

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ГЕНА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИБГ РАН)

УТВЕРЖДАЮ

Директор

Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института биологии гена
Российской академии наук,
академик Георгиев П.Г.



« 5 » августа 2017 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

«Современные методы исследования в молекулярной биологии»

Для подготовки аспирантов по специальностям

03.01.07 «молекулярная генетика» и

03.01.03 «молекулярная биология»

Москва 2017

Рабочая программа дисциплины разработана в соответствии с федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования по направлению подготовки 06.06.01 – биологические науки (уровень подготовки кадров высшей квалификации) -Приказ Министерства образования и науки РФ от 30.07.2014 № 871,

Разработчики:

Зав. лабораторией регуляции экспрессии генов в развитии ИБГ РАН,

д.б.н., профессор РАН

Шидловский Ю.В.

С.н.с лаборатории структурно-функциональной организации хромосом ИБГ РАН

д.б.н.

Кантидзе О.Л.

Рецензент:

Директор ИБГ РАН,

академик

Георгиев П.Г.

Программа одобрена и принята на заседании Ученого совета ИБГ РАН от 3 октября 2017 г. Протокол № 5.

1. Цели и задачи освоения дисциплины

Цель и задачи дисциплины: приобретение современных знаний о методах исследования живой клетки. Курс должен подготовить слушателя к работе в научно-исследовательском учреждении.

2. Место дисциплины в структуре основной образовательной программы

Дисциплина «Современные методы исследования в молекулярной биологии» является дисциплиной по выбору и относится к вариативной части Блока 1 программы подготовки научно-педагогических кадров высшей квалификации (аспирантура) по направлению 06.06.01 - Биологические науки.

3. Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих компетенций:

- способностью 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, основанного на углубленном знании широкого круга биологических проблем и с использованием знаний в области истории и философии (УК-2)
- готовностью участвовать в работе российских и международных исследовательских коллективов по решению научных и научно-образовательных задач (УК-3);
- способность самостоятельно осуществлять научно-исследовательскую деятельность в соответствующей профессиональной области с

использованием современных методов исследования и информационно-коммуникационных технологий (ОПК-1);

- способность к самостоятельному проведению научно-исследовательской работы и получению научных результатов, удовлетворяющих установленным требованиям к содержанию диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук (ПК-1);

- владение современными информационными технологиями для решения задач в области молекулярной биологии/генетике, статистической обработке данных, поиску необходимой информации в мировых базах данных (ПК-2).

Аспирант, прошедший курс «Современные методы исследования в молекулярной биологии», должен осуществлять научную и профессиональную деятельность на основе полученной теоретической и практической подготовки.

В результате освоения дисциплины «Современные методы исследования в молекулярной биологии» обучающийся должен демонстрировать следующие результаты обучения:

знать:

- правила работы и техники безопасности в физических и химических лабораториях, с реактивами, приборами;

- общие представления о строении живых клеток, их строении и функции отдельных органелл клетки;

- свойства аминокислот, особенности первичной структуры белков, элементы вторичной структуры, свойства третичной структуры и белковых доменов;

- свойства нуклеотидов, особенности строения нуклеиновых кислот, хроматина;

- свойства липидов и биологических мембран.

уметь:

- проводить манипуляции при работе с основными приборами, используемыми в молекулярной биологии, и химическими реактивами;

- составить план исследования;

- интерпретировать полученные результаты.

владеть:

- преобразования информации: текстовые, графические редакторы; работы в сети Интернет для профессиональной деятельности;

- использования понятийного аппарата молекулярной биологии;

- предварительной оценки достоверности результатов на основе учета возможности артефактов.

4. Структура и содержание дисциплины «Современные методы исследования в молекулярной биологии»

Общая трудоемкость дисциплины составляет 6 зачетных единицы (216 академических часов). Данная дисциплина читается на 2 курсе 3 семестре, составляет 1.5 зачетных единицы (54 академических часа) и 4 семестре составляет 4.5 зачетных единицы (162 академических часа).

Таблица №1 Объем и образовательная структура дисциплины

№ п/п	Вид учебной работы	Всего часов	3 семестр	4 семестр
1	Общая трудоемкость	216 ч., 6 (ЗЕТ)	54 ч., 1.5(ЗЕТ)	162 ч., 4.5(ЗЕТ)
2	Аудиторные занятия, в том числе:	100	20	80
2.1	Лекции	50	10	40
2.2	Практические занятия	50	10	40
3	Самостоятельная работа	112	32	80
4	Итоговый контроль	4		
	Зачет		2	
	Зачет с оценкой			2

Таблица №2. Тематический план лекций, практических занятий и самостоятельной работы аспирантов **3 семестр.**

№	Наименование темы, раздела	Виды учебной работы, включая самостоятельную работу и трудоемкость в часах.
---	----------------------------	---

		Все го	Лк.	Пр. зан.	Сам. раб.
1	Биоинформатический анализ первичных последовательностей биомолекул.	5	1	1	3
2	Электрофоретический метод разделения биомолекул.	5	1	1	3
3	Методы детекции и измерения количества белков и нуклеиновых кислот	5	1	1	3
4	Методы исследования первичной структуры белков. Идентификация белков	5	1	1	3
5	Методы изучения пространственной структуры белков.	5	1	1	3
6	Синтетические олигонуклеотиды. Мутагенез.	6	1	1	4
7	Методы изучения полиморфизма генома	5	1	1	3
8	Микроорганизмы и плазмидные векторы для молекулярного клонирования.	5	1	1	3
9	Фаговые векторы. Векторы для клонирования больших фрагментов ДНК.	5	1	1	3
10	Эндонуклеазы рестрикции. Нуклеазы, используемые в генетической инженерии.	6	1	1	4
	Зачет	2			
	ИТОГО	54	10	10	32

Краткое содержание лекций и практических работ

Тема 1. Биоинформатический анализ первичных последовательностей биомолекул.

