университет"
Институт фундаментальной медицины и биологии



подписано электронно-цифровой подписью

Программа дисциплины

Специальный семинар: Основы молекулярно-биологического анализа М1.В.1.2

Направление подготовки: 020400.68 - Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

Квалификация выпускника: магистр

Форма обучения: очное

Язык обучения: русский

Автор(ы):

Яруллина Д.Р.

Рецензент(ы):

Зеленихин П.В.

СОГЛАСОВАНО:

Заведующий(ая) кафедрой: Ильинская О. Н.

Протокол заседания кафедры No ___ от "___" _____ 201__ г

Учебно-методическая комиссия Института фундаментальной медицины и биологии:

Протокол заседания УМК No ___ от "___" _____ 201__ г

Регистрационный No 849437714

Казань
2014

Содержание

1. Цели освоения дисциплины
2. Место дисциплины в структуре основной образовательной программы
3. Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины /модуля
4. Структура и содержание дисциплины/ модуля
5. Образовательные технологии, включая интерактивные формы обучения
6. Оценочные средства для текущего контроля успеваемости, промежуточной аттестации по итогам освоения дисциплины и учебно-методическое обеспечение самостоятельной работы студентов
7. Литература
8. Интернет-ресурсы
9. Материально-техническое обеспечение дисциплины/модуля согласно утвержденному учебному плану

Программу дисциплины разработал(а)(и) доцент, к.н. Яруллина Д.Р. кафедра микробиологии ИФМиБ отделение фундаментальной медицины, kasfes@gmail.com

1. Цели освоения дисциплины

Изучение дисциплины "Основы молекулярно-биологического анализа" ставит своей целью сформировать у магистрантов представления о базовых методах молекулярной биологии и генетической инженерии: их сущности, возможностях, научных достижениях, полученных с их применением, а также перспективах их использования и развития.

2. Место дисциплины в структуре основной образовательной программы высшего профессионального образования

Данная учебная дисциплина включена в раздел " М1.В.1 Общенаучный" основной образовательной программы 020400.68 Биология и относится к вариативной части. Осваивается на 1 курсе, 2 семестр.

Дисциплина "Основы молекулярно-биологического анализа" базируется на знаниях, приобретенных бакалаврами при изучении генетики, молекулярной биологии, биохимии и др. Данная дисциплина является базовой составляющей различных дисциплин, входящих в программу подготовки магистров. Приобретение фундаментальных знаний по дисциплине "Основы молекулярно-биологического анализа" является важным компонентом целостного естественнонаучного мировоззрения микробиолога. Основное внимание курса сосредоточено на методиках выделения и очистки нуклеиновых кислот, проведения амплификации ДНК, в частности, на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Также рассматриваются методы анализа продуктов амплификации (гель-электрофорез, гибридизационно-ферментативный метод и др.). Освещаются методы гибридизационного анализа, направленного мутагенеза, картирования геномов и многие другие. Полученные знания по дисциплине необходимы магистрантам при подготовке, выполнении и защите магистерской выпускной работы, а также и при решении научно-исследовательских и производственно-технологических задач в будущей профессиональной деятельности в области молекулярной медицины, генетики, клеточных технологий.

3. Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины /модуля

В результате освоения дисциплины формируются следующие компетенции:

Шифр компетенции	Расшифровка приобретаемой компетенции
ОК-6 (общекультурные компетенции)	способен самостоятельно приобретать с помощью информационных технологий и использовать в практической деятельности новые знания и умения, в том числе в новых областях знаний, непосредственно не связанных со сферой деятельности
ПК-10 (профессиональные компетенции)	глубоко понимает и творчески использует в научной и производственно-технологической деятельности знания фундаментальных и прикладных разделов специальных дисциплин магистерской программы
ПК-13 (профессиональные компетенции)	самостоятельно использует современные компьютерные технологии для решения научно- исследовательских и производственно-технологических задач профессиональной деятельности, для сбора и анализа биологической информации
ПК-2 (профессиональные компетенции)	знает и использует основные теории, концепции и принципы в избранной области деятельности, способен к системному мышлению

В результате освоения дисциплины студент:

1. должен знать:

теоретические основы практической работы с нуклеиновыми кислотами и белками;

2. должен уметь:

выбирать метод, адекватный поставленным задачам по изучению структуры и функций нуклеиновых кислот, из арсенала современных молекулярно-биологических методов;

3. должен владеть:

методологическими основами современной молекулярной биологии;

4. должен демонстрировать способность и готовность:

к применению методов молекулярной биологии и генетической инженерии в клинической практике и научно-исследовательской работе.

4. Структура и содержание дисциплины/ модуля

Общая трудоемкость дисциплины составляет 2 зачетных(ые) единиц(ы) 72 часа(ов).

Форма промежуточного контроля дисциплины зачет во 2 семестре.

Суммарно по дисциплине можно получить 100 баллов, из них текущая работа оценивается в 50 баллов, итоговая форма контроля - в 50 баллов. Минимальное количество для допуска к зачету 28 баллов.

86 баллов и более - "отлично" (отл.);

71-85 баллов - "хорошо" (хор.);

55-70 баллов - "удовлетворительно" (удов.);

54 балла и менее - "неудовлетворительно" (неуд.).

