

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова»
ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ

ОДОБРЕНО
Учебно-методическим советом
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»
Минздрава России

Протокол № 1/2022
«25» января 2022 г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор Института медицинского
образования
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»
Минздрава России
Е.В. Пармон
«25» января 2022 г.

П.А. Бутылин, О.В. Калинина, Ю.И. Жиленкова

МЕТОДЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ ИЗУЧЕНИИ КЛЕТОЧНОЙ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

учебно-методическое пособие для обучающихся
к практическим и лабораторным занятиям, семинарам
по направлению подготовки 06.04.01 Биология (уровень магистратуры)
профиль: «Клеточная и молекулярная биология»

Санкт-Петербург
2022

УДК 576.3
ББК 28

Бутылин П.А., Калинина О.В., Жиленкова Ю.И. Методы, применяемые при изучении клеточной и молекулярной биологии: учебно-методическое пособие / П.А. Бутылин, О.В. Калинина, Ю.И. Жиленкова – СПб.: Издательство ... 2021. – 16 с.

Авторы:

Бутылин П.А. – доцент кафедры биологии ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, к.б.н.;

Калинина О.В. – декан факультета биомедицинских наук ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, д.б.н.

Жиленкова Ю.И. – доцент кафедры лабораторной медицины и генетики ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, к.м.н.;

Данное учебно-методическое пособие было разработано с учетом включения в учебный процесс не только фундаментальных знаний, но также результатов научных прорывных исследований и инновационных технологий в области молекулярной и клеточной биологии, молекулярной генетики и генной инженерии.

В учебно-методическом пособии отражен план занятий по дисциплине, который знакомит обучающихся с существующими методами анализа клеток и молекул. Формируя, таким образом, необходимые навыки, используемые в научно-исследовательской работе.

Пособие предназначено для обучающихся по направлению подготовки 06.04.01 Биология (уровень магистратуры) при изучении дисциплины Методы, применяемые при изучении клеточной и молекулярной биологии.

Обсуждено на заседании кафедры биологии
Института медицинского образования
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Практическое занятие №1. Культивирование клеток. Постоянные клеточные линии	7
Практическое занятие №2. Первичные клеточные культуры. Стволовые клетки	8
Практическое занятие №3. Методы выделения и анализа белка в клетке	10
Практическое занятие №4. Генетическая модификация. Методы доставки генетических конструкций	11
Практическое занятие №5. Выделение РНК и ДНК	12
Практическое занятие №6. Полимеразная цепная реакция. Подбор праймеров.....	13
Практическое занятие №7. Методы секвенирования нового поколения.....	14

ВВЕДЕНИЕ

Продолжительность изучения дисциплины Методы, применяемые при изучении клеточной и молекулярной биологии – 72 часа

Лекции – 8 часов

Практические занятия – 24 часа

Самостоятельная работа – 40 часов

Цель дисциплины: Формирование у обучающихся представление о разнообразии методов изучения живых систем на молекулярном и клеточном уровне. Демонстрация на практических примерах основных принципов, используемых в современной исследовательской биологии. Формирование умений и навыков в молекулярной и клеточной биологии, применяемых в общелабораторной практике в работе с биологическими объектами.

Задачи дисциплины:

1. Сформировать у обучающихся знания о методах, применяемых при изучении клеточной и молекулярной биологии.
2. Сформировать у обучающихся умение выбирать наиболее подходящий(ие) для решения конкретной задачи метод(ы) из группы методов клеточной и молекулярной биологии.
3. Сформировать у обучающихся навыки, необходимые для проведения методов, применяемых при изучении клеточной и молекулярной биологии.

Актуальность дисциплины: данный блок вносит вклад в формирование следующих компетенций: УК-1, ОПК-5, ПК-3, ПК-4, ПК-6.