Анализ первичных последовательностей белков и нуклеиновых кислот, выравнивание последовательностей. Базы данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Идентификация генов в геноме. Аннотация генов. Построение филогенетических деревьев. Предсказание структуры белков. Каталогизация белков и их доменов.

Тема 2. Электрофоретический метод разделения биомолекул.

Принцип метода. Используемые гели, буфера. Электрофорез в нативных и денатурирующих условиях. Фиксация и окрашивание. Элюция из геля. Изоэлектрофокусирование, двумерный электрофорез. Пульс-электрофорез.

Тема 3. Методы детекции и измерения количества белков и нуклеиновых кислот.

Методы детекции и измерения количества белков и нуклеиновых кислот. Способы детекции белков в полиакриламидном геле (окрашивание анионными красителями Кумасси и амидовый черный, окрашивание серебром). Детекция белков на нитроцеллюлозной мембране (красители, авидин-биотиновый метод, иммуноокрашивание). Метод Брэдфорда. Детекция ДНК с помощью бромистого этидия. Спектрофотометрическая детекция, оценка чистоты ДНК и РНК. ПЦР-детекция.

Тема 4. Методы исследования первичной структуры белков. Идентификация белков.

Методы определения аминокислотного состава и первичной структуры белков. Реакции химической модификации функциональных групп аминокислот. Автоматическое секвенирование белков по Эдману.

Масс-спектрометрия белков, ее разновидности, использование в протеомике. Белковый фингерпринтинг. Изучение посттрансляционных модификаций.

Тема 5. Методы изучения пространственной структуры белков.

ЯМР. Рентгеноструктурный анализ. Криоэлектронная микроскопия. Локализация дисульфидных связей в белках. Методы изучения структуры белковых комплексов. Метод молекулярного моделирования.

Тема 6. Синтетические олигонуклеотиды. Мутагенез.

Синтез олигонуклеотидов. ДНК-микроматрицы (чипы), их применение. Морфолины. Аптамеры.

Способы введения мутаций в последовательность ДНК. Ненаправленный мутагенез. Сайт-направленный мутагенез. Получение делеций. Аланин-сканирующий мутагенез.

Тема 7. Методы изучения полиморфизма генома.

Методы изучения полиморфизма генома. Методы детекции SNPs: гибридизационные методы, детекция с помощью микрочипов, полиморфизм

длин рестрикционных фрагментов, ПЦР-методы, одноцепочечный конформационный полиморфизм (SSCP), электрофорез по градиенту температур (TGGE), плавление с высоким разрешением (HRM), масс-спектрометрия, секвенирование ДНК. Геномная дактилоскопия (ДНК-фингерпринтинг).

Тема 8. Микроорганизмы и плазмидные векторы для молекулярного клонирования.

Микроорганизмы, используемые в генетической инженерии. Типы векторов, используемых для клонирования. Основные компоненты вектора. Бело-голубая селекция. Введение чужеродной ДНК в клетку: химическая трансформация и электропорация. Отбор рекомбинантных клонов.

Тема 9. Фаговые векторы. Векторы для клонирования больших фрагментов ДНК.

Фаги λ и M13. Векторы на основе ДНК фага λ . Фагмиды, космиды, их емкость. Использование космид и векторов на основе хромосомы фага λ . Искусственные хромосомы ВАС и УАС. Их емкость и применение.

Тема 10. Эндонуклеазы рестрикции. Нуклеазы, используемые в генетической инженерии.

Ферменты рестрикции и модификации, распознаваемая последовательность нуклеотидов, специфичность, механизм действия. Ферменты рестрикции I и II типов. Метилазы. Прототипы, изошизомеры. Использование рестриктаз для физического картирования ДНК. Нуклеаза S1, ДНКаза I, экзонуклеаза III E.coli. РНКазы. РНКаза A, H.

Самостоятельная работа.

Изучение учебного материала, перенесенного с аудиторных занятий на самостоятельную проработку.

Таблица №3. Тематический план лекций, практических занятий и самостоятельной работы аспирантов **4 семестр.**

Краткое содержание лекций и практических работ

№	Наименование темы, раздела	Виды учебной работы, включая самостоятельную работу и трудоемкость в часах.			
		Все го	Лк.	Пр. Зан.	Сам. раб.
1	Ферменты, используемые в генетической инженерии (кроме нуклеаз).	7	2	2	3
2	Методы получения и анализа кДНК.	7	2	2	3
3	ДНК-библиотеки.	5	1	1	3
4	Блоттинг нуклеиновых кислот.	5	1	1	3
5	Методы анализа экспрессии генов.	7	2	2	3
6	Полимеразная цепная реакция (ПЦР).	7	2	2	3
7	Секвенирование ДНК классическим методом.	5	1	1	3
8	Высокопроизводительное секвенирование ДНК.	5	1	1	3
9	Методы экстракции биомолекул из тканей и клеток. Центрифугирование.	7	2	2	3
10	Антитела как инструмент молекулярной биологии.	7	2	2	3
11	Хроматографические методы разделения биологических молекул.	8	2	2	4
12	Методы локализации биомолекул.	5	1	1	3
13	Световая микроскопия.	5	1	1	3
14	Флуоресцентная микроскопия	5	1	1	3
15	Электронная микроскопия	5	1	1	3
16	Культуры клеток высших эукариот. Цитометрия.	7	2	2	3
17	ДНК-векторные системы высших эукариот	7	2	2	3
18	Трансгенез у животных	5	1	1	3
19	Методы регуляции экспрессии генов у высших эукариот	7	2	2	3
20	Методы изучения функций генов	5	1	1	3
21	Получение рекомбинантных белков в культуре клеток	8	2	2	4
22	Инженерия белков. Фаговый дисплей	5	1	1	3