4.1 Структура и содержание аудиторной работы по дисциплине/ модулю

Тематический план дисциплины/модуля

N	Раздел Дисциплины/ Модуля	Семестр	Неделя семестра	Виды и часы аудиторной работы, их трудоемкость (в часах)			Текущие формы контроля
				Лекции	Практические занятия	Лабораторные работы	
1.	Тема 1. Физико-химические свойства белков. Методы их выделения, очистки и анализа	2	1	0	2	0	презентация
2.	Тема 2. Хроматография	2	2, 3	0	4	0	письменная работа презентация
3.	Тема 3. Свойства нуклеиновых кислот. Методы выделения нуклеиновых кислот из клеток	2	4	0	2	0	презентация
4.	Тема 4. Методы амплификации нуклеиновых кислот	2	5	0	2	0	презентация

N	Раздел Дисциплины/ Модуля	Семестр	Неделя семестра	Виды и часы аудиторной работы, их трудоемкость (в часах)			Текущие формы контроля
				Лекции	Практические занятия	Лабораторные работы	
5.	Тема 5. Модификации ПЦР. Лигазная цепная реакция (ЛЦР, LCR), метод транскрипционной амплификации (ТА, TAS)	2	6	0	2	0	презентация
6.	Тема 6. Детекция продуктов амплификации	2	7	0	2	0	презентация
7.	Тема 7. Методы идентификации определенных участков ДНК	2	8	0	2	0	презентация
8.	Тема 8. Методы направленного мутагенеза	2	9	0	2	0	презентация
9.	Тема 9. Секвенирование нуклеиновых кислот	2	10	0	2	0	презентация
10.	Тема 10. Анализ генома, картирование	2	11, 12	0	4	0	презентация письменная работа
.	Тема . Итоговая форма контроля	2		0	0	0	зачет
	Итого			0	24	0	

4.2 Содержание дисциплины

Тема 1. Физико-химические свойства белков. Методы их выделения, очистки и анализа практическое занятие (2 часа(ов)):

Физико-химические свойства белков: форма, молекулярная масса, изоэлектрическая точка, растворимость. Методы выделения и очистки белков. Методы разрушения тканей для выделения белков. Механические, химические и ферментативные способы дезинтеграции биологических материалов. Гомогенизаторы Уоринга и другие ножевые гомогенизаторы при разрушении животных и растительных тканей. Гомогенизатор Поттера. Метод разрушения клеток при помощи стеклянных, металлических или пластмассовых шариков. Шаровые мельницы. Метод замораживания и оттаивания ткани. Разрушение клеток при помощи ультразвуковых дезинтеграторов. Ферментативные и химические методы разрушения клеток. Фракционирование биологических макромолекул при помощи сульфата аммония, спирта, ацетона, низкоскоростного центрифугирования. Ультрацентрифугирование. Разделение биополимеров при помощи ультрацентрифуги. Физические принципы, лежащие в основе метода ультрацентрифугирования. Устройство и скоростные параметры ультрацентрифуги. Типы ультрацентрифугирования. Микро- и ультрафильтрация, как метод концентрирования, разделения и очистки широкого спектра биологических и химических макромолекул. Типы фильтров. Устройство приборов для ультрафильтрации. Хроматография. Фракционирование макромолекул при помощи хроматографии. Хроматография как двухфазная система. Роль подвижной и неподвижной фазы. Динамическое равновесие при хроматографическом процессе. Количественные характеристики хроматографического процесса. Устройство хроматографических систем низкого и высокого давления. Электрофорез. Общие принципы метода, среда для проведения электрофореза, состав и типы гелей. Принципиальная схема прибора для проведения электрофореза. Физико-химические свойства макромолекул, влияющие на их разделение при электрофорезе. Электрофорез в нативных и денатурирующих условиях. Типы приборов для электрофореза белков. SDS-электрофорез белков в ПААГ. Концентрирующие и разделяющие гели. Применение градиентных и неградиентных разделяющих гелей. Детекция белков. Красители. Определение молекулярной массы белков. Вестерн-блот, как метод высокоспецифической детекции белков, способы иммунохимической и фото- проявки результатов. Изоэлектрофокусирование (ИЭФ). Принципы метода. Создание градиента pH. Амфолины и иммобилины. Параметры макромолекул, влияющие на разделение методом ИЭФ. Среды для проведения ИЭФ. Эндоосмос в агарозе. Кривые титрования макромолекул, полученные методом ИЭФ. Их физический смысл и применение. Приборы для ИЭФ. Препаративное и аналитическое изоэлектрофокусирование. Двумерный электрофорез. Задачи, решаемые методом двумерного электрофореза. Иммуноэлектрофорез. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). ИФА как метод детекции биологических макромолекул. Иммуноферментные конъюгаты. Ферменты и цветные реакции, применяемые для ИФА. Прямой и конкурентный ИФА. Применение ИФА для медицинско-диагностических целей.

Тема 2. Хроматография

практическое занятие (4 часа(ов)):

