

**Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИМГ РАН)**

СОГЛАСОВАНО:

Ученый совет ИМГ РАН
Протокол №8 от «5» октября 2015 г.

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ИМГ РАН
чл.-корр. РАН

Уч. секретарь  к.б.н. Л.Е. Андреева

 С.В. Костров



 2015 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА

подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре.

Обязательная дисциплина Б1.В.ОД.2

Современные методы молекулярной биологии

Направление подготовки: 06.06.01 Биологические науки

Направленность (профиль) программы: 03.01.03 Молекулярная биология

Уровень высшего образования:

подготовка научно-педагогических кадров в аспирантуре

Квалификация выпускника: Исследователь. Преподаватель-исследователь.

Форма обучения: очная

Москва – 2015

Составитель: к.б.н., Ю.Я. Шевелев

Рабочая программа составлена на основании федерального государственного образовательного стандарта, разработанного для реализации основных профессиональных образовательных программ высшего образования - программ подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению подготовки кадров высшей квалификации 06.06.01 «Биологические науки».

Согласно Федеральному государственному образовательному стандарту высшего образования по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки (уровень подготовки кадров высшей квалификации), утвержденному приказом Минобрнауки РФ № 871 от 30 июля 2014 г., и учебному плану аспирантов, разработанному на основе этого стандарта, дисциплина «Современные методы молекулярной биологии» является второй обязательной учебной дисциплиной по вариативной части Блока 1 образовательной программы по направленности (профилю) 03.01.03 Молекулярная биология.

Объём курса составляет 7 зачетных единиц или 252 академических часа, из них 120 академических часов лекций, 30 академических часов практических занятий (семинаров), 30 академических часов практических лабораторных занятий, 68 академических часов самостоятельной внеаудиторной работы аспирантов, включая подготовку к зачету и 4 часа на контроль знаний.

I. Цели и задачи изучения дисциплины

Знание современных методов молекулярной биологии является фундаментом для работы молекулярного биолога и необходимо для формирования грамотного специалиста вне зависимости от того, в какой области молекулярной биологии он работает. В ходе изучения курса аспиранты получают фундаментальные знания в области современных методов молекулярной биологии, способов переноса и экспрессии генетической информации в разных типах клеток про- и эукариот, качественного и количественного анализа эффективности экспрессии рекомбинантных продуктов, а также значения и роли современных методов молекулярной биологии в изучении структуры и функционирования геномов, в том числе генома человека, ознакомление с практическим применением методов и подходов в различных областях молекулярной биологии.

1.1. Цель курса: освоение аспирантами фундаментальных знаний в области современных методов молекулярной биологии и способности их практического применения в научной деятельности.

1.2. Задачи курса: обучение аспирантов принципам и подходам, применяемым в различных областях молекулярной биологии.

1.3. Связь с другими дисциплинами: Дисциплина «Современные методы молекулярной биологии» имеет непосредственную связь практически со всеми дисциплинами, изучаемыми на протяжении всего времени овладения аспирантами образовательной программы по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки и является обязательной при подготовке специалистов в области молекулярной биологии.

II. Требования к уровню освоения дисциплины

В рамках данной дисциплины углубляются и развиваются следующие компетенции:
Универсальные компетенции:

- способность к критическому анализу и оценке современных научных достижений, генерированию новых идей при решении исследовательских и практических задач, в том числе в междисциплинарных областях (УК-1);
- способность проектировать и осуществлять комплексные исследования, в том числе междисциплинарные, на основе целостного системного научного мировоззрения с использованием знаний в области истории и философии науки (УК-2);
- готовность участвовать в работе российских и международных исследовательских коллективов по решению научных и научно-образовательных задач (УК-3);
- готовность использовать современные методы и технологии научной коммуникации на государственном и иностранном языках (УК-4);
- способность планировать и решать задачи собственного профессионального и личностного развития (УК-5);

Общепрофессиональные компетенции:

- способность самостоятельно осуществлять научно-исследовательскую деятельность в соответствующей профессиональной области с использованием современных методов исследования и информационно-коммуникационных технологий (ОПК-1);
- способность передавать методический и научно-исследовательский опыт в подготовке научно-педагогических кадров (ОПК-2);
- готовность к преподавательской деятельности по основным образовательным программам высшего образования (ОПК-3).

Профессиональные компетенции:

- способность к самостоятельному проведению научно-исследовательской работы и получению научных результатов, удовлетворяющих установленным требованиям к содержанию диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук по направленности (профилю) «Молекулярная биология» (ПК-1);
- обладание представлениями о фундаментальных основах биологических процессов, форм и методов научного познания (ПК-2);
- способность приобретать новые знания с использованием современных научных методов и владение ими на уровне, необходимом для решения задач, возникающих при профессиональной деятельности (ПК-3);
- обладание опытом профессионального участия в научных дискуссиях, способность проводить обработку и анализ научных результатов, обобщать в виде научных статей для ведущих профильных журналов (ПК-4);
- владение методами отбора материала, преподавания и основами управления процессом обучения фундаментальной биологии в школе и вузе (ПК-5).