Требования к результатам освоения блока:

Компетенция	Показатели достижения освоения компетенции	Индикатор
УК-1. Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, вырабатывать стратегию действий.	Знает: основные термины и понятия молекулярной и клеточной биологии, современные направления и методы изучения молекулярной и клеточной биологии.	УК-1.2. Формулирует цели и рассматривает различные варианты решения проблемной ситуации.
	Умеет: разбираться в специализированных источниках информации, выделять значимую информацию, необходимую для практического применения.	
ОПК-5. Способен участвовать в создании и реализации новых технологий в сфере профессиональной деятельности и контроле их экологической безопасности с использованием живых объектов.	Знает: Основные представления об уровнях биологической опасности. Основных классах патогенности микроорганизмов, различных вирусов, применяемых в биологических исследованиях и биотехнологии.	ОПК-5.2. Способен осуществлять контроль экологической безопасности с использованием живых объектов.
	Умеет: Определять необходимый уровень опасности при работе с тем или иным биологическим объектом. Способен осуществлять контроль за соблюдением необходимых норм.	
ПК-3. Способен планировать и реализовывать профессиональные	Знает: Основные методические подходы, а также технические требования и аппаратное сопровождение доступных методов изучения на уровне молекул, генов, клеток.	СПК-3.1 Способен генерировать методические решения в профессиональной области.

мероприятия в соответствии с профилем программы магистратуры.	Умеет: определять возможности и ограничения, а также технические требования для применения того или иного методического подхода. Определять применимость того или иного метода в данной конкретной задаче.	
ПК-4. Способен использовать знание нормативных документов, регламентирующих организацию проведения научно-исследовательских и лабораторных работ.	Знает: Технические требования, необходимую аппаратуру, требования к безопасному проведению лабораторных работ. Умеет: Осуществить выбор методов, применение которых соответствует уровню безопасности, оснащению и техническому регламенту лаборатории.	ПК-4.1. Осуществляет организацию и проведение исследований с учетом нормативных документов, регламентирующих организацию проведения лабораторных работ.
ПК-6. Способен выбирать адекватные методы решения и осуществлять научные исследования в области молекулярной биологии с использованием современных технологических решений.	Знает: Основные методы и подходы молекулярной и клеточной биологии, их ограничения и требования. Необходимые требования к аппаратуре для проведения исследования. Пределы точности и вариабельности отдельных методов. Умеет: Определять, какие методы будут наиболее адекватными для поставленной задачи, дадут меньшую вариабельность и обеспечат точную оценку результата. Умеет определять артефакты, связанные с тем или иным методом.	ПК-6.1. Выбирает метод исследования в соответствии с целью и задачами исследования.

Место проведения занятий и оснащение: учебные аудитории и лаборатории, мультимедийные презентации, интерактивная доска, учебно-методические материалы, лабораторная посуда и оборудование (чашки Петри, капилляры, 0,5 %-ный водный раствор CuSO_4 , кристаллы гексоцианоферрата (II) калия (ферроцианид калия, жёлтая кровяная соль), пробирки).

Междисциплинарные и внутридисциплинарные связи:

Для изучения данной учебной дисциплины необходимы знания, умения и навыки, формируемые предшествующими дисциплинами:

- 06.03.01 Биология (уровень бакалавриата);
- 19.03.01 Биотехнология (уровень бакалавриата).

В частности, для изучения данной дисциплины обучающимся необходимо предварительное освоение следующих дисциплин:

- Биология клетки.

Основная литература:

1. Клетки по Льюину/Л. Кассимерис [и др.] - М.: Лаборатория знаний, 2018. - Текст: электронный//URL: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785001015871.html>
2. Гистология, эмбриология, цитология: учебник/Данилов Р.К., Боровая Т.Г. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. - Текст: электронный//URL: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970453612.html>
3. Цитология и общая гистология: атлас/Банин В.В., Павлов А.В., Яцковский А.Н. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. - Текст: электронный//URL: <https://www.rosmedlib.ru/book/06-COS-2411.htm>
4. Краткий курс цитологии (клеточной биологии): Учебное пособие/Л.Г. Гарстукова, С.Л. Кузнецов. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2019. - Текст: электронный//URL: <https://www.medlib.ru/library/library/books/32246>

