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

УТВЕРЖДАЮ

и.о. декана П.В.Красильников /_____ /

«___» _____20__ г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

Наименование дисциплины:

Молекулярно-биологические методы в экологии

Уровень высшего образования:

Магистратура

Направление подготовки (специальность):

05.04.06 Экология и природопользование

Направленность (профиль) ОПОП:

Экотехнологии

Форма обучения: очная

Москва 2023

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 05.04.06 «Экология и природопользование» программы магистратуры

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

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

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**
МПК-2 **МПК-3**	**МПК-2.1** **МПК-3.1**	Применять современное аналитическое оборудование, приборы и инструменты в молекулярно-биологических исследованиях в экологии. Применять в практике молекулярно-биологических исследований знания об особенностях химического состава, строении клеток прокариотных и эукариотных микроорганизмов. Использовать при экологических молекулярно-биологических исследованиях знания и навыки по выявлению продуцентов физиологически активных веществ, в том числе положительно влияющих на рост 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**:

6	**Всего (часы)**	В том числе						
		Контактная работа (работа во взаимодействии с преподавателем)					**Самостоятельная работа обучающегося**	
		Занятиялекционного 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 лизурующие 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 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.

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 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 (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 средствдля 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 лизурующие 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 навыкиотсутствуют.

ШКАЛА И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ результатов обучения (РО) по дисциплине				
Оценка РО и соответствующие виды оценочных средств	**2**	**3**	**4**	**5**
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 выделением и идентификацией дрожжей)*	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
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
3. Amann R.I., Ludwig W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. FEMS Microbiol. Reviews. 2000. V. 24
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.

- Перечень лицензионного программного обеспечения

- Переченьпрофессиональных 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 по специальности «Микробиология» (2019, Приказ Минобрнауки №839/нк-1)

12. **Разработчик программы:**
1. Манучарова Наталия Александровна
Профессор кафедры биологии почв,
д.б.н. (2012, Д 501.002.13 МГУ)
профессор по специальности «Микробиология» (2019, Приказ Минобрнауки №839/нк-1)

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.

.