Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Факультет почвоведения

УТВЕРЖДАЮ

и.о.декана П.В.Красильников /_____ /

«___» ___ _____20__ г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

Молекулярные методы в почвоведении

Уровень высшего образования:

Бакалавриат

Направление подготовки (специальность):

06.03.02 Почвоведение

Направленность (профиль) ОПОП:

Биология почв

Форма обучения: очная

Рабочая программа рассмотрена и одобрена учебно-методической комиссией факультета почвоведения (протокол №_____, дата _____)

Москва 2021

На обратной стороне титула:

Рабочая программа дисциплины разработана в соответствии с самостоятельно установленным МГУ образовательным стандартом (ОС МГУ) для реализуемых основных профессиональных образовательных программ высшего образования по направлению подготовки *06.03.02 «Почвоведение»*программы бакалавриата

ОС МГУ утвержден решением Ученого совета МГУ имени М.В. Ломоносова от *28 декабря* 2020 года (протокол *№7*).

1. **Место дисциплины в структуре ОПОП:**
Вариативной части, обязательная

2. **Входные требования для освоения дисциплины, предварительные условия:** общенаучные и общепрофессиональные дисциплины базовой части учебного плана бакалавра почвоведения, а также спецкурсы «Строение, развитие и систематика бактерий», «Биохимия почвенных микроорганизмов», «Физиология почвенных микроорганизмов».

3. **Планируемые результаты обучения в результате освоения дисциплины, соотнесенные с требуемыми компетенциями выпускников:**

Компетенции выпускников (коды)	**Индикаторы (показатели) достижения компетенций**	**Планируемые результаты обучения по дисциплине, сопряженные с компетенциями**
Б-СПК-1 Способен применять на практике теоретические основы фундаментальных и прикладных аспектов почвенной микробиологии	СПК-1.1 Использует в профессиональной деятельности знания теоретических основ фундаментальных аспектов почвенной микробиологии	Использовать в профессиональной деятельности знания теоретических основ фундаментальных аспектов молекулярно-биологических методов
	СПК-1.2 Использует в профессиональной деятельности знания прикладных аспектов почвенной микробиологии	Использовать в профессиональной деятельности знания прикладных аспектов молекулярной биологии
Б-СПК-4 Способен использовать знания о физиологических особенностях основных групп почвенных организмов и понимание их роли в биосферных процессах в профессиональной деятельности	СПК-4.2 Понимает роль почвенных организмов в биосферных процессах и использует эти знания в профессиональной деятельности	Понимать роль почвенных организмов в биосферных процессах и использовать эти знания в молекулярно-биологических исследованиях
Б-СПК-5 Способен использовать в профессиональной	СПК-5.1 Способен использовать в профессиональной	Использовать в профессиональной деятельности теорию и

деятельности теорию и навыки микробиологической работы, умеет анализировать научную литературу	деятельности теорию и навыки микробиологической работы, умеет анализировать научную литературу	навыки молекулярной биологии, умение анализировать научную литературу
Б-СПК-6 Способен использовать профессиональные знания и практические навыки при оценке качества природных объектов	СПК-6.1 Применяет профессиональные знания и практические навыки при оценке качества природных объектов	Применять профессиональные знания и практические навыки молекулярно-биологических исследований при оценке качества природных объектов

4. **Объем дисциплины**_____*2*_____з.е., в том числе _____*20*_____академических часа на контактную работу обучающихся с преподавателем, _____*52*_____академических часов на самостоятельную работу обучающихся.