23	Методы изучения белок-белковых взаимодействий. Дрожжевая двугибридная система	7	2	2	3
24	Методы изучения взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами <i>in vitro</i>	5	1	1	3
25	Методы изучения взаимодействий белков с нуклеиновыми кислотами <i>in vivo</i>	7	2	2	3
26	Использование радиоизотопов в молекулярной биологии	7	2	2	3
	Зачет	2			
	ИТОГО	162	40	40	80

Краткое содержание лекций и практических работ

Тема 1. Ферменты, используемые в генетической инженерии (кроме нуклеаз).

ДНК-полимеразы (ДНК-полимераза I и ее свойства), фрагмент Кленова. ДНК-лигазы. РНК-полимеразы (фагов T3, T7, SP6). Фосфатазы и киназы. Их свойства и специфичность действия. Использование щелочной фосфатазы и полинуклеотидкиназы при лигировании. Создание сайтов рестрикции на концах молекул ДНК с помощью линкеров, адапторов и ПЦР.

Тема 2. Методы получения и анализа кДНК.

Синтез кДНК обратной транскриптазой. Обратная транскрипция-ПЦР. Схема приготовления двухцепочечной кДНК. Приготовление кДНК по технологии SMART. Амплификация фрагментов кДНК, фланкирующих участок с известной последовательностью (RACE). RACE по технологии SMART. Step-Out PCR.

Тема 3. ДНК-библиотеки.

Представление о геномной и кДНК-библиотеках. Принципы их создания, представительность, методы скрининга. Виды геномных библиотек. Поиск клонов в геномной библиотеке. Контиги клонов. Принцип прогулки по геному. Вычитающая гибридизация.

Тема 4. Блоттинг нуклеиновых кислот.

Метод блот-гибридизации по Саузерну. Нозерн-блот-гибридизация. Мембраны для иммобилизации. Детекция нуклеиновых кислот на мембране. Задачи, в которых применяется блоттинг.

Тема 5. Методы анализа экспрессии генов.

Серийный анализ генной экспрессии (SAGE). Методы исследования экспрессии генов с помощью количественного ПЦР. «Нормировочные» гены. Использование чипов и микрочипов для анализа профилей экспрессии генов. EST-маркеры. Дифференциальный дисплей. Метод вычитающей гибридизации в анализе экспрессии генов.

Тема 6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

ПЦР. Основные компоненты ПЦР. Термостабильные ДНК-полимеразы. Типичная программа ПЦР. Температура отжига праймеров. Влияние различных компонентов на эффективность ПЦР. Специфичность ПЦР: ПЦР с «горячим стартом», Nested PCR, Step-out PCR. Методы детекции продукта ПЦР. ПЦР в реальном времени, методы детекции продукта ПЦР.

Тема 7. Секвенирование ДНК классическим методом.

Метод дидезокситерминаторов Сэнгера. Дидезоксинуклеотиды. Ферменты, используемые для секвенирования по методу Сэнгера. Автоматическое секвенирование. Длина чтения. Стратегия секвенирования больших геномов методом shotgun.

Тема 8. Высокопроизводительное секвенирование ДНК.

Создание библиотек, типы секвенирующих реакций (пиросеквенирование, секвенирование путем синтеза и лигирования), способы детекции продуктов реакции, обработка результатов. Сборка геномов de novo, аннотация генома.

Тема 9. Методы экстракции биомолекул из тканей и клеток.

Центрифугирование.

Методы разрушения клеток. Механические, химические и ферментативные способы дезинтеграции биологических материалов. Разделение клеточных органелл. Выделение ДНК, РНК и белков.

Низкоскоростное и ультрацентрифугирование. Константа седиментации. Типы ультрацентрифугирования: дифференциальное, зонально-скоростное и равновесное. Применение угловых, бакет- и зональных роторов.

Тема 10. Антитела как инструмент молекулярной биологии.

Получение антител. Антигенность, выбор эпитопа для получения антител. Поли- и моноклональные антитела. Изотипы антител. Иммуноблоттинг. Первичные и вторичные антитела. Иммунопреципитация. Мечение антител. Иммуноокрашивание. Иммуноферментный анализ.

Тема 11. Хроматографические методы разделения биологических молекул.

Параметры, по которым осуществляется разделение макромолекул при различных типах хроматографии: молекулярная масса, растворимость, адсорбционные характеристики, соотношение гидрофильных/гидрофобных участков, электрический заряд, характер и количество ионогенных групп, биоспецифические взаимодействия. Ионообменная, гидрофобная и аффинная жидкостная хроматография. Гель-фильтрация. Детекция веществ. Способы элюции. Основные сорбенты, используемые в хроматографии. FPLC. HPLC.

Тема 12. Методы локализации биомолекул.

In situ гибридизация. Политенные хромосомы насекомых. Иммуноцитохимический анализ. Мечение белков тагами. Анализ функций белков in vivo с помощью методов FRET и FRAP. Томография.

Тема 13. Световая микроскопия.

Приготовление препаратов. Метод светлого поля, метод темного поля, поляризационная микроскопия, метод фазового контраста, метод интерференционного контраста. Разрешающая способность метода.