5. Биология. Т. 1.: учебник / под ред. Ярыгина В.Н. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2020. - Текст : электронный // URL : <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970453070.html>
6. Биология Т. 2.: учебник/под ред. В.Н. Ярыгина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. - Текст: электронный//URL: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970453087.html>
7. Медицинская биология и общая генетика: учебник/Р.Г. Заяц, В.Э. Бутвиловский, В.В. Давыдов, И.В. Рачковская - Минск: Выш. шк., 2017. - Текст: электронный//URL: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9789850628862.html>
8. Биохимия (общая, медицинская и фармакологическая): Курс лекций/Е.Г. Зезеров. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2019. - Текст: электронный//URL: <https://www.medlib.ru/library/library/books/34795>

Дополнительная литература:

1. Цитология. Функциональная ультраструктура клетки. Атлас/Банин В.В. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - Текст: электронный//URL: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970438916.html>
2. Биология: медицинская биология, генетика и паразитология: учебник для вузов/А.П. Пехов. - 3-е изд., стереотип. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - Текст: электронный // URL : <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970430729.html>
3. 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, 2015. - Текст: электронный//URL: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970435700.html>
4. Теория ошибок real-time ПЦР: руководство для врачей/Тимочко В. Р. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. - Текст: электронный//URL: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970446478.html>
5. Биохимические показатели в медицине и биологии/И.М. Рослый. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2015. - Текст: электронный//URL: <https://www.medlib.ru/library/library/books/2308>

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 1

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК. ПОСТОЯННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ

Цель: изучить основные методы работы с культурой эукариотических клеток и рассмотреть виды клеточных культур.

Мотивация: практическое занятие способствует формированию и закреплению практических умений у обучающихся в работе с клеточными культурами.

Продолжительность занятия: 4 академических часа

План занятия

1. Введение. Основные понятия: клеточная культура и её виды.
2. Оборудование, необходимое для работы с культурой эукариотических клеток, растворы и среды для культивирования.
3. Представление основных методов работы с культурой эукариотических клеток. Рутинная окраска клеток для лучшей их визуализации.

Основные понятия

Адгезионная (адгезивная) клеточная культура, клеткам которой для роста необходимо прикрепиться к поверхности лабораторной посуды (пластика) или друг к другу.

Внеклеточный матрикс – внеклеточное вещество, состоящее из **фибриллярных белков**: коллагена, фибронектина, эластина и **протеогликанов** с длинными полисахаридными ветвями (гликозаминогликанами), связывающих молекулы воды и образующих гидрогель.

Иммортализованная культура, клетки которой способны делиться без ограничения.

Клеточная культура – клетки в условиях *in vitro* (часто клетки многоклеточного организма, живущие и размножающиеся в искусственных условиях вне его).

Клеточный клон – культура однородных клеток с единым предком.

Клеточная линия – клеточная культура, состоящая из однородных клеток.

Основная литература:

1. Биология. Справочник [Электронный ресурс] / Чебышев Н.В., Гузикова Г.С., Лазарева Ю.Б., Ларина С.Н. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – Режим доступа : <http://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970418178.html>
2. Биология. Руководство к лабораторным занятиям [Электронный ресурс] : учеб. пособие / под ред. Н.В. Чебышева. - 2-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – Режим доступа : <http://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970434116.html>

Дополнительная литература:

1. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. К. Уилсон, Дж. Уолкер: Лаборатория знаний 2021. ISBN 978-5-00101-130-9

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 2

ПЕРВИЧНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ. СТЕЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Цель: изучить доступные источники первичных клеток человека, морфофункциональные характеристики стволовых клеток, их роль в биологических процессах организма.

Мотивация: формирование современных представлений о источниках стволовых клеток в организме животных и способы их получения.

Продолжительность занятия: 4 академических часа

План занятия

1. Первичные культуры клеток, критерии.
2. Стволовые клетки: определение, источники.
3. Среда для культивирования стволовых клеток.

