

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «ВГУ»)

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой
медицинской биохимии и микробиологии



Т.Н.Попова

24.03.2023 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЫ

Б1.В.02 Молекулярные методы диагностики

1. Код и наименование направления подготовки/специальности:

060401 Биология

2. Профиль подготовки/специализации:

«Биофизика», «Биоресурсы», «Медико-биологические науки», «Генетика»

3. Квалификация выпускника: магистр биологии

4. Форма образования: Очная

5. Кафедра, отвечающая за реализацию дисциплины:

кафедра медицинской биохимии и микробиологии

6. Составители программы:

Сафонова О. А., к.б.н., доцент

Кирилова Е.М., к.б.н.

Крыльский Е.Д., к.б.н.

7. Рекомендована:

НМС медико-биологического факультета, протокол № 2 от 15.03.2023

8. Учебный год: 2023/2024

Семестр(ы)/Триместр(ы): 1

9. Цели и задачи учебной дисциплины:

Цель программы - научить магистранта применять при профессиональной деятельности методы молекулярной диагностики.

Задачи программы - обеспечить наличие у магистранта в результате курса:

- понимания принципов, лежащих в основе современных методов генодиагностики;
- умения осознанно выбирать наиболее адекватные поставленным задачами методы;
- знания о спектре возможностей каждого метода и способах его оптимизации в соответствии с задачей;
- сведений о наиболее значимых результатах, полученных с помощью данного метода.

10. Место учебной дисциплины в структуре ООП:

Учебная дисциплина «Молекулярные методы диагностики» относится к обязательным дисциплинам вариативной части Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.04.01 Биология (магистратура).

11. Планируемые результаты обучения по дисциплине/модулю (знания, умения, навыки), соотнесенные с планируемыми результатами освоения образовательной программы (компетенциями выпускников):

Код	Название компетенции	Код(ы)	Индикатор(ы)	Планируемые результаты обучения
ПК-1	Способен планировать работу и выбирать методы решения исследовательских задач адекватно поставленным целям с учетом широкого понимания профессиональной области и/или области обучения, в том числе на междисциплинарном уровне	ПК-1.1	Анализирует и обрабатывает информацию по тематике исследования в выбранной области наук, в том числе на междисциплинарном уровне	Знать: принципы, лежащие в основе современных методов генодиагностики Уметь применять при профессиональной деятельности методы молекулярной диагностики; осознанно выбирать наиболее адекватные поставленным задачами методы Владеть: данными о спектре возможностей каждого метода и способах его оптимизации в соответствии с задачей; сведениями о наиболее значимых результатах, полученных с помощью данного метода

12. Объем дисциплины в зачетных единицах/час.(в соответствии с учебным планом) — 2/72.

Форма промежуточной аттестации(зачет/экзамен) зачет.

13. Трудоемкость по видам учебной работы

Вид учебной работы	Трудоемкость			
	Всего	По семестрам		
		4 семестр	№ семестра	...
Аудиторные занятия	28	28		
в том числе:	лекции	14	14	
	практические			
	лабораторные	14	14	
Самостоятельная работа	44	44		
в том числе: курсовая работа (проект)				
Форма промежуточной аттестации (экзамен – __ час.)				
Итого:	72	72		

13.1. Содержание дисциплины

п/п	Наименование раздела дисциплины	Содержание раздела дисциплины	Реализация раздела дисциплины с помощью онлайн-курса, ЭУК*
1. Лекции			
1.1	Введение в молекулярные методы диагностики. Основы применения молекулярно-биологических методов в клинике.	Молекулярно-биологические методы в медицине. Клиническое применение результатов молекулярно-биологических исследований. Скрининг новорожденных. Уточнение диагноза. Мониторинг проводимого лечения. Контроль качества в молекулярной диагностике.	https://edu.vsu.ru/course/view.php?id=4046
1.2	Методы, основанные на использовании амплификации. Полимеразная цепная реакция. Лигазная цепная реакция.	Методы, использующие амплификацию. Полимеразная цепная реакция: принцип метода, этапы. Подготовка проб. Реактивы и приборы для амплификации. Проведение амплификации. Детекция результатов амплификации. Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Варианты стандартного метода – ПЦР гнездная; обратнотранскрипционная; in situ; мультиплексная. Методы предотвращения контаминации: соблюдение стерильности при пробоподготовке, разделение зон. Устройство ПЦР-лаборатории. Способы разрушения ампликонов после детекции. Лигазная цепная реакция. Метод, основанный на лигировании олигонуклеотидных зондов (ПЦР/ЛОЗ). Метод NASBA, преимущества перед традиционным методом, применение. Примеры практического использования методов амплификации. Использование полиморфных ДНК-маркеров (метод RAPD) для исследования различий между растительными культурами. Определение активности теломеразы. Создание и	https://edu.vsu.ru/course/view.php?id=4046