Тема 14. Флуоресценция. Флуоресцентный микроскоп.

Флуоресцентные красители в молекулярных исследованиях. Использование флуоресцентных белков. Конфокальная микроскопия. Мультифотонная микроскопия. Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения.

Тема 15. Электронная микроскопия.

Просвечивающая электронная микроскопия. Сканирующая и атомно-силовая электронная микроскопия. Область применения. Приготовление образцов. Методы электронной микроскопии. Трехмерные реконструкции молекул. Использование меченых антител в электронной микроскопии.

Тема 16. Культуры клеток высших эукариот. Цитометрия.

Источники культур клеток. Первичные культуры. Культивирование клеток. Пассажиrowание клеток. Иммуортализация. Гибридомы. Проточная цитометрия. Измеряемые клеточные параметры. Сортировка клеток. Оценка пролиферативной активности культуры клеток. Оценка клеточного цикла. Оценка цитотоксичности.

Тема 17. ДНК-векторные системы высших эукариот.

Векторы на основе вирусов: вирус SV40, ретровирусы, аденовирусы, бакуловирусы. Векторы на основе транспозонов. Методы трансфекции. Селективные маркеры и гены-репортеры. Системы интеграции трансгенов у дрозофилы с использованием P-элемента, Cre-loxP-системы, ФС31-системы.

Тема 18. Трансгенез у животных.

Методы введения ДНК в клетки и получения линий трансгенных животных. Инъекция ДНК в зиготу. Получение эмбриональных стволовых клеток. Клонирование животных. Экспрессия генов в трансгенных животных. Тканеспецифичная экспрессия.

Тема 19. Методы регуляции экспрессии генов у высших эукариот.

Нокдаун гена. Использование РНК-интерференции для нокдауна. Нокаут гена в организме. Кондиционный нокаут. Таргетинг (замена) гена. Системы Cre-Lox, FLP-FRT. Трансгенные животные как система для изучения экспрессии генов млекопитающих. Система GAL4/UAS.

Тема 20. Методы изучения функций генов.

Предсказание структуры гена. Анализ функций методами биоинформатики по гомологии. Клонирование и экспрессия генов в

гетерологичных системах. Комплементация мутаций. РНК-интерференция. Нокаут, таргетинг и нокин генов. Анализ мутантных форм.

Тема 21. Получение рекомбинантных белков в культуре клеток.

Основные системы наработки рекомбинантных белков. Векторы для экспрессии генов в микроорганизмах. Бакуловирусная система экспрессии в клетках насекомых. Системы экспрессии в клетках млекопитающих. Используемые линии клеток (CHO, HEK, COS). Промоторы вирусов CMV, SV40. Факторы, влияющие на выход рекомбинантного белка: копияность гена, сила промотора, наличие регуляторных элементов, стабильность мРНК, частота использования кодонов, стабильность белка. Нарботка и очистка белка. Сигналы секреции.

Тема 22. Инженерия белков. Фаговый дисплей.

Методы рационального дизайна (rational design) и направленной эволюции белков. Получение мутантных белков методами сайт-специфического мутагенеза. Получение слитых белков. Синтез белка в бесклеточной системе. Принцип метода фагового дисплея.

Тема 23. Методы изучения белок-белковых взаимодействий. Дрожжевая двугибридная система.

Методы поиска белков, взаимодействующих с изучаемым. Соосаждение белков. Метод TAP. Аффинная очистка. Сшивка белков. Поверхностный плазмонный резонанс. Изотермическая калориметрия титрования. FRET. Белковая комплементация (protein-fragment complementation assay). Принцип метода двугибридной системы. Вариации метода. Ограничения в использовании. Применение.

Тема 24. Методы изучения взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами *in vitro*.

Метод задержки в геле (EMSA). Дрожжевая одно-гибридная система. Соосаждение белков и нуклеиновых кислот (Pull-down Assay). Анализ на микроматрицах. Метод SELEX.

Тема 25. Методы изучения взаимодействий белков с нуклеиновыми кислотами *in vivo*.

Поиск и изучение свойств регуляторных элементов ДНК. Репортерные гены. Анализ гиперчувствительности к ДНКазе I (DNase I footprinting).

Метод DamID. Метод хроматин-иммунопреципитации. Метод 3C и его модификации. Re-ChIP. ChIP-on-chip, ChIP-seq, ChIP-exo. РНК-иммунопреципитация. RIP-seq.

Тема 26. Использование радиоизотопов в молекулярной биологии.

Изотопы, используемые в исследованиях. Введение метки в состав белков, нуклеиновых кислот. Приготовление гибридных зондов (ник-трансляция, амплификация со случайного праймера, достраивание концов с помощью фрагмента Кленова). Детекция с помощью автордиографии, фосфоимиджера. Сцинтилляционные счетчики излучения.

Самостоятельная работа.

Изучение учебного материала, перенесенного с аудиторных занятий на самостоятельную проработку.