Приборы, методы, подходы для получения и культивирования стволовых клеток.

Основные понятия

СК (SC-stem cells) – стволовые клетки.

ГСК (HSC) – гемопоэтические стволовые клетки.

МСК (MSC) – мезенхимальные стволовые клетки.

ЭСК (ESC) – эмбриональные стволовые клетки.

ИПСК (iPS) – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Тотипотентные СК – СК, способные давать целый организм (клетки эмбриона и внезародышевых структур).

Плюрипотентные СК могут давать клетки разных зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы), но не целый организм (не могут формировать внезародышевые структуры).

Мультипотентные СК могут давать несколько типов клеток одного зародышевого листка. Часто входят в состав одного органа или ткани.

Унипотентные СК могут давать клетки-потомки только одного типа (например, кератиноциты кожи).

Коммитирование – начальный этап направления клетки по определенному пути дифференцировки.

Спецификация/Детерминация – более поздний этап предопределения будущей дифференцировки клетки без ее видимых морфологических и биохимических проявлений.

Дифференцировка – окончательное превращение клетки, не выполняющей тканевых функций, в клетку определенной ткани, выполняющей конкретные функции (например, в сократимую мышечную клетку). Сопровождается выходом из клеточного цикла и экспрессией генов терминальной дифференцировки.

Контрольные вопросы

1. Что такое стволовая клетка? Каковы ее особенности?
2. Назовите виды стволовых клеток по потентности и приведите примеры.
3. Что такое ниша стволовых клеток? Каковы ее основные особенности?

Приведите примеры известных вам ниш.

4. Какие среды используют для культивирования стволовых клеток?
5. Каковы основные источники стволовых клеток?
6. Из каких источников можно получить культуру стволовых клеток?

Я
Р
Ы
Г
И
Н
В
.
-
М
.
[ht](#)
Г
Э
О
Т
А
Р
-
М
е
д
и
а
of
Si
2
0
1
И
.
V
[av](#)
Р
е
ж
и
м
д
о
с
т
у
п
а
Н
У
Р
Е

- Г
Э
О
Т
А
Р
-
М
е
д
и
а
of
Si
2
0
1
Н
.
Vo
[av](#)
Р
е
ж
и
м

ДОСТУПА НУРЕ

- ## ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 3
- ### МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА БЕЛКА В КЛЕТКЕ

Цель: изучить способы выделения и анализа белков в живых системах.

Мотивация: формирование представлений о методах и подходах к изучению белков.

Продолжительность занятия: 4 академических часа

План занятия

1. Выделение белка, основные техники. Источники белка. Требования к выделению белка.
2. Буферные системы, используемые при работе с белковыми растворами.
3. Методы анализа белка- электрофорез.
4. Методы анализа белка – вестерн-блоттинг
5. Другие методы анализа белков в клетке – спектроскопия.

Основные понятия

Буферный раствор – раствор, в котором значения Ph поддерживаются в нужном диапазоне за счёт ионного взаимодействия растворённых молекул.

Протеазы – ферменты, расщепляющие пептидную связь в белке.

Ингибиторы протеаз – химические ингибиторы протеаз, необходимые для получения стабильных белковых растворов из клеточных лизатов.

Электрофорез – метод разделения белков по величине заряда, что соответствует их молекулярному весу.

Акриламид – полимер, используемый для приготовления геля, в котором оценивается подвижность белков методом электрофореза.

Моноклональные антитела – антитела, полученные к специфическим эпитопам, используются для идентификации белков, в том числе при проведении Вестерн-блоттинга.

Да – дальтон, молекулярная единица массы, применяемая для оценки размеров молекул, в том числе белков.

Контрольные вопросы

1. Какие требования к буферным растворам, предназначенным для работы с белками? Назовите основные разновидности.
2. Каким образом можно различить белки в растворе.
3. Какими методами можно изучать первичную, вторичную, третичную, четвертичную структуры белка?