Гель-фильтрационная хроматография. Хроматографическое фракционирование макромолекул по размеру. Определение молекулярных масс белков методом гель-фильтрационной хроматографии. Адсорбционная хроматография. Типы физических взаимодействий, участвующие в процессе сорбции: дипольные взаимодействия, Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, водородные связи, ионные связи. Распределительная жидкостная колоночная хроматография. Разделение веществ по разнице в их растворимостях. Состав фаз при нормальнофазовой (НФХ) и обратнотазовой (ХОФ) распределительных хроматографиях. Неподвижная жидкая фаза. Способы ее создания. Механизм регулирования хроматографического процесса при распределительной хроматографии. Гидрофобная хроматография. Разделение биологических макромолекул в результате различий в уровнях их гидрофобных взаимодействий с гидрофобными группами матрикса сорбента. Механизмы регулирования процессов сорбции и десорбции. Сорбенты для гидрофобной хроматографии. Ионообменная хроматография. Механизм сорбции. Ионогенные группы. Контрионы. Кривые титрования сильных и слабых ионообменников. Изоэлектрическая точка макромолекул. Выбор ионообменника. Ион-парная хроматография. Хроматофокусирование ? хроматографический метод разделения белков на основании различий в значениях pI . Особенности сорбентов для хроматофокусирования. Молекулярный механизм эффекта ?фокусирования? при хроматофокусировании. Аффинная хроматография. Адсорбция вещества на колонке за счет биоспецифического взаимодействия. Типы биоспецифических взаимодействий. Химические методы иммобилизации аффинных лигандов. Матрицы сорбентов для аффинной хроматографии. Управление процессами сорбции ? десорбции при аффинной хроматографии. Тонкослойная хроматография (ТСХ). Принципы метода. Экспресс-разделение биологических макромолекул. Оборудование и приборы для ТСХ. Письменная работа по пройденному материалу.

Тема 3. Свойства нуклеиновых кислот. Методы выделения нуклеиновых кислот из клеток

практическое занятие (2 часа(ов)):

Физические и химические свойства ДНК и РНК. Методы модификации нуклеиновых кислот, щелочной и кислотный гидролиз. Ферменты, используемые для работы с нуклеиновыми кислотами. Ферменты рестрикции и модификации нуклеиновых кислот. Субстратная специфичность по отношению к природным и модифицированным нуклеиновым кислотам. Рестриктазы - основной инструмент генной инженерии. Области практического использования молекулярно-биологических методов. Возможности методов. История развития этой области исследований. Основные направления ДНК-диагностики. Пробоподготовка. Основные приемы очистки нуклеиновых кислот. Современные методы для выделения ДНК (РНК) из клеток. Метод выделения ДНК одношаговый (РНК) с использованием ?Tri reagent?. Метод выделения ДНК (РНК) путем термического лизиса в присутствии сорбента. Метод выделения ДНК (РНК) с помощью фенольно-спиртовой депротеинизации. Выделение ДНК (РНК) путем гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. Однопробирочный метод выделения ДНК (РНК) ? (лизирующий раствор, изопропанол, буфер). Метод экстракции ДНК с использованием набора ?DIAAtom™ DNA Prep?. Метод выделения ДНК с применением набора ?ExtraGene? DNA Prep?. Метод сорбции на силикагеле. Метод выделения ДНК (РНК) на колонках со специальными фильтрами. Подготовка материала к амплификации по методу минипулов и концентрирование материала. Аппаратное обеспечение. Риболайзеры.

Тема 4. Методы амплификации нуклеиновых кислот

практическое занятие (2 часа(ов)):

Общая характеристика методов амплификации нуклеиновых кислот. Подходы к классификации методов амплификации. Принципы технологии амплификации, ее этапы. Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Сущность метода. Необходимые реактивы (компоненты реакционной смеси) и оборудование. Праймеры. Таq-ДНК-полимераза. Амплификатор (термо-циклер). Цикл амплификации, характеристика его этапов.

Тема 5. Модификации ПЦР. Лигазная цепная реакция (ЛЦР, LCR), метод транскрипционной амплификации (ТА, TAS)

практическое занятие (2 часа(ов)):

ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR), Touchdown (Stepdown) ПЦР, ?Вложенная? ПЦР (Nested PCR), ?Инвертированная? ПЦР (Inverse PCR), Асимметричная ПЦР (Asymmetric PCR), Лонг-ПЦР (Long-PCR). LiPA-ПЦР. ПЦР in situ (PRIMS), мультиплексная ПЦР (multi-PCR). Количественная ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time PCR). Принцип метода, его возможности, история применения. Отличия от классической ПЦР. Модификации ПЦР в реальном времени. Лигазная цепная реакция (ЛЦР, LCR). Принцип метода, его возможности, история открытия. Модификации ЛЦР. Лигазная цепная реакция с заполнением бреши. Мультиплексная ЛЦР (multi-LCR). Метод транскрипционной амплификации (ТА, ТАС). Принцип метода, его возможности, история открытия. Самопроизвольная репликация последовательностей (3SR). Метод NASBA. Амплификация с вытеснением цепи (АВЦ, SDA). Метод с использованием QB-репликазы.

Тема 6. Детекция продуктов амплификации

практическое занятие (2 часа(ов)):

Детекция продуктов амплификации методом гель-электрофореза. Принципиальные отличия электрофореза нуклеиновых кислот от электрофореза белков. Применение агарозного геля и ПААГ при электрофорезе нуклеиновых кислот. Методы выделения плазмид и рестрикционных фрагментов нуклеиновых кислот из агарозного геля. Детекция продуктов амплификации гибридационно-ферментативным методом с измерением интенсивности окраски образовавшегося продукта колориметрическим, флуоресцентным или хемилюминесцентными методами. Метод лантаноидного иммунофлуоресцентного анализа. Детекция продуктов амплификации методом конъюгации с моноклональными антителами с выявлением количества ампликонов.

Тема 7. Методы идентификации определенных участков ДНК

практическое занятие (2 часа(ов)):

Гибридационный анализ. Гомологичная гибридизация в растворе и гетерогенная гибридизация на твердом носителе. Метод ?сэндвич?-гибридизации. Метод блот-гибридизации по Саузерну. Метод нозерн-блот-гибридизации (Northern-blot). Метод гибридизации in situ (FISH). Метод разветвленной ДНК (branch-DNA).