5. Фонд оценочных средств контроля успеваемости и промежуточной аттестации:

Фонд оценочных средств (см. Приложение 1)

6. Учебно-методическое и информационное обеспечение учебной дисциплины

Основная литература

1. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. - Изд. 4-ое, стереот. 3-му. - Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2010. - 514 с. : ил., табл., схем. - ISBN 978-5-379-01064-5 .(Университетская библиотека онлайн)
2. Bernard R. Glick, Jack J. Pasternak. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. ASM Press, 1020 p., 2010.(БЕИ РАН)

3. Применение современных молекулярно-биологических методов для поиска и клонирования полноразмерных нуклеотидных последовательностей к ДНК: учебное пособие / Д.В. Ребриков, Д.О. Коростин, В.Л. Ушаков и др. - М.: МИФИ, 2011. - 88 с. (Университетская библиотека онлайн)
4. Jeremy W. Dale, Malcolm von Schantz, Nicholas Plant. From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology (3rd Ed.). John Wiley & Sons, 408 p., 2012. (BOOKReader)
5. Конформационный анализ белков: теория и приложения / А.М. Андрианов ; под ред. Г.В. Малахова. - Минск : Белорусская наука, 2013. - 518 с. - ISBN 978-985-08-1529-3 ; (Университетская библиотека онлайн)
6. Кейт Уилсон, Джон Уолкер. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. Бином: Лаборатория знаний, 848 с., 2013 (БЕН РАН)
7. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение Б. Глик, Дж. Пастернак. М.: Мир, 589 с., 2002. (Национальная электронная библиотека)
8. NGS: высокопроизводительное секвенирование / Д.В. Ребриков, Д.О. Коростин, Е.С. Шубина, В.В. Ильинский ; под ред. Д.В. Ребриков. - Эл. изд. - М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. - 235 с.: ил. - Библиогр. в кн. - ISBN 978-5-9963-2415-6 ; (Университетская библиотека онлайн)
9. Методы генетических исследований микроорганизмов : учебное пособие / О. Давыдова ; ОГУ, 2013. - 132 с.; (Университетская библиотека онлайн)
10. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии ред. К. Уилсон, Дж. Уокер ; пер. с англ. Т. П. Мосоловой и Е. Ю. Бозелек-Решетняк ; под ред. А. В. Левашова, В. И. Тишкова : БИНОМ. Лаборатория знаний 2013 – 848 с. (Национальная электронная библиотека)

Дополнительная литература

1. Искусственные генетические системы. Т. 1: Генная и белковая инженерия. Патрушев Л. И.. М. Наука— 2004. — 526 с. (БЕН РАН)

2. Terry A. Brown. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction (6th Ed.). Wiley-Blackwell , 336 p., 2010.(БЕН РАН)
3. Общая и молекулярная генетика: учебное пособие / И.Ф. Жимулев ; отв. ред. Е.С. Беляева, А.П. Акифьев. - Изд. 4-е, стереотип. 3-му. - Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2007. - 480 с. (Университетская библиотека онлайн)
4. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. Кейт Уилсон, Джон Уолкер. Бином: Лаборатория знаний, 848 с., 2013. (БЕН РАН)
5. Gerald Karp. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments (7th Ed.). Wiley, 864 p., 2013. (БЕН РАН)
6. Richard J. Reece. Analysis of Genes and Genomes. John Wiley & Sons, 490 p., 2004. (БЕН РАН)
7. Основы генетической инженерии : Учеб. для биол. спец. вузов / Рыбчин В. Н. С.-Петерб. гос. техн. ун-т. — 2-е изд., перераб. и доп. — СПб.: Изд-во СПбГТУ, 1999. — 521 с. (БЕН РАН)
8. Основы биотехнологии: методические рекомендации / Г.П. Тихонов, И.А. Минаева ; - М.: Алтай : МГАВТ, 2009. - 133 с (Университетская библиотека онлайн)
9. C. Branden, J. Tooze. "Introduction to Protein Structure", 2-nd edition, Garland Publishing, 1999. (БЕН РАН)
10. "Биоорганическая химия» Овчинников Ю.А. , М.: Просвещение, 1984.- 205 с. (Национальная электронная библиотека)
11. J. Berg, J. Tomoczko, L. Stryer. "Biochemistry", 5-nd edition, International ed.,2002. (БЕН РАН)
12. H. Lodish et al. "Molecular and Cell Biology", Freeman and Company, 4-nd edition, 2000; 5-nd edition, 2003. (БЕН РАН)

7. Интернет-ресурсы для самостоятельной работы аспирантов

- <http://molbiol.edu.ru>

- <http://www.fhcrc.org/labs/gottschling>
- http://www.fhcrc.org/labs/breeden/Methods_BreedenLab.html
- <http://fcior.edu.ru/>
- <http://www.medbiol.ru/>
- <http://www.freesciencelectures.com/most-viewed-videos/>
- <http://biblioclub.ru>
- http://elibrary.ru/org_titles.asp
- <http://нэб.рф/>
- <http://www.benran.ru/>
- <http://www.rsl.ru/>
- <http://bio.fizteh.ru/student/files/biology/biolections/>
- <http://window.edu.ru/>
- <http://sbio.info>
- <http://meduniver.com/Medical/Book/>
- <http://www.molbiol.ru/review/>
- <http://www.membrana.ru/>
- <http://science.compulenta.ru/>
- <http://www.knigafund.ru/>
- <http://www.ribk.net>
- <http://www.bibliotech.ru>
- <http://bioword.narod.ru/>

8. Материально-техническое обеспечение дисциплины

Институт располагает материально-технической базой, соответствующей действующим санитарно-техническим нормам и обеспечивающей проведение всех видов теоретической и практической подготовки, предусмотренных учебным планом аспиранта.

При освоении дисциплины аспиранты обеспечены учебной аудиторией с интерактивной доской, переносным ноутбуком, мультимедийным проектором, доступом в интернет.