Основная литература:

1. Биология. Справочник [Электронный ресурс] / Чебышев Н.В., Гузикова Г.С., Лазарева Ю.Б., Ларина С.Н. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – Режим доступа : <http://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970418178.html>

2. Биология. Руководство к лабораторным занятиям [Электронный ресурс] : учеб. пособие / под ред. Н.В. Чебышева. - 2-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – Режим доступа : <http://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970434116.html>

Дополнительная литература:

1. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. К. Уилсон, Дж. Уолкер: Лаборатория знаний 2021. ISBN 978-5-00101-130-9

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 4 ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ. МЕТОДЫ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ

Цель: изучить способы модификации генетической информации живых организмов, способы доставки генетических конструкций, использование вирусов.

Мотивация: методы генетической модификации позволяют получать живые клетки с необходимыми свойствами, что может применяться в исследованиях и биотехнологии.

Продолжительность занятия: 4 академических часа

План занятия

1. Зачем нужно модифицировать геном? Флуоресцентные белки.
2. Плазмиды, их разновидности.
3. Методы доставки плазмид в клетку.
4. Вирусы, применяемые для генетической модификации.
5. Основные этапы получения вируса в лабораторных условиях.

Основные понятия

Флуоресцентные белки, например GFP, имеют эндогенную способность испускать свет в заданном спектре при облучении светом в чувствительном спектре. Такие белки, а также фьюжены этих белков с другими белками, используются для визуализации процессов, которые происходят в клетке.

Плазмиды – кольцевые бактериальные (в основном) генетические элементы, способные переносить генетическую информацию от клетки к клетке.

Шаттл-вектор – плазида, сконструированная таким образом, что может воспроизводиться в разных клетках. Например в бактерии (*E. coli*) и эукариотической клетке.

Электропорация – способ повысить проницаемость мембраны клетки путём пропускания электрического заряда. Используется для доставки плазмид в клетки.

Катионные растворители – способ повысить проницаемость мембраны за счёт изменения заряда на поверхности липидов. Используется для доставки плазмид в клетки. Пример: Липофектамин.

Ретровирус – семейство вирусов, чаще других используемое для направленной модификации геномов.

Лентивирус – модифицированный вирус иммунодефицита человека, используемый для модификации клеток в культуре.

Основная литература:

1. Биология. Справочник [Электронный ресурс] / Чебышев Н.В., Гузикова Г.С., Лазарева Ю.Б., Ларина С.Н. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – Режим доступа : <http://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970418178.html>
2. Биология. Руководство к лабораторным занятиям [Электронный ресурс] : учеб. пособие / под ред. Н.В. Чебышева. - 2-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – Режим доступа : <http://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970434116.html>

Дополнительная литература:

1. _____
Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. К. Уилсон, Дж. Уолкер: Лаборатория знаний 2021. ISBN 978-5-00101-130-9

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №5 ВЫДЕЛЕНИЕ РНК И ДНК

Цель: Изучить современные методы выделения ДНК и РНК из различных источников.

Мотивация: Изучить разные методы, с помощью которых можно выделять ДНК и РНК из тканей человека, животных, растений, из различных микроорганизмов для последующих исследований или модификации.

Продолжительность занятия: 4 академических часа

План занятия

1. Лабораторные методы получения ДНК.
2. Лабораторные методы выделения РНК
3. Работа с ДНК и РНК, основные требования к хранению и транспортировке.
4. Различные источники ДНК, получение ДНК из растений, микроорганизмов, палеообразов.

Основные понятия

SSC буфер (Цитратно-солевой раствор) применяется для гибридизации нуклеиновых кислот, в том числе в методе FISH.

EDTA (ЭДТА) – Этилендиаминтетрауксусная кислота – хелатирующий агент, связывающий ионы двухвалентных (преимущественно) металлов. Благодаря связыванию ионов кальция блокирует активность нуклеаз.