Тема 8. Методы направленного мутагенеза

практическое занятие (2 часа(ов)):

Получение делеций и вставок. Мутагенез с использованием олигонуклеотидов. ПЦР с перекрывающимися праймерами. Мегапраймеры в направленном мутагенезе. Методы введения случайных мутаций. Химический мутагенез.

Тема 9. Секвенирование нуклеиновых кислот

практическое занятие (2 часа(ов)):

Принципы методов секвенирования нуклеиновых кислот. Пиросеквенирование (секвенирование путем синтеза), Метод Сэнджера, метод Максама-Гильберта (химический метод). Принцип работы устройств для секвенирования ДНК, производительность.

Тема 10. Анализ генома, картирование

практическое занятие (4 часа(ов)):

Пульс-электрофорез: теория метода, инструментальный арсенал и области применения. Другие методы работы с большими молекулами. Рестрикционное картирование. Прыжки по хромосоме. Область применения метода. Стандартные библиотеки ?прыжков?. Типы ?прыжков. Принцип создания стандартных библиотек. Получение ДНК-фрагментов желаемого размера. Специфические библиотеки ?прыжков?. Библиотеки клонов-связок. Письменная работа по пройденному материалу.

4.3 Структура и содержание самостоятельной работы дисциплины (модуля)

N	Раздел Дисциплины	Семестр	Неделя семестра	Виды самостоятельной работы студентов	Трудоемкость (в часах)	Формы контроля самостоятельной работы
---	-------------------	---------	-----------------	---------------------------------------	------------------------	---------------------------------------

Тема 1.

Физико-химические свойства белков. Методы их выделения, очистки и анализа

презентации

N	Раздел Дисциплины	Семестр	Неделя семестра	Виды самостоятельной работы студентов	Трудоемкость (в часах)	Формы контроля самостоятельной работы
2.	Тема 2. Хроматография	2	2, 3	подготовка к письменной работе	4	письменная работа
				подготовка к презентации	4	презентация
3.	Тема 3. Свойства нуклеиновых кислот. Методы выделения нуклеиновых кислот из клеток	2	4	подготовка к презентации	4	презентация
4.	Тема 4. Методы амплификации нуклеиновых кислот	2	5	подготовка к презентации	4	презентация
5.	Тема 5. Модификации ПЦР. Лигазная цепная реакция (ЛЦР, LCR), метод транскрипционной амплификации (ТА, TAS)	2	6	подготовка к презентации	4	презентация
6.	Тема 6. Детекция продуктов амплификации	2	7	подготовка к презентации	4	презентация
7.	Тема 7. Методы идентификации определенных участков ДНК	2	8	подготовка к презентации	4	презентация
8.	Тема 8. Методы направленного мутагенеза	2	9	подготовка к презентации	4	презентация
9.	Тема 9. Секвенирование нуклеиновых кислот	2	10	подготовка к презентации	4	презентация
10.	Тема 10. Анализ генома, картирование	2	11, 12	подготовка к письменной работе	4	письменная работа
				подготовка к презентации	4	презентация
	Итого				48	

5. Образовательные технологии, включая интерактивные формы обучения

В процессе освоения дисциплины используются следующие образовательные технологии, способы и методы формирования компетенций: лекция-визуализация, проблемная лекция, дискуссия, практические занятия в форме проблемно-исследовательской беседы, на которых магистранты представляют самостоятельно подготовленные презентации по вопросам программы дисциплины, составление обзоров, написание письменных работ, проектные технологии, просмотр, анализ и обсуждение видео- и мультимедийных материалов.

6. Оценочные средства для текущего контроля успеваемости, промежуточной аттестации по итогам освоения дисциплины и учебно-методическое обеспечение самостоятельной работы студентов

Тема 1. Физико-химические свойства белков. Методы их выделения, очистки и анализа
презентация, примерные вопросы:

В презентации должны быть раскрыты следующие вопросы: Физико-химические свойства белков: форма, молекулярная масса, изоэлектрическая точка, растворимость. Методы выделения и очистки белков. Методы разрушения тканей для выделения белков. Механические, химические и ферментативные способы дезинтеграции биологических материалов. Гомогенизаторы Уоринга и другие ножевые гомогенизаторы при разрушении животных и растительных тканей. Гомогенизатор Поттера. Метод разрушения клеток при помощи стеклянных, металлических или пластмассовых шариков. Шаровые мельницы. Метод замораживания и оттаивания ткани. Разрушение клеток при помощи ультразвуковых дезинтеграторов. Ферментативные и химические методы разрушения клеток. Фракционирование биологических макромолекул при помощи сульфата аммония, спирта, ацетона, низкоскоростного центрифугирования. Ультрацентрифугирование. Разделение биополимеров при помощи ультрацентрифуги. Физические принципы, лежащие в основе метода ультрацентрифугирования. Устройство и скоростные параметры ультрацентрифуги. Типы ультрацентрифугирования. Микро- и ультрафильтрация, как метод концентрирования, разделения и очистки широкого спектра биологических и химических макромолекул. Типы фильтров. Устройство приборов для ультрафильтрации. Хроматография. Фракционирование макромолекул при помощи хроматографии. Хроматография как двухфазная система. Роль подвижной и неподвижной фазы. Динамическое равновесие при хроматографическом процессе. Количественные характеристики хроматографического процесса. Устройство хроматографических систем низкого и высокого давления. Электрофорез. Общие принципы метода, среда для проведения электрофореза, состав и типы гелей. Принципиальная схема прибора для проведения электрофореза. Физико-химические свойства макромолекул, влияющие на их разделение при электрофорезе. Электрофорез в нативных и денатурирующих условиях. Типы приборов для электрофореза белков. SDS-электрофорез белков в ПААГ. Концентрирующие и разделяющие гели. Применение градиентных и неградиентных разделяющих гелей. Детекция белков. Красители. Определение молекулярной массы белков. Вестерн-блот, как метод высокоспецифической детекции белков, способы иммунохимической и фото-проявки результатов. Изоэлектрофокусирование (ИЭФ). Принципы метода. Создание градиента pH. Амфолины и иммобилины. Параметры макромолекул, влияющие на разделение методом ИЭФ. Среды для проведения ИЭФ. Эндоосмос в агарозе. Кривые титрования макромолекул, полученные методом ИЭФ. Их физический смысл и применение. Приборы для ИЭФ. Препаративное и аналитическое изоэлектрофокусирование. Двумерный электрофорез. Задачи, решаемые методом двумерного электрофореза. Иммуноэлектрофорез. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). ИФА как метод детекции биологических макромолекул. Иммуноферментные конъюгаты. Ферменты и цветные реакции, применяемые для ИФА. Прямой и конкурентный ИФА. Применение ИФА для медицинско-диагностических целей.

