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

Молекулярно-биологические методы в экологии

Уровень высшего образования:

Бакалавриат

Направление подготовки (специальность):

05.03.06 Экология и природопользование

Направленность (профиль) ОПОП:

Управление земельными ресурсами и биологический контроль окружающей среды

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 *05.03.06 Экология и природопользование* 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:** общепрофессиональные дисциплины базовой части программы бакалавра направления подготовки "Экология и природопользование" (1-7 семестры), а также – «Экология бактерий», «Экологическая микробиология», «Экологическая биохимия».

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-ПК-8. Способен квалифицированно применять современное аналитическое оборудование, приборы и инструменты в соответствии с профилем научно-исследовательской деятельности.	Б-ПК-8.1. Применяет современное аналитическое оборудование, приборы и инструменты в соответствии с профилем научно-исследовательской деятельности.	Применять современное аналитическое оборудование, приборы и инструменты в молекулярно-биологических исследованиях в экологии.
Б-СПК-5. Способен применять в профессиональной деятельности знания об особенностях химического состава, строении клеток и метаболизма прокариотных и эукариотных микроорганизмов.	Б-СПК-5.1. Применяет на практике знания об особенностях химического состава, строении клеток прокариотных и эукариотных микроорганизмов	Применять в практике молекулярно-биологических исследований знания об особенностях химического состава, строении клеток прокариотных и эукариотных микроорганизмов
Б-СПК-7. Способен использовать при решении практических задач знания и навыки по оценке качества природных объектов, выявлению продуцентов физиологически активных веществ, в том числе положительно влияющих на рост	Б-СПК-7.2. Использует в профессиональной деятельности знания и навыки по выявлению продуцентов физиологически активных веществ, в том числе положительно влияющих на рост растений.	Использовать при экологических молекулярно-биологических исследованиях знания и навыки по выявлению продуцентов физиологически активных веществ, в том числе положительно влияющих на рост растений.

растений.		

4. **Объем дисциплины** _____*3*_____ з.е., в том числе _____*27*_____ академических часа на контактную работу обучающихся с преподавателем, _____*81*_____ 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	10	2				2	8	8
Выделение ДНК	10	2				2	8	8
Амплификация специфических фрагментов ДНК	10	2				2	8	8
Электрофорез	13	2	2			4	9	9
Метод FISH (Fluorescent in situ hybridization)	15	2	4			6	9	9
Секвенирование ДНК	14	2	3			5	9	9
Клонирование генов	10	2				2	8	8
Понятие «функционального» гена	10	2				2	8	8

Рестрикционный анализ	10	2				2	8	8
Форма текущей аттестации по разделу – доклады								
Промежуточная аттестация	*Зачёт*						6	
Итого:	108							

Подробное содержание разделов и тем дисциплины:

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

Выделение ДНК. 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 лизирующие буферы. Возможность применения различных kit-ов.

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

Электрофорез. 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 флюоресцентных 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 (агарозные и полиакриламидные). Возможность применения цифровой фотограмметрической обработки 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 (Fluorescent in situ hybridization). 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.

Секвенирование ДНК. Определение нуклеотидной последовательности. Методы, применяемые для секвенирования (Эдмана, Сэнгера).

Клонирование генов – процесс выделения генов и, в результате генноинженерных манипуляций, получения большого количества продукта данного гена. Векторы – фрагмент ДНК, переносящие чужеродный ген в тот же самый или другой, удобный для выращивания, организм. Плазмиды или вирусная ДНК в качестве векторов. Ограничения метода клонирования.

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.)

Рестрикционный анализ. Исследование небольшого фрагмента генома. Выделение фрагментов с помощью ферментов – рестриктаз. Рестрикные карты. Принцип построения рестриктных карт. Геномика как комплексная наука, изучающая геномы. Разделы геномики (структурная, функциональная, сравнительная геномика). Итог структурной геномики. DNA Computing. Основная идея ДНК-вычислений. Перспективы ДНК-вычислений. Создание нано-биокомпьютера.

7.**Фонд оценочных средств для оценивания результатов обучения по дисциплине:**

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

Типовые контрольные задания или иные материалы для проведения текущей и промежуточной аттестации:

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

2. Получение биологических объектов для проведения молекулярных анализов.
3. Методы выделения образцов тотальной ДНК из различных субстратов.
4. Применяемые лизирующие буферы. Возможность применения различных kit-ов.
5. Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР).
6. Этапы ПЦР (денатурация, отжиг, синтез).
7. Основные принципы и достоинства ПЦР.
8. На чем основывается специфичность метода ПЦР?
9. Подбор условий для ПЦР, подбор праймеров.
10. Понятие «химерных» продуктов в реакции.
11. Вложенная ПЦР (Nested PCR).
12. Инвертированная ПЦР (Inverse PCR).
13. Асимметричная ПЦР (Asymmetric PCR).
14. Количественная ПЦР (Quantitative PCR, Q-PC).
15. Количественная ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time PCR).
16. ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR, ОТ-ПЦР).
17. Touchdown (Stepdown) ПЦР (Touchdown PCR).
18. ПЦР с быстрой амплификацией концов (Rapid amplification of cDNA ends, RACE-PCR).
19. ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR), RAPD PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA PCR.
20. ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК.
21. Оборудование, позволяющее амплифицировать молекулу ДНК путем периодического охлаждения и нагревания.
22. Применение ПЦР в различных отраслях.
23. Использование ПЦР в микробиологии и медицине, криминалистике, в экологии и научных экспериментах.
24. Применение nested-PCR для выявления специфических компонентов сообщества.
25. ПЦР с обратной транскриптазой (RT-PCR) для выявления метаболически активной части микробного сообщества.
26. Другие виды амплификации: лигазная цепная реакция, NASBA (nucleic acid sequence-based amplification), детекция продуктов амплификации.
27. Сущность метода электрофореза и принципиальные моменты.
28. Виды электрофореза: зональный электрофорез, фронтальный электрофорез.
29. Возможность применения метода электрофореза в различных сферах деятельности.

30. ДНК-электрофорез. Разделение смеси продуктов амплификации методом электрофореза в геле.
31. Визуализация фрагментов ДНК разной длины при помощи флюоресцентных красителей.
32. Определение размеров ДНК цепей с использованием коммерчески доступных фрагментов ДНК, содержащих линейные фрагменты ДНК известной длины.
33. Гели, наиболее часто используемые в ДНК электрофорезах.
34. Возможность применения цифровой фотограмметрическая обработка результатов гель-электрофореза.
35. Горизонтальный и вертикальный гель-электрофорез.
36. Основы метода денатурирующего градиентного гель-электрофореза.
37. Применение методов DGGE и TGGE для оценки доминирующих популяций в структуре сообщества.
38. Метод гибридизационных зондов как способ детекции продуктов амплификации.
39. Гибридизация ДНК и ее практическое применение.
40. Использование метода FISH в качестве количественной характеристики метаболически активных клеток в субстрате.
41. Использование нескольких разных зондов или маркерных генов в качестве способа преодоления проблемы детекции при использовании метода FISH.
42. Разновидности метода FISH (CISH, CARD-FISH).
43. Ограничения метода in situ гибридизации.
44. Секвенирование ДНК. Определение нуклеотидной последовательности.
45. Методы, применяемые для секвенирования (Эдмана, Сэнгера).
46. Плазмиды или вирусная ДНК в качестве векторов.
47. Ограничения метода клонирования.
48. Понятие «функционального» гена.
49. Выделение генов, принимающих участие в реакциях углеродного и азотного циклов.
50. Рестрикционный анализ. Исследование небольшого фрагмента генома.
51. Выделение фрагментов с помощью ферментов – рестриктаз.
52. Принцип построения рестриктных карт.
53. Разделы геномики (структурная, функциональная, сравнительная геномика). DNA Computing. Основная идея ДНК-вычислений.
54. Перспективы ДНК-вычислений.

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

Основная литература:

1. *Ребриков Д.В., Саматов Г.А. Трофимов Д.Ю. Семенов П.А.* и др. ПЦР в реальном времени. М.: «БИНОМ. Лаборатория знаний». 2009
2. *Манучарова Н.А.* Гидролитические прокариотные комплексы наземных экосистем. М.: «Университетская книга». 2014
3. *Манучарова Н.А.* Молекулярно-биологические методы в почвоведении и экологии. М.: «Университетская книга». 2014
4. *Manucharova N.A.* Ecophysiology of hydrolytical microbial communities in terrestrial ecosystems. M.: «University book». 2014

Дополнительная литература:

1. *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
2. *Amann R.I., Krunholz L., Stahl D.A.* Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. Bacteriol. 1990. V. 172 (2). P. 762-770. doi: 10.1128/jb.172.2.762-770.1990
3. *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
4. *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 лицензионного программного обеспечения
- 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:**
1. Манучарова Наталия Александровна
Профессор кафедры биологии почв,
д.б.н. (2012, Д 501.002.13 МГУ);
Профессор (2019)

12. **Разработчик программы:**
1. 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 экологическими аспектами применения молекулярных методов для исследования биологических объектов природных экосистем; экологическими вопросами определения биоразнообразия микробного прокариотного комплекса, находящегося в метаболически активном состоянии в исследуемых экосистемах; современными методами молекулярно-биологических исследований.