ТЕ-буфер – раствор, состоящий из ТРИС- буферной соли и ЭДТА. Применяется для хранения нуклеиновых кислот в чистом виде.

Контрольные вопросы

1. Какие требования к материалу в случае использования получения ДНК, РНК?
2. Какие принципы используют для выделения ДНК, РНК?
3. Методы оценки качества выделенной РНК, ДНК?
4. В чем особенности хранения, использования полученных растворов ДНК, РНК?
5. Какие подходы используют для получения ДНК из растений, дрожжей, бактерий?

Основная литература:

1. Биология. Справочник [Электронный ресурс] / Чебышев Н.В., Гузикова Г.С., Лазарева Ю.Б., Ларина С.Н. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – Режим доступа : <http://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970418178.html>
2. Биология. Руководство к лабораторным занятиям [Электронный ресурс] : учеб. пособие / под ред. Н.В. Чебышева. - 2-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – Режим доступа : <http://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970434116.html>

Дополнительная литература:

1. Ребриков Д.В., Савилова А.М., Саматов Г.А., Абрамов Д.Д., Трофимов Д.Ю., Кофиади И.А., Семенов П.А. ПЦР в реальном времени. Лаборатория знаний 2020. ISBN 978-5-00101-794-3 978-5-00101-794-3

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №6

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ. ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ

Цель: изучить общие принципы проведения полимеразной цепной реакции, рассмотреть использование основных реагентов в данном процессе, и обратить внимание на разновидность методов детекции амплифицируемых фрагментов.

Мотивация: практическое занятие способствует формированию и закреплению практических умений у обучающихся в работе с генетическим кодом и поиском корректных последовательностей олигонуклеотидов, необходимых для проведения полимеразной цепной реакции.

Продолжительность занятия: 2 академических часа

План занятия

1. История развития метода ПЦР.
2. Расходные материалы и оборудование для ПЦР.
3. Принцип полимеразной цепной реакции.
4. Контрольный опрос по текущему занятию.
5. Визуализация продуктов ПЦР. Электрофорез. ПЦР «в реальном времени».
6. Сферы, где применяется ПЦР.
7. Практическое задание, выполняемое на образовательном портале ИМО.

Контрольные вопросы

1. Общие принципы проведения полимеразной цепной реакции.
2. Отличия ПЦР «в реальном времени» от ПЦР.
3. Приведите примеры использования ПЦР в каких-нибудь сферах жизни.

Основные источники:

1. Панов А., Пташник О. (2017) 12 методов в картинках: полимеразная цепная реакция, Биомолекула. Available at: <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia>
2. Ребриков Д.В. (2015) ПЦР в реальном времени. М: БИНОМ. Available at: <https://glavkniga.su/filecont/49956.pdf>
3. Ткаченко А., Григорьев К. (2015) Онлайн-курс «Биотехнологии: генная инженерия». Россия: Stepik. Available at: <https://stepik.org/course/94>

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №7

МЕТОДЫ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Цель: изучить основные методы получения последовательности геномной ДНК. Обсудить последствия расшифровки генома человека и других животных в современной исследовательской практике.

Мотивация: способствует формированию представлений о методах получения первичной генетической информации, о роли секвенирования в современной практике, возможностях её использования.

Продолжительность занятия: 2 академических часа

План занятия

1. Секвенирование, секвенирование по Сэнгеру.
2. Этапы получения последовательности генома человека. Проект Геном человека.
3. Современные методы высокопроизводительного секвенирования.
4. Как использовать данные полногеномного секвенирования- базы данных, возможные области применения геномных данных.

Основные понятия

Секвенирование (от англ. sequence – последовательность) – получение первичной структуры (последовательности) биополимера. Чаще всего речь идёт о ДНК или РНК, также возможно отнести этот термин к получению последовательности аминокислот в полипептидной цепи.