5. **Формат обучения**_____*очный*

6. **Содержание дисциплины, структурированное по разделам и темам, с указанием отведенного на них количества академических часов, и виды учебных занятий**:

Наименование и краткое содержание разделов и тем дисциплины / форма текущей аттестации	**Всего (часы)**	В том числе						
		Контактная работа (работа во взаимодействии с преподавателем)					**Самостоятельная работа обучающегося**	
		Занятия лекционного типа	Занятия семинарского типа (семинары)	Занятия семинарского типа (лабораторные)	Занятия семинарского типа (практические)	**Всего**	Подбор и анализ литературы, подготовка презентаций и докладов	**Всего**
Вводные понятия	4	2				2	2	2
Выделение ДНК (РНК)	8	2				2	6	6
Амплификация специфических фрагментов ДНК	8	2				2	6	6
Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР). Применение ПЦР в различных отраслях	8	2				2	6	6
Детекция продуктов амплификации	6	2				2	4	4
Метод FISH	8	2				2	6	6
Секвенирование ДНК	6	2				2	4	4
Клонирование генов. Рестрикционный анализ	6	2				2	4	4

Понятие «функционального» гена	6	2				2	4		4
Геномика как комплексная наука, изучающая геномы	6	2				2	4		4
Форма текущей аттестации по разделу – доклады									
Промежуточная аттестация	*Зачёт*						6		
Итого:	72								

Подробное содержание разделов и тем дисциплины:

Вводные понятия

Общая характеристика и принадлежность молекулярно-биологических методов в биологии, экологии, медицине.

Выделение ДНК (РНК)

Получение биологических объектов для проведения молекулярных анализов. Методы выделения образцов тотальной ДНК из различных субстратов: растворы (вода), суспензии (почва), чистые культуры. Два основных подхода к выделению ДНК из почвы: 1) прямое выделение и 2) через стадию сбора микробной фракции. Недостатки (полнота извлечения нуклеиновых кислот из образца окружающей среды) и преимущества методов. Основные этапы: отделение клеток от почвенных частиц, лизис клеточного материала, удаление белковых и полисахаридных фракций, и получение раствора ДНК или РНК, свободной от ингибиторов и готовой для дальнейшей амплификации. Применяемые лизурующие буферы. Возможность применения различных kit-ов.

Амплификация специфических фрагментов ДНК

Накопление коротких специфических фрагментов ДНК в количестве, необходимом для их дальнейшей детекции.

Определение метода ПЦР

Метод, который перевернул современную молекулярную биологию. Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР). История возникновения ПЦР. Этапы ПЦР (денатурация, отжиг, синтез). Основные принципы и достоинства ПЦР. Компоненты реакции. Определение понятий «*праймеры*» и «*вырожденные праймеры*». На чем основывается специфичность метода ПЦР. Возможные ответы на вопрос «Почему не прошла ПЦР?» Подбор условий для ПЦР, подбор праймеров. Понятие «химерных» продуктов в реакции.

Разновидности ПЦР: вложенная ПЦР (Nested PCR), инвертированная ПЦР (Inverse PCR), асимметричная ПЦР (Asymmetric PCR), количественная ПЦР (Quantitative PCR, Q-PC), количественная ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time PCR), ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR, ОТ-ПЦР), Touchdown (Stepdown) ПЦР (Touchdown PCR), ПЦР с быстрой амплификацией концов (Rapid amplification of cDNA ends, RACE-PCR), ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR), RAPD PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA PCR, ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК.

Оборудование, позволяющее амплифицировать молекулу ДНК путем периодического охлаждения и нагревания. Результат циклического процесса —

экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК. Зависимость количества специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации от начального количество ДНК-мишеней и от числа циклов амплификации.

Понятие термина "эффект плато". Причины, определяющие выхода реакции на «плато».

Применение ПЦР в различных отраслях.

Использование ПЦР в микробиологии и медицине (клинической лабораторной диагностике при изучении вирусных (ВИЧ) и наследственных (мутаций) заболеваний, установление отцовства), криминалистике, в экологии и научных экспериментах.

Применение nested-PCR для выявления специфических компонентов сообщества. Последовательность реакций: *амплификация* и *реамплификация продукта* с помощью *видо- или группоспецифичных праймерных систем*. ПЦР с обратной транскриптазой (RT-PCR) для выявления метаболически активной части микробного сообщества.

Другие виды амплификации: лигазная цепная реакция (ЛЦР, LCR), NASBA (nucleic acid sequence-based amplification), детекция продуктов амплификации.