В профильных лабораториях (**Лаборатория молекулярной генетики-внутриклеточного транспорта, Лаборатория структурно-функциональной организации хромосом**) имеется следующее оборудование: Прибор для секвенирования, ДНА синтезатор, диагностическое мед. оборудование для хол. хром. белков, инвертированный микроскоп с объективами и фотокамерой. шейкер орбитальный, камеры КСО 2МЛЗ (6 шт) центрифуга MICROFUGE, компьютер Ноутбук Амплификатор ДНК, аппарат для выделения нуклеиновых кислот, весы TE153S "Сарториус, вортекс в комплекте, дезинтегратор ультразвуковой, инкубатор для гибридизации, камера для вертикального электрофореза(3шт) камеры для горизонтального электрофореза (5 шт), микроцентрифуги Вортекс "Микроспин», микроцентрифуги настольная MINISPIN, миксер с качающейся платформой, модуль для пульсфореза, РН-метр, система видеорегистрации гелей, система Мини Оптикон для ПЦР, спектрофотометры, сушка для гелей, термомиксер, термостат настольный, флюориметр (Стартовый набор Qudit starter kit {+4 RT}), центрифуги 5810R, центрифуги настольная MINISPIN, центрифуга для микропробирок MINISPIN, шейкер настольный с платформой, ячейка для электрофореза, компьютер PIRIT в комплекте, компьютер в комплекте Vox Dual Core, компьютеры ноутбук SONY, компьютер ноутбук Toshiba и др.

Для выполнения самостоятельной работы аспиранты используют персональные компьютеры, к которым они имеют доступ в пределах своей лаборатории (своего рабочего места). Аспиранты имеют свободный доступ в Библиотеку по естественным наукам РАН (БЕН РАН), а так же к электронным библиотекам.

Приложение 1

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ГЕНА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИБГ РАН)**

УТВЕРЖДАЮ

Директор

Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института биологии гена
Российской академии наук,
академик Георгиев П.Г.



« 5 » *сентябрь* 2017 г.

ФОНД ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

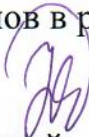
по дисциплине


«Современные методы исследования в молекулярной биологии»

Исследователь. Преподаватель-исследователь
Квалификация выпускника

Москва 2017

Составители ФОС по дисциплине:

Зав. лабораторией регуляции экспрессии генов в развитии ИБГ РАН,
д.б.н., профессор РАН  Шидловский Ю.В.

С.н.с лаборатории структурно-функциональной
организации хромосом ИБГ РАН
д.б.н.  Кантидзе О.Л.

Фонд оценочных средств по дисциплине утвержден на заседании Ученого
совета. Протокол заседания № 5 от 3 октября 2017 г.

**ПАСПОРТ
ФОНДА ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ
«Современные методы исследования в молекулярной биологии»**

наименование дисциплины

Направление подготовки 06.06.01 «Биологические науки»

3 семестр

№ п/п	Контролируемые разделы (темы дисциплины)	Код контролируемой компетенции или ее части	Наименование оценочного средства
1.	Биоинформатический анализ первичных последовательностей биомолекул.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование контроль по курсу-недифференцированный зачет (вопросы к зачету)
2.	Электрофоретический метод разделения биомолекул.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование контроль по курсу-недифференцированный зачет (вопросы к зачету)
3.	Методы детекции и измерения количества белков и нуклеиновых кислот	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование контроль по курсу-недифференцированный зачет (вопросы к зачету)
4.	Методы исследования первичной структуры белков. Идентификация белков	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование контроль по курсу-недифференцированный зачет (вопросы к зачету)
5.	Методы изучения пространственной структуры белков.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование контроль по курсу-недифференцированный зачет (вопросы к зачету)
6.	Синтетические олигонуклеотиды. Мутагенез.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование контроль по курсу-недифференцированный зачет (вопросы к зачету)
7.	Методы изучения полиморфизма генома	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование контроль по курсу-недифференцированный зачет (вопросы к зачету)
8.	Микроорганизмы и плазмидные векторы для молекулярного клонирования.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование контроль по курсу-недифференцированный зачет (вопросы к зачету)
9.	Фаговые векторы. Векторы для клонирования больших фрагментов ДНК.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование контроль по курсу-недифференцированный зачет (вопросы к зачету)
10.	Эндонуклеазы рестрикции. Нуклеазы, используемые в генетической инженерии.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование контроль по курсу-недифференцированный зачет (вопросы к зачету)

Оценочные средства для контроля компетенций

Текущий контроль успеваемости проводится в соответствии с Положением об аттестации аспирантов и соискателей (утвержденным Ученым советом протокол № 4 от 24 мая 2016 года).

Формы текущего контроля:

- собеседование;
- посещаемость занятий.

Проверка усвоения материала дисциплины осуществляется в форме текущего собеседования с аспирантами после каждого занятия.

Промежуточная аттестация по дисциплине осуществляется в форме зачета (не дифференцируемый зачет) в соответствии с Графиком учебного процесса. Оценивание обучающегося на промежуточной аттестации осуществляется с использованием нормативных на не дифференцируемом зачете: зачтено/(не зачтено).

Примерный список вопросов для проведения промежуточной аттестации:

1. Детекция белков на нитроцеллюлозной мембране (красители, авидин-биотиновый метод, иммуноокрашивание).
2. Анализ первичных последовательностей белков и нуклеиновых кислот, выравнивание последовательностей. Базы данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.
3. Рестрикции I и II типов. Метилазы. Изошизомеры.. Нуклеаза S1, ДНКаза I, экзонуклеаза III E.coli, РНКазы.
4. Методы исследования первичной структуры белков.
5. Электрофоретический метод разделения биомолекул.
6. Метод Брэдфорда. Детекция ДНК с помощью бромистого этидия.
7. Методы изучения структуры белковых комплексов. Метод молекулярного моделирования.