В результате освоения дисциплины «Современные методы молекулярной биологии» обучающиеся должны

Знать:

- лексический минимум в объеме, необходимом для профессиональных устных и письменных коммуникаций и работы с информацией в области молекулярной биологии;
- место и роль принципов и методов молекулярной биологии в современных исследованиях физико-химических основ живых систем;
- особенности биологической формы организации материи, принципы воспроизводства и развития живых систем;
- современные представления об общности механизмов хранения, воспроизводства и передачи генетической информации у разных групп про- и эукариотических организмов;
- особенности организации генов и геномов в разных таксономических группах (бактерии, дрожжи, высшие растения, животные);
- перспективы использования современных методов молекулярной биологии в биомедицине;

- проблемы безопасности научных исследований в области молекулярной биологии.

Уметь:

- эффективно использовать в научных исследованиях теоретические положения и практический арсенал методов молекулярной биологии;
- планировать эксперименты по созданию рекомбинантных молекул ДНК и переносу генов в модельные организмы;
- анализировать, систематизировать и обобщать результаты собственных научных исследований с использованием методов молекулярной биологии и литературные данные.

Владеть:

- методологией выбора адекватных методов для исследований в области молекулярной биологии;
- планированием, постановкой и обработкой результатов экспериментов с использованием арсенала методов молекулярной биологии;
- навыками научного поиска и использования информационных источников (научная литература, базы данных, компьютерные программы и другие Интернет-ресурсы) для аналитического поиска в области исследований с использованием арсенала методов молекулярной биологии.

III Объём дисциплины и виды учебной работы

Форма обучения - ОЧНАЯ общий объём дисциплины: 7 зачётных единиц или 252 академических часа

Всего часов	Аудиторные занятия (час) в том числе:			Самостоятельная работа (час)	Контроль (час)
	Лекции	Практические занятия (семинары)	Лабораторные занятия		
252	54	54	50	90	4
	158				

Распределение аудиторных часов по темам и видам учебной работы

№	Наименование тем и разделов	Аудиторные занятия		
		лекции	семинары	Лабораторные занятия
1	Методы определения нуклеотидных последовательностей ДНК.	2	2	2
2	Методы количественной детекции нуклеиновых кислот.	4	4	2
3	Методы выделения плазмидной и геномной ДНК.	4	4	4
4	Центрифугирование.	2	2	2
5	Хроматография.	2	2	2
6	Спектроскопические методы.	2	2	2
7	Методы генетической инженерии.	4	4	4
8	Экспрессия эукариотических генов в клетках бактерий.	2	2	2
9	Методы перенесения ДНК в бактериальные и эукариотические клетки.	4	4	2
10	Нокаут и нокдаун генов в эукариотических клетках.	4	4	2
11	Методы разрушения клеток.	2	2	2

12	Методы очистки белков.	4	4	2
13	Методы исследования посттрансляционных модификаций белков.	2	2	2
14	Антитела.	2	2	2
15	Методы исследования ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействий.	2	2	2
16	Микроскопические методы изучения живой клетки.	2	2	4
17	Микрочипы.	2	2	2
18	Современные методы геномики.	4	4	4
19	Современные методы массированного определения нуклеотидной последовательности ДНК.	2	2	2
20	Современные методы протеомики.	2	2	4
	ВСЕГО(зач. ед.(часов))	158 часов		

IV. Содержание курса «Современные методы молекулярной биологии»

Раздел 1

Гибридизация нуклеиновых кислот. ДНК-зонды. Блоттинг, его виды. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК: метод Максама-Гилберта, метод Сэнгера, их модификации.

Раздел 2

Методы количественной детекции нуклеиновых кислот. Полимеразная цепная реакция. ОТ-ПЦР. Количественная ПЦР. Спектрофотометрические и флуорометрические методы определения концентрации нуклеиновых кислот.

Раздел 3

Методы выделения фаговой ДНК. Методы выделения плазмидной и геномной ДНК из клеток бактерий. Методы выделения геномной ДНК из эукариотических клеток. Методы выделения РНК.

Раздел 4

Дифференциальное центрифугирование. Центрифугирование в градиенте плотности. Методы получения ступенчатых и непрерывных градиентов плотности.

Раздел 5

Хроматография при низком давлении. Хроматография при высоком давлении. Гель-фильтрация. Адсорбционная хроматография. Ионообменная хроматография. Аффинная хроматография. Электрофорез. Изоэлектрическое фокусирование. Иммуноэлектрофорез.