Тема 2. Хроматография

письменная работа, примерные вопросы:

Примеры заданий письменной работы: 1. Адсорбционная хроматография 2. Аффинная хроматография 3. Высаливание 4. Гель-фильтрация 5. Изоэлектрофокусирование 6. Иммуноэлектрофорез 7. Ионообменная хроматография 8. Методы очистки белков от низкомолекулярных примесей 9. Методы разрушения тканей для выделения белков 10. Очистка белков избирательной денатурацией 11. Удаление из раствора небелковых веществ 12. Ультрацентрифугирование 13. Физические методы разрушения клеток для получения из них белков 14. Экстракция белков, связанных с мембранами, и разрушение олигомерных белков на протомеры 15. Электрофорез белков

презентация , примерные вопросы:

В презентациях должны быть раскрыты следующие вопросы: Гель-фильтрационная хроматография. Хроматографическое фракционирование макромолекул по размеру. Определение молекулярных масс белков методом гель-фильтрационной хроматографии. Адсорбционная хроматография. Типы физических взаимодействий, участвующие в процессе сорбции: дипольные взаимодействия, Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, водородные связи, ионные связи. Распределительная жидкостная колоночная хроматография. Разделение веществ по разнице в их растворимостях. Состав фаз при нормальнофазовой (НФХ) и обратнофазной (ХОФ) распределительных хроматографиях. Неподвижная жидкая фаза. Способы ее создания. Механизм регулирования хроматографического процесса при распределительной хроматографии. Гидрофобная хроматография. Разделение биологических макромолекул в результате различий в уровнях их гидрофобных взаимодействий с гидрофобными группами матрикса сорбента. Механизмы регулирования процессов сорбции и десорбции. Сорбенты для гидрофобной хроматографии. Ионообменная хроматография. Механизм сорбции. Ионогенные группы. Контрионы. Кривые титрования сильных и слабых ионообменников. Изоэлектрическая точка макромолекул. Выбор ионообменника. Ион-парная хроматография. Хроматофокусирование ? хроматографический метод разделения белков на основании различий в значениях pI . Особенности сорбентов для хроматофокусирования. Молекулярный механизм эффекта ?фокусирования? при хроматофокусировании. Аффинная хроматография. Адсорбция вещества на колонке за счет биоспецифического взаимодействия. Типы биоспецифических взаимодействий. Химические методы иммобилизации аффинных лигандов. Матрицы сорбентов для аффинной хроматографии. Управление процессами сорбции ? десорбции при аффинной хроматографии. Тонкослойная хроматография (ТСХ). Принципы метода. Экспресс-разделение биологических макромолекул. Оборудование и приборы для ТСХ.

Тема 3. Свойства нуклеиновых кислот. Методы выделения нуклеиновых кислот из клеток

презентация , примерные вопросы:

В презентации должны быть раскрыты следующие вопросы: Физические и химические свойства ДНК и РНК. Методы модификации нуклеиновых кислот, щелочной и кислотный гидролиз. Ферменты, используемые для работы с нуклеиновыми кислотами. Ферменты рестрикции и модификации нуклеиновых кислот. Субстратная специфичность по отношению к природным и модифицированным нуклеиновым кислотам. Рестриктазы - основной инструмент генной инженерии. Области практического использования молекулярно-биологических методов. Возможности методов. История развития этой области исследований. Основные направления ДНК-диагностики. Пробоподготовка. Основные приемы очистки нуклеиновых кислот. Современные методы для выделения ДНК (РНК) из клеток. Метод выделения ДНК одношаговый (РНК) с использованием ?Tri reagent?. Метод выделения ДНК (РНК) путем термического лизиса в присутствии сорбента. Метод выделения ДНК (РНК) с помощью фенольно-спиртовой депротенизации. Выделение ДНК (РНК) путем гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. Однопробирочный метод выделения ДНК (РНК) ? (лизирующий раствор, изопропанол, буфер). Метод экстракции ДНК с использованием набора ?DIAtom™ DNA Prep?. Метод выделения ДНК с применением набора ?ExtraGene? DNA Prep?. Метод сорбции на силикагеле. Метод выделения ДНК (РНК) на колонках со специальными фильтрами. Подготовка материала к амплификации по методу минипулов и концентрирование материала. Аппаратное обеспечение. Риболайзеры.