		применение биочипов.	
1.3	Применение молекулярных методов диагностики в медицине	Применение ПЦР-диагностики в различных областях медицины: гинекология, онкология, дерматология, неврология, фтизиатрия, гастроэнтерология, урология, стоматология, иммунология.	https://edu.vsu.ru/course/view.php?id=4046
1.4	Идентификация мутаций.	Идентификация мутаций. Применение методов первичной идентификации мутаций. Анализ конформационного полиморфизма однонитевой ДНК. Метод денатурирующего градиентного гелевого электрофореза. Метод гетеродуплексного анализа. Метод химического расщепления мест несоответствия. Секвенирование ДНК. Методы обнаружения известных мутаций: метод амплификации-рестрикции. Применение для диагностики серповидноклеточной анемии. ПЦР-опосредованный сайт-направленный мутагенез. Метод обнаружения мутаций в разных сайтах одного гена.	https://edu.vsu.ru/course/view.php?id=4046
1.5	Прикладные аспекты молекулярно-диагностических методов	Применение молекулярных методов для установления личности и установления родства. Анализ внутривидовых полиморфизмов. Фармакогенетика.	https://edu.vsu.ru/course/view.php?id=4046
2. Практические занятия			
3. Лабораторные работы			
3.1	Типы нуклеиновых кислот, особенности строения. Способы выделения ДНК и РНК. Использование электрофореза для анализа нуклеиновых кислот. Нуклеазы. Типы рестриктаз, применение.	Предмет, задачи и методы молекулярной диагностики. Объекты исследования. Генотипирование и фенотипирование. Типы молекулярно-биологических методов исследования. Основные направления их применения. Типы нуклеиновых кислот, особенности строения. Способы выделения ДНК и РНК. Количественное определение нуклеиновых кислот. Оценка чистоты препаратов. Использование электрофореза для анализа нуклеиновых кислот. Нуклеазы. Практическое применение РНКаз и их ингибиторов. Типы рестриктаз, применение.	https://edu.vsu.ru/course/view.php?id=4046
3.2	Гибридизационные методы.	Гибридизационные методы. Гомогенные и гетерогенные методы. Типы и получение зондов. Использование молекулярно-биотехнологических методов для получения зондов. Зонд-«маяк». Преимущества и недостатки гибридизации в растворе. Гибридизация на твердом носителе. Гибридизация in situ. Метод FISH. Виды блоттинга. Этапы блоттинга:	https://edu.vsu.ru/course/view.php?id=4046

		подготовка проб предгибридизация, гибридизация, детекция результатов. Виды меток. Способы мечения. Особенности ферментной метки. Виды субстратов для ферментов- меток. Сэндвич-гибридизация. Метод разветвленной ДНК. Использование мини- и микросателлитов в качестве зонда для ДНК-фингерпринтинга, применение для идентификации личности, в популяционной биологии, в программах, связанных с сохранением редких и исчезающих видов, в медицине.	
3.3	Микрочиповый анализ	Принципы микрочипового анализа. Типы микрочипов. Применение микрочипового анализа.	https://edu.vsu.ru/course/view.php?id=4046
3.4	Методы, основанные на использовании амплификации Полимеразная цепная реакция. Лигазная цепная реакция.	Выделение РНК. Оценка качества выделения, чистоты препарата и концентрации РНК. Проведение реакции обратной транскрипции. Постановка полимеразной цепной реакции в реальном времени.	https://edu.vsu.ru/course/view.php?id=4046

13.2. Темы (разделы) дисциплины и виды занятий

№ п/п	Наименование раздела дисциплины	Виды занятий (количество часов)				
		Лекции	Практи- ческие	Лабора- торные	Самостоя- тельная работа	Всего
1	Введение в молекулярные методы диагностики. Основы применения молекулярно-биологических методов в клинике.	2			4	6
2	Методы, основанные на использовании амплификации Полимеразная цепная реакция. Лигазная цепная реакция.	2		6	6	14
3	Применение молекулярных методов диагностики в медицине	2			4	6
4	Идентификация мутаций.	2			6	8
5	Прикладные аспекты молекулярно- диагностических методов	6		2	6	14
6	Типы нуклеиновых кислот, особенности строения. Способы выделения ДНК и РНК. Использование электрофореза для анализа нуклеиновых кислот. Нуклеазы. Типы рестриктаз, применение.			2	6	8
7	Гибридизационные методы.			2	6	8
8	Микрочиповый анализ			2	6	8
	Итого:	14		14	44	72

14. Методические указания для обучающихся по освоению дисциплины

(рекомендации обучающимся по освоению дисциплины: работа с конспектами лекций, презентационным материалом, выполнение практических заданий, тестов, заданий текущей аттестации и т.д.)