Раздел 6

Спектр электромагнитного излучения, его основные характеристики и способы их выражения (длина волны, частота, волновое число, поток излучения, интенсивность). Ультрафиолетовая, видимая и инфракрасная области спектра. Классификация спектроскопических методов. Рентгеноструктурный анализ.

Раздел 7

Методы генетической инженерии: рекомбинантные ДНК. Ферменты генетической инженерии. Рестриктазы и их виды, свойства и особенности воздействия на ДНК. Клонирование ДНК. Плазмиды. Векторы для молекулярного клонирования.

Раздел 8

Методы исследования экспрессии эукариотических генов в клетках бактерий. Стабильность гибридных молекул ДНК в клетках бактерий. Направленный мутагенез молекул ДНК *in vitro*. Получение генов (кДНК) с использованием обратной транскрипции. Химико-ферментативный синтез генов.

Раздел 9

Методы перенесения ДНК в клетки бактерий и эукариот. Трансформация, трансфекция, трансдукция, конъюгация. Перенесение ДНК в клетки эукариот, стабильная и транзистентная экспрессия генов (Са-фосфатная трансфекция, электропорация, баллистическая трансфекция, микроинъекции). Репортерные гены. Векторы для встраивания чужеродной ДНК в геном млекопитающих и дрозофилы. Векторные системы на основе вирусов животных. Вирусы насекомых как векторы высокоэффективной экспрессии чужеродных белков. Векторная система на основе транспозонов эукариот. Противовирусные вакцины.

Раздел 10

Нокаут и нокдаун генов в эукариотических клетках. РНК-интерференция. Малые интерферирующие РНК (siRNA). Механизм образования siRNA. Подавление экспрессии генов с помощью РНК-интерференции (нокдаун генов). Векторы для РНК-интерференции. Особенности РНК-интерференции у разных организмов (растения, беспозвоночные, млекопитающие). Методы получения нокаута и нокдауна генов у млекопитающих. CRISPR-система и ее применение.

Раздел 11

Способы разрушения бактериальных и эукариотических клеток. Растворы, используемые для экстракции. Буферные растворы и специальные добавки. Оптимизация и осветление экстракта. Особенности приготовления экстрактов растительных и животных тканей и микроорганизмов.

Раздел 12

Принципы выделения, очистки и количественного определения белков. Критерии чистоты ферментных препаратов. Денатурация белков и полипептидов. Специфические методы очистки белков (хроматография, электрофорез белков, иммунопреципитация, выявление и картирование эпитопов с помощью моноклональных антител, ультрафильтрация,

избирательное осаждение, обратимая денатурация). Реакционная способность боковых цепей аминокислотных остатков в молекулах нативных и денатурированных белков.

Раздел 13

Методы исследования посттрансляционных модификаций аминокислотных остатков в молекулах белков (фосфорилирование, гликозилирование, гидроксилирование, сумаилирование, и др.).

Раздел 14

Реакции на чужеродные антигены, механизмы этих реакций, их проявление, течение в норме и при патологии. Методы исследования, основанные на этих реакциях. Иммуноферментный анализ. Получение антител с требуемой специфичностью. Пришивание фермента к антителам. Варианты методик ИФА.

Раздел 15

Методы исследования ДНК-белковых взаимодействий. Методы футпринтинга. Методы исследования белок-белковых взаимодействий. Вестерн-блоттинг. Коиммунопреципитация. Дрожжевая двугибридная система.

Раздел 16

Микроскопические методы изучения живой клетки. Флуоресцентная микроскопия. Источники света. Флуоресцентные фильтры. Детекторы. Конфокальный микроскоп. Цифровое изображение. Обработка и анализ изображения.

Раздел 17

Технология микрочипов. Принципы организации. ДНК-микрочипы, белковые микрочипы.

Раздел 18

Современные методы геномики: иммунопреципитация хроматина (X-ChIP), DamID, chromosome conformation capture (3C, Hi-C), RIP, CLIP, ChIA-PET, анализ в единичных клетках.

Раздел 19

Современные методы массированного определения нуклеотидной последовательности ДНК (NextGenerationSequencing): преимущества и недостатки разных технологических платформ.

Раздел 20

Современные методы протеомики. Хроматография, двумерный электрофорез. Методы масс-спектрометрии.

V. Самостоятельная работа

В процессе освоения предмета предусмотрено самостоятельное изучение отдельных вопросов лекционного курса в виде проработки лекционного материала и соответствующих разделов курса по учебникам.