8. Искусственные хромосомы ВАС и УАС. Их емкость и применение.
9. последовательность нуклеотидов, специфичность, механизм действия.
10. Фаги λ и M13 . Векторы на основе ДНК фага λ . Использование космид и векторов на основе хромосомы фага λ .
11. Автоматическое секвенирование белков по Эдману. Изучение посттрансляционных модификаций.
12. Гибридизационные методы, детекция с помощью микрочипов, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.
13. Методы изучения полиморфизма генома.
14. Изоэлектрофокусирование, двумерный электрофорез. Пульс-электрофорез.
15. Плавление с высоким разрешением (HRM), масс-спектрометрия, секвенирование ДНК.
16. Ферменты рестрикции и модификации, распознаваемая 8) Методы детекции SNPs.
17. ЯМР. Рентгеноструктурный анализ. Криоэлектронная микроскопия 6) Микроорганизмы, используемые в генетической инженерии. Типы векторов, используемых для клонирования.
18. Идентификация генов в геноме. Аннотация генов. Построение филогенетических деревьев.
19. Методы детекции и измерения количества белков и нуклеиновых кислот.
20. Спектрофотометрическая детекция, оценка чистоты ДНК и РНК. ПЦР-детекция. Способы детекции белков в полиакриламидном геле (окрашивание анионными красителями Кумасси и амидовый черный, окрашивание серебром).
21. Масс-спектрометрия белков, ее разновидности, использование в протеомике. Белковый фингерпринтинг.

Оценивание аспиранта на промежуточной аттестации в форме зачета

Оценивание аспиранта на промежуточной аттестации в форме зачета	Требования к знаниям и критерии выставления оценок
<i>Зачтено</i>	Аспирант при ответе демонстрирует содержание тем учебной дисциплины, владеет основными понятиями, знает особенности молекулярных методов, используемых в молекулярной биологии и биотехнологии. Информирован и способен делать анализ проблем и намечать пути их решения.
<i>не зачтено</i>	Аспирант при ответе демонстрирует плохое знание значительной части основного материала в области молекулярных методов, используемых в молекулярной биологии и биотехнологии. Не информирован или слабо разбирается в проблемах, и или не в состоянии наметить пути их решения.

ПАСПОРТ
ФОНДА ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

«Современные методы исследования в молекулярной биологии»

наименование дисциплины

Направление подготовки 06.06.01 «Биологические науки»

4 семестр

№ п/п	Контролируемые разделы (темы дисциплины)	Код контролируемой компетенции или ее части	Наименование оценочного средства
11.	Ферменты, используемые в генетической инженерии (кроме нуклеаз).	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
12.	Методы получения и анализа кДНК.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
13.	ДНК-библиотеки.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
14.	Блоттинг нуклеиновых кислот.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
15.	Методы анализа экспрессии генов.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
16.	Полимеразная цепная реакция (ПЦР).	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
17.	Секвенирование ДНК классическим методом.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
18.	Высокопроизводительное секвенирование ДНК.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
19.	Методы экстракции биомолекул из тканей и клеток. Центрифугирование.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
20.	Антитела как инструмент молекулярной биологии.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
21.	Хроматографические методы разделения биологических молекул.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
22.	Методы локализации биомолекул.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
23.	Световая микроскопия.	УК-1,УК-2, УК-	Собеседование, контроль по

		3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
24.	Флуоресцентная микроскопия	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
25.	Электронная микроскопия	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
26.	Культуры клеток высших эукариот. Цитометрия.	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
27.	ДНК-векторные системы высших эукариот	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
28.	Трансгенез у животных	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)
29.	Методы регуляции экспрессии генов у высших эукариот	УК-1,УК-2, УК-3 ОПК-1 ПК-1, ПК-2	Собеседование, контроль по курсу- дифференцированный зачет (вопросы к зачету)

Оценочные средства для контроля компетенций

Формы текущего контроля:

- собеседование;
- посещаемость занятий.

Проверка усвоения материала дисциплины осуществляется в форме текущего собеседования с аспирантами после каждого занятия.

Промежуточная аттестация по дисциплине осуществляется в форме зачета с оценкой (дифференцируемый зачет) в соответствии с Графиком учебного процесса. Оценивание обучающегося на промежуточной аттестации осуществляется с использованием нормативных оценок на дифференцируемом зачете - по 4-х бальной системе: (зачтено - 5-отлично, 4-хорошо, 3-удовлетворительно, не зачтено - 2-не удовлетворительно).

Примерный список вопросов для проведения промежуточной аттестации:

1. Типы ультрацентрифугирования: дифференциальное, зонально-скоростное и равновесное.
2. Методы поиска белков. Соосаждение белков.

3. Методы исследования экспрессии генов с помощью количественного ПЦР.
4. Термостабильные ДНК-полимеразы. Температура отжига праймеров.
5. Конфокальная микроскопия. Мультифотонная микроскопия. Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения.
6. Фосфатазы и киназы. Их свойства и специфичность действия. Использование щелочной фосфатазы и полинуклеотидкиназы при лигировании.
7. Метод задержки в геле (EMSA). Дрожжевая одно-гибридная система.
8. Применение угловых, бакет- и зональных роторов.
9. Изотопы, используемые в исследованиях. Приготовление гибридных зондов (ник-трансляция, амплификация со случайного праймера, достраивание концов с помощью фрагмента Кленова).
10. Синтез кДНК обратной транскриптазой. Обратная транскрипция-ПЦР.
11. Способы детекции продуктов реакции, обработка результатов.
12. Специфичность ПЦР: ПЦР с «горячим стартом», Nested PCR, Step-out PCR.
13. Антитела как инструмент молекулярной биологии. Иммуноокрашивание. Иммуноферментный анализ.
14. ДНК-векторные системы высших эукариот. Векторы на основе вирусов.
15. Иммуноцитохимический анализ.
16. Клонирование и экспрессия генов в гетерологичных системах. Анализ функций методами биоинформатики по гомологии.
17. Комплементация мутаций. РНК-интерференция. Нокаут, таргетинг и нокин генов. Анализ мутантных форм.
18. ДНК-библиотеки. Виды геномных библиотек. Поиск клонов в

геномной библиотеке. Контиги клонов.