Студенты знакомятся с теоретическим материалом в процессе лекционного курса, самостоятельно прорабатывают и усваивают теоретические знания с использованием рекомендуемой учебной литературы, учебно-методических пособий, согласно указанному списку (п.15).

На практических занятиях обеспечивается формирование необходимых в рамках компетенции умений и навыков (владений). Изучение данной дисциплины предусматривает также самостоятельную работу. Выполнение самостоятельной работы предполагает: качественную подготовку ко всем видам учебных занятий; реферирование и аннотирование указанных преподавателем источников литературы; систематический просмотр периодических изданий с целью выявления публикаций в области изучаемой проблематики; изучение учебной литературы; использование интернет-ресурсов. В процессе самостоятельной подготовки при освоении дисциплины необходимо изучить основную литературу, затем – дополнительную. Именно знакомство с дополнительной литературой, значительная часть которой существует как в печатном, так и электронном виде, способствует более глубокому освоению изученного материала.

Текущая аттестация обеспечивает проверку освоения учебного материала, приобретения знаний, умений и навыков в процессе аудиторной и самостоятельной работы студентов, формирования профессиональных компетенций (ПК-1).

Формой промежуточной аттестации знаний, умений и навыков обучающихся является устный зачет.

Обучение лиц с ограниченными возможностями здоровья осуществляется с учетом их индивидуальных психофизических особенностей и в соответствии с индивидуальной программой реабилитации.

Промежуточная аттестация для лиц с нарушениями слуха проводится в письменной форме, при этом используются общие критерии оценивания. При необходимости, время подготовки на аттестации может быть увеличено.

Для лиц с нарушением зрения допускается аудиальное предоставление информации (например, с использованием программ-синтезаторов речи), а также использование на лекциях звукозаписывающих устройств (диктофонов и т.д.). На лекционных занятиях и лабораторных занятиях при необходимости допускается присутствие ассистента.

При проведении промежуточной аттестации для лиц с нарушением зрения тестирование может быть заменено на устное собеседование по вопросам. При необходимости, время подготовки на аттестации может быть увеличено.

Промежуточная аттестация для лиц с нарушениями опорно-двигательного аппарата проводится на общих основаниях, при необходимости процедура аттестации может быть реализована дистанционно.

15. Перечень основной и дополнительной литературы, ресурсов интернет, необходимых для освоения дисциплины:

(список литературы оформляется в соответствии с требованиями ГОСТ и используется общая сквозная нумерация для всех видов литературы)

а) основная литература:

№ п/п	Источник
1.	Методы физико-химической и молекулярной биологии [Электронный ресурс] : учебное пособие / Воронеж. гос. ун-т ; сост.: О.А. Сафонова, Л.В. Матасова, А.В. Семенихина .— Воронеж : Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2013 .— http://www.lib.vsu.ru/elib/texts/method/vsu/m13-236.pdf .
2.	Ребриков, Д.В. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков ; Саматов Г. А. ; Трофимов Д. Ю. — 4-е изд. (эл.) .— Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013 .— 225 с. — http://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=216405 .
3.	Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера. В 3 т. Т. 3. Пути передачи информации / Д. Нельсон, М. Кокс; пер. с англ. - 4-е изд. - Москва : Лаборатория знаний, 2020. - 451 с. https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785001018667.html
4.	Спирин, А. С. Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка : учебное пособие / Спирин А. С. - Москва : Лаборатория знаний, 2019. - 594 с. https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785001016236.html

б) дополнительная литература:

№ п/п	Источник
5.	
6.	Камкин А.Г. Физиология и молекулярная биология мембран клеток : [учебное пособие для студ. мед. вузов] / А.Г. Камкин, И.С. Киселева .— М. : Academia, 2008 .— 584 с.
7.	Молекулярная биология клетки: в 3 т. / под ред. Г.П. Георгиева, Ю.С. Ченцова / 2 изд., перераб. и доп. — 1994 .— 503 с.
8.	Кони́чев А.С. Молекулярная биология: учебник для студ. вузов, обуч. по специальности 032400 "Биология" / А.С. Кони́чев, Г.А. Севастьянова .— М.: Academia, 2003 .— 396 с.
9.	Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика : Учебное пособие для студ. ун-тов, обуч. по направлению 510600 - Биология и биол. специальностям / И.Ф. Жимулев ; Отв. ред.: Е.С. Беляева, А.П. Акифьев. - Новосибирск : Сиб. университет. изд-во, 2003 .— 478 с.
10.	Мушкамбаров Н.Н. Молекулярная биология : Учебное пособие для студ. мед. вузов / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов .— М. : Мед. информ. агентство, 2003 .— 535 с.
11.	Чирков Ю. Г. Время химер: Большие генные игры / Ю.Г. Чирков.— М.: Академкнига, 2002.— 396 с.