VI. Итоговая проверка знаний

6.1. Форма итоговой проверки и оценки знаний

Учебный план по дисциплине «Современные методы молекулярной биологии», разработанный в соответствии с ФГОС высшего образования по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки (уровень подготовки кадров высшей квалификации), утвержденному приказом Минобрнауки РФ № 871 от 30 июля 2014 г., по направленности (профилю) программы 03.01.03 Молекулярная биология предусматривает контроль знаний в форме дифференцированного зачета с выставлением оценок в пятибалльной системе.

6.2. Вопросы для дифференцированного зачета

1. Рестриктазы и метилазы. Рестриктазы I, II и III типа. Участки узнавания и расщепления рестриктаз. Изоизомеры.
2. ДНК лигазы. ДНК-лигаза фага T4. ДНК-лигаза E. coli. Функции ДНК-лигаз in vivo. Использование в генетической инженерии.
3. ДНК-полимеразы. Свойства ДНК-полимераз. Применение в генетической инженерии.
4. Термостабильные ДНК-полимеразы. Полимеразная цепная реакция. Общие принципы и области применения.
5. Обратные транскриптазы (ревертазы). Синтез кДНК. Определение содержания мРНК с использованием ПЦР в режиме реального времени.
6. Секвенирование ДНК. Химический метод Максама-Гильберта. Энзиматический метод Сэнгера.
7. Сравнение разных технологий высокопродуктивного секвенирования ДНК.
8. Плазмидные векторы для бактерий, принципы организации, основные функциональные элементы, сферы применения.
9. Спектр электромагнитного излучения, его основные характеристики.
10. Векторы на основе бактериофагов (M13, лямбда). Космидные векторы. PAC- и BAC-векторы. Преимущества и недостатки разных типов клонирующих векторов.
11. Экспрессия чужеродных генов в бактериях. Продукция рекомбинантных белков. Секретия белков. Принципы выделения и очистки рекомбинантных белков.
12. Ретровирусные векторы. Lentивирусные векторы. Сравнение ретро- и лентивирусных векторов.
13. Направленное встраивание генов в геном. Позитивно-негативная селекция. Рекомбиназы и их использование для генетических манипуляций. Нокаут генов с использованием сайт-специфичной рекомбинации.
14. Генная терапия. Векторы для генотерапии. Векторы на основе ретровирусов, лентивирусов, аденовирусов. CRISPR-система и ее использование.
15. Нокдаун генов. РНК-интерференция. Малые интерферирующие РНК (siRNA). Механизм образования siRNA. Подавление экспрессии генов с помощью РНК-интерференции, его особенности у разных организмов.
16. Перенос ДНК в клетки бактерий и млекопитающих. Неспецифические методы введения ДНК (Са-фосфатная трансфекция, электропорация, микроинъекции). Стабильная и транзистная (временная) экспрессия генов в клетках млекопитающих. Репортерные гены.

17. Количественный анализ экспрессии генов. ОТ-ПЦР в режиме реального времени.
18. Методы исследования структуры хроматина (ChIP, DamID).
19. Методы выделения плазмидных и геномных ДНК из бактериальных и эукариотических клеток.
20. Методы хроматографического разделения макромолекул.
21. Фракционирование макромолекул методом центрифугирования.
22. Методы экстракции.
23. Методы исследования посттрансляционных модификаций белков.
24. Методы очистки белков.
25. Антитела, их использование в молекулярной биологии.
26. Методы исследования ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействий.
27. Современные методы протеомики.
28. Методы анализа транскриптома в единичных клетках.
29. Hi-C и ChIA-PET методы анализа пространственных взаимодействий белков.
30. Микрочипы, их применение в молекулярной биологии.
31. Микроскопические методы изучения живой клетки.

VII. Учебно-методическое обеспечение дисциплины

Рекомендуемая литература для освоения теоретического курса

Основная литература

1. Анализ генома. Методы. Под ред. К. Дейвиса. М.: Мир, 1990.
2. Клонирование ДНК. Методы. Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1988.
3. Green M.R., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Lab. Press, 2012.
4. Уилсон Д., Хант Т. Молекулярная биология клетки: Сборник задач. М., Мир, 1994.
5. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Новосибирск. Сибирское университетское изд-во. 2004.
6. Уилсон К., Уолкер Дж. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013.

Дополнительная литература

1. Льюин Б. Гены, IX. М., Бином, 2011.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. М., Мир, 2002.

Электронные ресурсы, включая доступ к базам данных и . т.д.

Информационные ресурсы: Научные журналы (Молекулярная биология, Биохимия, Acta Naturae, и др.), доступные через Internet научные журналы: <http://scitation.aip.org/>, <http://www.sciencemag.org/>, электронные конспекты лекций и презентации, разработанные для данного курса.

Доступные через Internet базы данных и биоинформационные программы: Pubmed – NCBI, OMIM – NCBI, UCSC Genome Browser