19. Метод светлого поля, метод темного поля, поляризационная микроскопия, метод фазового контраста, метод интерференционного контраста.

20. Свойства регуляторных элементов ДНК. Репортерные гены. Анализ гиперчувствительности к ДНКазе I (DNase I footprinting).

21. Методы детекции продукта ПЦР.

22. Методы изучения взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами *in vitro*. Анализ на микроматрицах. Метод SELEX.

23. Источники культур клеток. Первичные культуры. Культивирование клеток.

24. Ионообменная, гидрофобная и аффинная жидкостная хроматография. Гель-фильтрация. Детекция веществ.

25. Нозерн-блот-гибридизация. Мембраны для иммобилизации. Детекция нуклеиновых кислот на мембране.

26. Световая микроскопия 9Изотермическая калориметрия титрования. FRET. Белковая комплементация (protein-fragment complementation assay). Принцип метода двугибридной системы. Вариации метода. Ограничения в использовании. Применение.

27. Метод 3С и его модификации. Re-ChIP. ChIP-on-chip, ChIP-seq, ChIP-ехо. РНК-иммунопреципитация. RIP-seq.

28. ДНК-полимеразы (ДНК-полимераза I и ее свойства), фрагмент Кленова. ДНК-лигазы. РНК-полимеразы (фагов T3, T7, SP6).

29. Нокаун гена. Использование РНК-интерференции для нокауна. Нокаут гена в организме. Кондиционный нокаут.

30. Инженерия белков. Фаговый дисплей.

31. Флуоресцентные красители в молекулярных исследованиях.

32. Метод DamID. Метод хроматин-иммунопреципитации. RIP-seq.

33. Детекция с помощью автордиографии, фосфоимиджера. Сцинтилляционные счетчики излучения.

34. Просвечивающая электронная микроскопия. Сканирующая и атомно-силовая электронная микроскопия. Область применения.
35. Нарботка и очистка белка. Сигналы секреции.
36. Изотипы антител. Иммуноблотинг. Первичные и вторичные антитела. Иммунопреципитация. Мечение антител.
37. Метод дидезокситерминаторов Сэнгера. Ферменты, используемые для секвенирования по методу Сэнгера.
38. Проточная цитометрия. Измеряемые клеточные параметры. Сортировка клеток. Оценка пролиферативной активности культуры клеток.
39. Метод вычитающей гибридизации в анализе экспрессии генов.
40. Системы экспрессии в клетках млекопитающих. Используемые линии клеток (CHO, HEK, COS).
41. Электронная микроскопия.
42. Факторы, влияющие на выход рекомбинантного белка.
43. Высокопроизводительное секвенирование ДНК.
44. Методы экстракции биомолекул из тканей и клеток. Механические, химические и ферментативные способы дезинтеграции биологических материалов.
45. Таргетинг (замена) гена. Системы Cre-Lox, FLP-FRT. Трансгенные животные как система для изучения экспрессии генов млекопитающих.
46. Получение слитых белков. Синтез белка в бесклеточной системе. Принцип метода фагового дисплея.
47. Хроматографические методы разделения биологических молекул.
48. Представление о геномной и кДНК-библиотеках. Принцип прогулки по геному. Вычитающая гибридизация.
49. Блоттинг нуклеиновых кислот. Метод блот-гибридизации по Саузерну. Задачи, в которых применяется блоттинг.

50. Типы секвенирующих реакций (пиросеквенирование, секвенирование путем синтеза и лигирования).

Оценивание аспиранта на промежуточной аттестации в форме зачета с оценкой

Оценивание аспиранта на промежуточной аттестации Оценка	Требования к знаниям и критерии выставления оценок
2, неудовлетворительно	Аспирант при ответе демонстрирует плохое знание значительной части основного материала в области современной методологии молекулярной биологии. Не информирован или слабо разбирается в проблемах, и или не в состоянии наметить пути их решения.
3, удовлетворительно	Аспирант при ответе демонстрирует знания только основного материала в области молекулярных методов, допускает неточности, недостаточно правильные формулировки, нарушает логическую последовательность в изложении. Фрагментарно разбирается в проблемах, и не всегда в состоянии наметить пути их решения
4, хорошо	Аспирант при ответе демонстрирует хорошее владение и использование знаний в области молекулярных методов, твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, не допуская существенных неточностей в ответе на вопрос, правильно трактует теоретические положения. Достаточно уверенно разбирается в проблемах, но не всегда в состоянии наметить пути их решения.
5, отлично	Аспирант при ответе демонстрирует глубокое и прочное владение и использование знаний в области молекулярных методов, исчерпывающе, последовательно, четко и логически стройно его излагает его на зачете, умеет тесно увязывать теорию с практикой, свободно справляется с вопросами и другими видами применения знаний, причем не затрудняется с ответом, использует в ответе материал монографической литературы, правильно обосновывает принятое решение.