Тема 4. Методы амплификации нуклеиновых кислот

презентация , примерные вопросы:

В презентации должны быть раскрыты следующие вопросы: Общая характеристика методов амплификации нуклеиновых кислот. Подходы к классификации методов амплификации. Принципы технологии амплификации, ее этапы. Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Сущность метода. Необходимые реактивы (компоненты реакционной смеси) и оборудование. Праймеры. Таq-ДНК-полимеразы. Амплификатор (термо-циклер). Цикл амплификации, характеристика его этапов.

Тема 5. Модификации ПЦР. Лигазная цепная реакция (ЛЦР, LCR), метод транскрипционной амплификации (ТА, TAS)

презентация , примерные вопросы:

В презентации должны быть раскрыты следующие вопросы: ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR), Touchdown (Stepdown) ПЦР, ?Вложенная? ПЦР (Nested PCR), ?Инвертированная? ПЦР (Inverse PCR), Асимметричная ПЦР (Asymmetric PCR), Лонг-ПЦР (Long-PCR). LiPA-ПЦР. ПЦР in situ (PRIMS), мультиплексная ПЦР (multi-PCR). Количественная ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time PCR). Принцип метода, его возможности, история применения. Отличия от классической ПЦР. Модификации ПЦР в реальном времени. Лигазная цепная реакция (ЛЦР, LCR). Принцип метода, его возможности, история открытия. Модификации ЛЦР. Лигазная цепная реакция с заполнением бреши. Мультиплексная ЛЦР (multi-LCR). Метод транскрипционной амплификации (ТА, TAS). Принцип метода, его возможности, история открытия. Самопроизвольная репликация последовательностей (3SR). Метод NASBA. Амплификация с вытеснением цепи (АВЦ, SDA). Метод с использованием QВ-репликазы.

Тема 6. Детекция продуктов амплификации

презентация , примерные вопросы:

В презентации должны быть раскрыты следующие вопросы: Детекция продуктов амплификации методом гель-электрофореза. Принципиальные отличия электрофореза нуклеиновых кислот от электрофореза белков. Применение агарозного геля и ПААГ при электрофорезе нуклеиновых кислот. Методы выделения плазмид и рестрикционных фрагментов нуклеиновых кислот из агарозного геля. Детекция продуктов амплификации гибридационно-ферментативным методом с измерением интенсивности окраски образовавшегося продукта колориметрическим, флуоресцентным или хемилюминесцентными методами. Метод лантаноидного иммунофлуоресцентного анализа. Детекция продуктов амплификации методом конъюгации с моноклональными антителами с выявлением количества ампликонов.

Тема 7. Методы идентификации определенных участков ДНК

презентация , примерные вопросы:

В презентации должны быть раскрыты следующие вопросы: Гибридационный анализ. Гомологичная гибридизация в растворе и гетерогенная гибридизация на твердом носителе. Метод ?сэндвич?-гибридизации. Метод блот-гибридизации по Саузерну. Метод нозерн-блот-гибридизации (Northern-blot). Метод гибридизации in situ (FISH). Метод разветвленной ДНК (branch-DNA).

Тема 8. Методы направленного мутагенеза

презентация , примерные вопросы:

В презентации должны быть раскрыты следующие вопросы: Получение делеций и вставок. Мутагенез с использованием олигонуклеотидов. ПЦР с перекрывающимися праймерами. Мегапраймеры в направленном мутагенезе. Методы введения случайных мутаций. Химический мутагенез.

Тема 9. Секвенирование нуклеиновых кислот

презентация , примерные вопросы:

В презентации должны быть раскрыты следующие вопросы: Принципы методов секвенирования нуклеиновых кислот. Пиросеквенирование (секвенирование путем синтеза), Метод Сэнджера, метод Максама-Гильберта (химический метод). Принцип работы устройств для секвенирования ДНК, производительность.

Тема 10. Анализ генома, картирование

письменная работа , примерные вопросы:

Примеры вопросов письменной работы: 1. Когда и с какой целью применяют блот-гибридизацию по Саузерну и нозерн-блот-гибридизацию? 2. Какой метод детекции продуктов амплификации Вы считаете оптимальным? 3. Какой метод выделения ДНК лучше всего подходит для выделения ДНК из крови? 4. Что общего между всеми методами выделения нуклеиновых кислот из клеток? 5. Когда применяют метод дот-гибридизации и в чем его преимущества? 6. Каковы перспективы применения метода лантаноидного иммунофлуоресцентного анализа для детекции продуктов амплификации? 7. Чем ПЦР в реальном времени отличается от классической ПЦР? 8. Раскройте принцип транскрипционной амплификации? 9. В чем преимущество метода пульс-электрофореза? 10. В чем практический смысл направленного мутагенеза? 11. В чем сущность методов ?прогулки? и ?прыжков? по хромосоме? 12. Чем сходны и чем отличаются электрофорез нуклеиновых кислот и электрофорез белков?

презентация, примерные вопросы:

В презентации должны быть раскрыты следующие вопросы: Пульс-электрофорез: теория метода, инструментальный арсенал и области применения. Другие методы работы с большими молекулами. Рестрикционное картирование. Прыжки по хромосоме. Область применения метода. Стандартные библиотеки ?прыжков?. Типы ?прыжков. Принцип создания стандартных библиотек. Получение ДНК-фрагментов желаемого размера. Специфические библиотеки ?прыжков?. Библиотеки клонов-связок. Контрольная работа по пройденному материалу.