Открытие и определение явления электрофореза. Сущность метода и принципиальные моменты.

Виды электрофореза: зональный электрофорез (изотахофорез, электрофорез в геле, электрофорез белков, электрофорез нуклеиновых кислот); фронтальный электрофорез.

Возможность применения метода электрофореза в различных сферах деятельности, в общем, и в молекулярно-биологических методах, частности. ДНК-электрофорез.

Разделение смеси продуктов амплификации **методом электрофореза в геле**.

Визуализация фрагментов ДНК разной длины (молекулярной массы) при помощи красителей, специфично взаимодействующих с ДНК. Наиболее часто применяемые красители. Определение размеров ДНК цепей с использованием коммерчески доступных фрагментов ДНК (DNA ladder, "линейка"), содержащих линейные фрагменты ДНК известной длины.

Гели, наиболее часто используемые в ДНК электрофорезах.

Возможность применения цифровой фотограмметрическая обработка результатов гель-электрофореза (гель-документаторы).

Горизонтальный и вертикальный гель-электрофорез. Их отличия и сходства.

Основы метода денатурирующего градиентного гель-электрофореза (разделение продуктов не по размеру, а по степени прочности вторичной структуры, что отражает степень гомологии последовательностей гена рРНК исследуемого и референтного

штаммов). Зависимость между температурой плавления молекул ДНК и соотношением G-C и A-T пар нуклеотидов. Применение методов DGGE и TGGE для оценки доминирующих популяций в структуре сообщества. Сравнение двух методов: недостатки и преимущества. Использование универсальных и специфичных праймеров с целью выявления различий в структуре сообществ. Возможности повышения эффективности обнаружения мутаций методом DGGE (присоединение к концам амплифицированной геномной ДНК синтетических фрагментов GC-нуклеотидов – «зажимов»).

Метод гибридизационных зондов как еще один способ детекции продуктов амплификации. Гибридизация ДНК и ее практическое применение.

Метод FISH.

Использование метода в качестве количественной характеристики метаболически активных клеток в субстрате. Его недостатки и преимущества. Специфичность используемых зондов. Использование нескольких разных зондов или маркерных генов в качестве способа преодоления проблемы детекции при использовании метода FISH. Разновидности метода FISH (CISH, CARD-FISH). Ограничения метода in situ гибридизации.

Проблема контаминации. Устройство ПЦР лаборатории.

Секвенирование ДНК определение их первичной аминокислотной или нуклеотидной последовательности. Методы, применяемые для секвенирования (Эдмана, Сэнгера).
последовательности (от англ. sequence - последовательность). В результате получается линейное символьное описание, которое сжато резюмирует атомную структуру молекулы.

В методе секвенирования с использованием меченых флуоресцентной меткой или дидезоксинуклеотидов ПЦР является неотъемлемой частью, так как именно в ходе полимеризации в цепь ДНК встраиваются производные нуклеотидов, меченые флуоресцентной или радиоактивной меткой. Это останавливает реакцию, позволяя определить положения специфических нуклеотидов после разделения синтезированных цепочек в геле.

Клонирование генов организмов — это процесс выделения генов и, в результате получение большого количества продукта данного гена. ПЦР используется для того, чтобы амплифицировать ген, который затем вставляется в *вектор* — фрагмент ДНК, переносящий чужеродный ген в тот же самый или другой, удобный для выращивания, организм. В качестве векторов используют, например, плазмиды или вирусную ДНК. Вставку генов в чужеродный организм обычно используют для получения продукта этого гена — РНК или, чаще всего, белка. Таким образом, в промышленных количествах

получают многие белки для использования в сельском хозяйстве, медицине и др.

Ограничения метода клонирования

Рестрикционный анализ.

Исследование небольшого фрагмента генома. Выделение фрагментов с помощью ферментов – рестриктаз. Рестрикные карты. Принцип построения рестриктных карт.