Секвенирование по Сэнгеру – ферментативный метод (также метод обрыва цепи или дидезоксисеквенирование) был разработан Фредериком Сэнгером в 1977 году. Суть заключается в синтезе изучаемой цепи ДНК с остановкой синтеза на заданном основании путем присоединения дидезоксинуклеотида. Идет в несколько этапов:

1. Гибридизация участка ДНК с праймером – искусственно созданной последовательностью, комплементарной некоторому участку исходной ДНК;
2. Ферментативный синтез ДНК;
3. Денатурация, в результате которой образуются олигонуклеотидные последовательности разной длины, содержащие праймер;
4. Электрофорез в полиакриламидном геле.

Для проведения капиллярного электрофореза с детекцией флуоресцентного сигнала используются приборы, называемые полуавтоматические секвенаторы. Лучшие модели могут анализировать до 96 образцов одновременно.

Секвенирование нового поколения (Next Generation Sequencing) – группа методов высокопроизводительного секвенирования, позволяющая генерировать большие объёмы прочтений, при этом, зачастую, за счёт уменьшения точности и длины прочтений.

Условно подразделяется на второе и третье поколение. К секвенированию второго поколения относят платформу полупроводникового секвенирования (Ion Proton, Life science), секвенирования путём синтеза (Illumina-Solexa), также ряд других, менее распространённых платформ. К секвенированию третьего поколения можно отнести секвенирование с помощью искусственных мембранных пор (Oxford nanopore).

Секвенирование нового поколения применяется в следующих областях:

- Секвенирование генома de novo – расшифровка ранее неизученного генома. Используется в бактериологии, вирусологии и др.
- Полногеномное ресеквенирование.
- Направленное ресеквенирование генов, про которые известно, что наличие в них мутации приводит к развитию заболевания.

– Секвенирование РНК – проводится для оценки экспрессии генов. При этом можно оценивать как кодирующие, так и регуляторные РНК.

– Метагеномное секвенирование – позволяет определить состав организмов в исследуемом образце, например, в материале, взятом из кишечника или ротовой полости.

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH, от англ. fluorescence in-situ hybridization) – это один из актуальных методов диагностики хромосомных аномалий. Он основан на использовании ДНК-проб, меченных флуоресцентной меткой. ДНК-пробы представляют собой специально синтезированные фрагменты ДНК, последовательность которых комплементарна последовательности ДНК исследуемых aberrантных хромосом. Таким образом, ДНК-пробы различаются по составу: для определения разных хромосомных аномалий используются разные, специфические ДНК-пробы. ДНК-пробы также различаются по размеру: одни могут быть направлены к целой хромосоме, другие – к конкретному локусу.

В ходе процесса гибридизации при наличии в исследуемом образце aberrантных хромосом происходит их связывание с ДНК-пробой, которое при исследовании с помощью флуоресцентного микроскопа определяется как флуоресцентный сигнал (положительный результат FISH-теста). При отсутствии aberrантных хромосом несвязанные ДНК-пробы в ходе реакции "отмываются", что при исследовании с помощью флуоресцентного микроскопа определяется как отсутствие флуоресцентного сигнала (отрицательный результат FISH-теста). Метод позволяет оценить не только наличие флуоресцентного сигнала, но и его интенсивность и локализацию. Таким образом, FISH-тест – это не только качественный, но и количественный метод.

Основная литература:

1. Биология. В 2 т. Т. 2 [Электронный ресурс]: учебник / под ред. В. Н. Ярыгина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – ISBN 978-5-9704-3564-9. - Режим доступа: <http://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970435649.html>

Полезные ссылки:

1. Секвенирование Illumina <https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>
2. Видео о выделении ДНК, последующие видео знакомят с основными этапами проведения секвенирования с помощью чипов Иллюмина. <https://www.coursera.org/lecture/bioinformatika/znakomstvo-s-mietodami-vydielieniia ghenomnoi-dnk-genomic-dna-isolation-WChAS>

ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России		
Сертификат	01D9A9C6655B6ED0000BADF200060002	
Владелец	Пармон Елена Валерьевна	
Действителен	с 28.06.2023 по 28.06.2024	