Тема . Итоговая форма контроля

Примерные вопросы к зачету:

1. Адсорбционная хроматография.
2. Амплификация с вытеснением цепи.
3. Аффинная хроматография.
4. Вестерн-блот, как метод высокоспецифической детекции белков.
5. Гель-электрофоретическое фракционирования белков.
6. Гибридизация ДНК в растворе.
7. Гибридизация ДНК на твердом носителе.
8. Гнездная ПЦР.
9. Детекция продуктов амплификации гибридационно-ферментативным методом.
10. Детекция продуктов амплификации методом гель-электрофореза.
11. Детекция продуктов амплификации методом конъюгации с моноклональными антителами.
12. Детекция продуктов амплификации методом лантаноидного иммунофлуоресцентного анализа.
13. Ионообменная хроматография.
14. Классификации методов амплификации нуклеиновых кислот.
15. Лигазная цепная реакция. Модификации ЛЦР.
16. Лонг-ПЦР.
17. Материалы и оборудование, необходимые для выделения и очистки нуклеиновых кислот. Риболайзеры.
18. Материалы и оборудование, необходимые для ПЦР.
19. Метод "сэндвич"-гибридизации.
20. Метод NASBA: характеристика и область применения.
21. Метод блот-гибридизации по Саузерну.
22. Метод гибридазации in situ, FISH-гибридизация.
23. Метод нозерн-блот-гибридизации (Northern-blot).
24. Метод разветвленной ДНК (branch-DNA).
25. Метод с использованием QВ-репликазы.
26. Метод транскрипционной амплификации.

27. Методы направленного мутагенеза.
28. Модификации ПЦР в реальном времени.
29. Мультиплексная ПЦР.
30. Области практического использования молекулярно-биологических методов. Возможности молекулярно-биологических методов.
31. Обратно-транскрипционная ПЦР.
32. Общая характеристика методов амплификации нуклеиновых кислот.
33. Основные приемы очистки нуклеиновых кислот.
34. Пиросеквенирование (секвенирование путем синтеза).
35. Подготовка материала к амплификации по методу минипулов и концентрирование материала.
36. Прыжки по хромосоме.
37. Пульс-электрофорез: теория метода, инструментальный арсенал и области применения. Рестрикционное картирование.
38. ПЦР in situ.
39. ПЦР в реальном времени.
40. ПЦР как один из основных методов молекулярной биологии.
41. ПЦР как один из основных методов молекулярной биологии. Общая характеристика метода.
42. Самопроизвольная репликация последовательностей.
43. Секвенирование ДНК по методу Сэнджера.
44. Современные методы выделения белков из клеток.
45. Современные методы выделения нуклеиновых кислот из клеток.
46. Специфические и неспецифические библиотеки "прыжков", библиотеки клонов-связок.
47. Способы и подходы к оптимизации выхода ПЦР.
48. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).
49. Ферменты, используемые для работы с нуклеиновыми кислотами.
50. Цикл амплификации, характеристика его этапов.

7.1. Основная литература:

Геномика. Роль в медицине, Примроуз, Санди;Тваймен, Ричард;Королева, О. Н.;Свердлов, Е. Д.;Лимборская, С. А., 2008г.

Генетика, Граник, Владимир Григорьевич, 2011г.

Молекулярная микробиология, Брюханов, Андрей Леонидович;Рыбак, Константин Вячеславович;Нетрусов, Александр Иванович, 2012г.

Молекулярная биология, Спирин, Александр Сергеевич, 2011г.

Молекулярная биология клетки, Фаллер, Джеральд М.;Шилдс, Деннис, 2012г.

Идентификация микроорганизмов с помощью молекулярно-генетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рибосомной РНК, Соловьева, В. В.;Григорьева, Татьяна Владимировна;Ризванов, Альберт Анатольевич, 2011г.

1. Примроуз, С. Геномика. Роль в медицине [Электронный ресурс]/ С. Примроуз, Р. Тваймен. - 2-е изд. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2014. - 276 с. ЭБС "Лань" Режим доступа: <http://e.lanbook.com/view/book/50563/>

2. Молекулярная биология [Электронный ресурс] / Российская Академия наук; РАН. Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта. - М. : Наука. Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU. Режим доступа: <http://elibrary.ru/issues.asp?id=7903> (полнотекстовый доступ для журналов 2012-2013).

3. Микробиология [Электронный ресурс]/ М.: Наука. Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU - Режим доступа: <http://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1012638> (полнотекстовый доступ для журналов 2012-2013).

4. Иммунология. Практикум: учебное пособие / Под ред. Л.В. Ковальчука, Г.А. Игнатъевой, Л.В. Ганковской. 2012. - 176 с. ЭБС "Консультант студента"
<http://www.studmedlib.ru/ru/book/ISBN9785970421482.html>
2. Клиническая генетика : учебник / Н. П. Бочков, В. П. Пузырев, С. А. Смирнихина; Под ред. Н. П. Бочкова. - 4-е изд., доп. и перераб. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 592 с. ЭБС "Консультант студента". <http://www.studmedlib.ru/ru/book/ISBN9785970426760.html>.