Исследование детальной структуры сообществ микроорганизмов в окружающей среде может потребовать не только генетической характеристики сообществ по маркерным генам, но и дополнительной физиолого-биохимической характеристики обнаруженных штаммов, поскольку различия между штаммами могут заключаться не только в структуре определенного участка генома, но и в его функциях, точнее, в программе их реализации.

Понятие «функционального» гена.

Выделение генов, принимающих участие в реакциях углеродного и азотного циклов:

- отвечающих за процессы азотфиксации (nif*H)* и денитрификации (редуктазы),

- способных преобразовывать полимеры до мономеров (хитиназный, пектиназный, целлюлазный гены и др.)

Геномика как комплексная наука, изучающая геномы.

Разделы геномики (структурная, функциональная, сравнительная геномика);

Все эти разделы геномики вносят вклад в фундаментальную биологию (индивидуальное развитие, эволюция), здравоохранение, сельское хозяйство и биотехнологию. Итог структурной геномики. Метагеномика.

Что такое DNA Computing? Основная идея ДНК-вычислений. Перспективы ДНК-вычислений. Создание нано-биокомпьютера. Возможность определения полного генома человека.

7.**Фонд оценочных средствдля оценивания результатов обучения по дисциплине**:

7.1. **Типовые контрольные задания или иные материалы для проведения текущего контроля:**

7.1. Типовые контрольные задания или иные материалы для проведения текущего контроля успеваемости:

1. Объекты молекулярно-биологических методов (МБМ). Преимущества и недостатки;
2. Характеристика филогенетической структуры организмов;
3. Понятие доменов, филогенетических групп, семейств и т.д.;

4. Определение метода амплификации (ПЦР). Принцип полимеразно-цепной реакции. История возникновения ПЦР. Этапы ПЦР. Компоненты реакции;
5. Определение понятий «праймеры» и «вырожденные праймеры»;
6. На чем основывается специфичность метода ПЦР;
7. Детекция продуктов амплификации;
8. Разделение смеси продуктов амплификации методом электрофореза в геле;
9. Агарозный и полиакриламидный гели;
10. Визуализация фрагментов ДНК разной длины (молекулярной массы) при помощи флюоресцентных красителей.

7.2. Типовые контрольные задания или иные материалы для проведения промежуточной аттестации:

1. Наиболее часто применяемые красители. Определение размеров ДНК цепей;
2. Описание метода гибридизации клеток *in situ* (FISH);
3. Использование метода FISH в качестве количественной характеристики метаболически активных клеток в субстрате;
4. Недостатки и преимущества метода FISH. Специфичность используемых зондов;
5. Разновидности метода FISH (CISH, CARD-FISH);
6. Ограничения метода in situ гибридизации;
7. Секвенирование ДНК;
8. Цель секвенирования. Принципы методов Эдмана и Сэнгера;
9. Клонирование генов. Принцип метода, его использование и ограничения;
10. Понятие «функционального» гена;
11. Геномика как комплексная наука, изучающая геномы;
12. Метагеномика;
13. Разделы и задачи геномики.

8. **Шкала и критерии оценивания результатов обучения по дисциплине:**

В таблице представлена шкала оценивания результатов обучения по дисциплине. Уровень знаний обучающегося оценивается на "отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно".

Оценка "отлично" выставляется если обучающийся демонстрирует сформированные систематические знания, умения и навыки их практического использования. Оценка "хорошо" ставится, если при демонстрации знаний, умений и навыков студент допускает отдельные неточности (пробелы, ошибочные действия) непринципиального характера. При несистематических знаниях, демонстрации отдельных (но принципиально значимых

навыков) и затруднениях в демонстрации других навыков выставляется оценка «удовлетворительно». Оценка "неудовлетворительно" ставится, если знания и умения фрагментарны, а навыки отсутствуют.

ШКАЛА И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ результатов обучения (РО) по дисциплине				
Оценка РО и соответствующие виды оценочных средств	**2**	**3**	**4**	**5**
	незачёт	*зачёт*		
Знания *(виды оценочных средств: устные и письменные опросы, участие в дискуссиях)*	Отсутствие знаний	Фрагментарные знания	Общие, но не структурированные знания	Сформированные систематические знания
Умения *(виды оценочных средств: практические контрольные задания и защита полученных результатов, подготовка докладов, участие в дискуссиях)*	Отсутствие умений	В целом успешное, но не систематическое умение	В целом успешное, но содержащее отдельные пробелы умение (допускает неточности непринципиального характера)	Успешное и систематическое умение
Навыки (владения, опыт деятельности) *(виды оценочных средств: выполнение практических задач, связанных с идентификацией микроорганизмов)*	Отсутствие навыков (владений, опыта)	Наличие отдельных навыков (наличие фрагментарного опыта)	В целом, сформированные навыки (владения), но используемые не в активной форме	Сформированные навыки (владения), применяемые при решении задач

9. **Ресурсное обеспечение:**

- Перечень основной и дополнительной учебной литературы

1. Основная литература:
2. *Ребриков Д.В., Саматов Г.А. Трофимов Д.Ю. Семенов П.А., Савилов А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д.* ПЦР в реальном времени (под ред. Д.В. Ребрикова). М.: «БИНОМ. Лаборатория знаний». 2009

3. *Манучарова Н.А.* Гидролитические прокариотные комплексы наземных экосистем. М.: «Университетская книга». 2014
4. *Манучарова Н.А.* Молекулярно-биологические методы в почвоведении и экологии. М.: «Университетская книга». 2014

Дополнительная литература:

1. *Manucharova N.A.* Ecophysiology of hydrolytical microbial communities in terrestrial ecosystems. M.: «University book». 2014
2. *Панкратов Т.А., Белова С.Э., Дедыш С.Н.* Оценка филогенетического разнообразия прокариотных микроорганизмов в сфагновых болотах с использованием метода FISH. Микробиология. 2005. Т. 74. № 6. С. 831-837
3. Amann R.I., Krunholz L., Stahl D.A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 1990. V. 172 (2). P. 762-770. doi: 10.1128/jb.172.2.762-770.1990
4. *Amann R.I., Ludwig W.* Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. FEMS Microbiol. Reviews. 2000. V. 24(5). P. 555-65. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00557.x
5. *Pernthaler A., Pernthler J., Amann R.* Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. Applied and Enviromental Microbioligy. 2002. V. 68(6). P. 3094-3101. doi: 10.1128/AEM.68.6.3094-3101.2002

- Перечень профессиональных баз данных и информационных справочных систем
  - 1. http://www.mycobank.org/
  - 2. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
  - 3. http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/
  - 4. http://www.megasoftware.net/
  -
- Описание материально-технической базы
  1. Помещения – аудитория, рассчитанная на группу из 10-15 учащихся.
  2. Оборудование - мультимедийный проектор, компьютер, экран, выход в Интернет.

10. **Язык преподавания:**
Русский

11. **Преподаватель:**
Манучарова Наталия Александровна
Профессор кафедры биологии почв,
д.б.н. (2012, Д 501.002.13 МГУ)
Профессор (2019)

12. **Разработчик программы:**

Манучарова Наталия Александровна
Профессор кафедры биологии почв,
д.б.н. (2012, Д 501.002.13 МГУ)
Профессор (2019)

13. **Краткая аннотация дисциплины:**

Данный курс знакомит студентов с основными методами проведения молекулярно-генетических исследований микробных сообществ, студенты получают навыки работы с молекулярными методами для целей изучения почвенных микробных сообществ, приобретают опыт работы с нуклеотидными последовательностями. Рассматриваются методы выделения образцов ДНК из различных субстратов; принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР); разновидности ПЦР; использование ПЦР в микробиологии и медицине. Курс дает представление о сущности и принципиальных моментах метода электрофореза; недостатках и преимуществах метода FISH; принципах построения рестриктных карт; разделах геномики; методах, применяемых для секвенирования ДНК и клонирования генов. Студент получает способность проводить анализ молекулярно-генетических данных с целью таксономической оценки микробного населения почв.