7.2. Дополнительная литература:

- ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование, Иллариошкин, Сергей Николаевич, 2004г.
- Генетическая инженерия, Щелкунов, Сергей Николаевич, 2004г.
- Молекулярная биология клетки, Фаллер, Джеральд М.;Шилдс, Деннис;Збарский, И. Б., 2006г.
- Молекулярная биология, Коницев, Александр Сергеевич;Севастьянова, Галина Андреевна, 2005г.
- Молекулярная биология. Структура и функции белков, Степанов, Валентин Михайлович, 2005г.
- Клонирование, Корочкин, Леонид Иванович, 2006г.
- Век ДНК, Франк-Каменецкий, Максим Давидович, 2004г.
1. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение [Текст] / Глик Б., Дж. Пастернак. - Москва:Мир, 2002. - 589 с. - 25 экз. в НБЛ.
 2. Пособие по клинической биохимии: учебное пособие. Никулин Б.А. / Под ред. Л.В. Акуленко. 2007. - 256 с. ЭБС "Консультант студента" Режим доступа:
<http://www.studmedlib.ru/ru/book/ISBN9785970403587.html>.
 3. Глава 4: Биохимическая диагностика патологических процессов и наследственных заболеваний. В "Клиническая биохимия: учебное пособие". Бочков В.Н., Добровольский А.Б., Кушлинский Н.Е. и др. / Под ред. В.А. Ткачука. 3-е изд., испр. и доп. 2008. - 264 с. ЭБС "Консультант студента" Режим доступа:
<http://www.studmedlib.ru/ru/books/ISBN9785970407332.html>.

7.3. Интернет-ресурсы:

- База данных US National Library of Medicine National Institutes of Health - www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
- БД Sciencedirect, Elsevier TM - www.sciencedirect.com
- Биохимия: Учеб. для вузов, Под ред. Е.С. Северина., 2003. 779 с. - http://www.biochemistry.ru/biohimija_severina/B5873Content.html
- Колтовая Н.А. Практикум по молекулярной биологии [Электронный ресурс] - [Koltovaya_praktikum.pdf](http://www.koltovaya_praktikum.pdf)
- Перечень интернет-ресурсов по молекулярной биологии - <http://www.biochemweb.org/methods.shtml>
- Протоколы на англ. языке - www.protocol-online.org
- Протоколы на сайте molbiol - <http://molbiol.ru/protocol/>

8. Материально-техническое обеспечение дисциплины(модуля)

Освоение дисциплины "Специальный семинар: Основы молекулярно-биологического анализа" предполагает использование следующего материально-технического обеспечения:

Мультимедийная аудитория, вместимостью более 60 человек. Мультимедийная аудитория состоит из интегрированных инженерных систем с единой системой управления, оснащенная современными средствами воспроизведения и визуализации любой видео и аудио информации, получения и передачи электронных документов. Типовая комплектация мультимедийной аудитории состоит из: мультимедийного проектора, автоматизированного проекционного экрана, акустической системы, а также интерактивной трибуны преподавателя, включающей тач-скрин монитор с диагональю не менее 22 дюймов, персональный компьютер (с техническими характеристиками не ниже Intel Core i3-2100, DDR3 4096Mb, 500Gb), конференц-микрофон, беспроводной микрофон, блок управления оборудованием, интерфейсы подключения: USB, audio, HDMI. Интерактивная трибуна преподавателя является ключевым элементом управления, объединяющим все устройства в единую систему, и служит полноценным рабочим местом преподавателя. Преподаватель имеет возможность легко управлять всей системой, не отходя от трибуны, что позволяет проводить лекции, практические занятия, презентации, вебинары, конференции и другие виды аудиторной нагрузки обучающихся в удобной и доступной для них форме с применением современных интерактивных средств обучения, в том числе с использованием в процессе обучения всех корпоративных ресурсов. Мультимедийная аудитория также оснащена широкополосным доступом в сеть интернет. Компьютерное оборудование имеет соответствующее лицензионное программное обеспечение.

Учебно-методическая литература для данной дисциплины имеется в наличии в электронно-библиотечной системе "БиблиоРоссика", доступ к которой предоставлен студентам. В ЭБС "БиблиоРоссика" представлены коллекции актуальной научной и учебной литературы по гуманитарным наукам, включающие в себя публикации ведущих российских издательств гуманитарной литературы, издания на английском языке ведущих американских и европейских издательств, а также редкие и малотиражные издания российских региональных вузов. ЭБС "БиблиоРоссика" обеспечивает широкий законный доступ к необходимым для образовательного процесса изданиям с использованием инновационных технологий и соответствует всем требованиям федеральных государственных образовательных стандартов высшего профессионального образования (ФГОС ВПО) нового поколения.

Учебно-методическая литература для данной дисциплины имеется в наличии в электронно-библиотечной системе "Консультант студента", доступ к которой предоставлен студентам. Электронная библиотечная система "Консультант студента" предоставляет полнотекстовый доступ к современной учебной литературе по основным дисциплинам, изучаемым в медицинских вузах (представлены издания как чисто медицинского профиля, так и по естественным, точным и общественным наукам). ЭБС предоставляет вузу наиболее полные комплекты необходимой литературы в соответствии с требованиями государственных образовательных стандартов с соблюдением авторских и смежных прав.

Для обеспечения преподавания дисциплины необходимы: мультимедийный проектор, колонки, принтер и ноутбук.

Программа составлена в соответствии с требованиями ФГОС ВПО и учебным планом по направлению 020400.68 "Биология" и магистерской программе Микробиология и вирусология .

Автор(ы):

Яруллина Д.Р. _____

"__" _____ 201__ г.

Рецензент(ы):

Зеленихин П.В. _____

"__" _____ 201__ г.