в) информационные электронно-образовательные ресурсы:

№ п/п	Источник
12.	https://urait.ru
13.	http://biblioclub.ru/
14.	http://www.studmedlib.ru
15.	https://e.lanbook.com/
16.	www.lib.vsu.ru – ЗНБ ВГУ
17.	https://edu.vsu.ru/course/view.php?id=12220
18.	www.molbiol.ru – Классическая и молекулярная биология.
19.	www.pubmed.com - National Center for Biotechnology Information /US National Library of Medicine.
20.	Тотальные ресурсы

16 Перечень учебно-методического обеспечения для самостоятельной работы

№ п/п	Источник
1.	NGS : высокопроизводительное секвенирование / [Д.В. Ребриков и др.] ; под ред. Д.В. Ребрикова .— 2-е изд. — Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015 .— 232 с. : ил., табл. — Авт. указаны на обороте тит. л. — Библиогр. в конце гл. — Предм. указ.: с. 228-232 .— ISBN 978-5-9963-0373-1.
2.	Глик Б.Р. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак; пер. с англ.; под ред. Н.К. Янковского.— М.: Мир, 2002.— 589 с.
3.	Чемерис А. В. Секвенирование ДНК / А.В. Чемерис, Э.Д. Ахунов, В.А. Вахитов.— М.: Наука, 1999 .— 428 с.

17 Образовательные технологии, используемые при реализации учебной дисциплины, включая дистанционные образовательные технологии (ДОТ), электронное обучение (ЭО), смешанное обучение):

При реализации дисциплины используются элементы электронного обучения и дистанционные образовательные технологии

18. Материально-техническое обеспечение дисциплины:

Учебная аудитория для проведения занятий лекционного типа

Специализированная мебель, Проектор Epson EMP-X52, ноутбук Samsung NP-RV410 S01R с возможностью подключения к сети «Интернет»

Win Pro 10 32-bit/64-bit All Lng PK Lic Online DwnLd NR, Office Standard 2019 Single OLV NL Each AcademicEdition Additional Product

Учебная аудитория для проведения занятий семинарского типа (практических занятий, текущего контроля и промежуточной аттестации)

Проектор Epson EMP-X52, ноутбук Samsung NP-RV410 S01R Win Pro 10 32-bit/64-bit All Lng PK Lic Online DwnLd NR, Office Standard 2019 Single OLV NL Each AcademicEdition Additional Product

19. Оценочные средства для проведения текущей и промежуточной аттестаций

Порядок оценки освоения обучающимися учебного материала определяется содержанием следующих разделов дисциплины:

№ п/п	Наименование раздела дисциплины (модуля)	Компетенция(и)	Индикатор(ы) достижения компетенции	Оценочные средства
1.	Раздел 1. Введение в молекулярные методы диагностики. Раздел 2. Основы применения молекулярно-биологических методов в клинике. Раздел 3. Методы, основанные на использовании амплификации Полимеразная цепная реакция. Лигазная цепная реакция. Раздел 4. Применение молекулярных методов диагностики в медицине Раздел 5. Идентификация мутаций. Раздел 6. Прикладные аспекты молекулярно-диагностических методов Раздел 7. Типы нуклеиновых кислот, особенности строения. Способы выделения ДНК и РНК. Использование электрофореза для анализа нуклеиновых	Способен планировать работу и выбирать методы решения исследовательских задач адекватно поставленным целям с учетом широкого понимания профессиональной области и/или области обучения, в том числе на междисциплинарном уровне	Анализирует и обрабатывает информацию по тематике исследования в выбранной области наук, в том числе на междисциплинарном уровне	Коллоквиум

№ п/п	Наименование раздела дисциплины (модуля)	Компетенция(и)	Индикатор(ы) достижения компетенции	Оценочные средства
	кислот. Нуклеазы. Типы рестриктаз, применение. Гибридизационные методы. Раздел 8. Микрочиповый анализ			
Промежуточная аттестация форма контроля – зачет				Перечень вопросов

20. Типовые оценочные средства и методические материалы, определяющие процедуры оценивания

20.1. Текущий контроль успеваемости

Контроль успеваемости по дисциплине осуществляется с помощью следующих оценочных средств:

Защита доклада

Перечень тем:

1. Использование методов молекулярной диагностики в криминалистике.
2. Современные ДНК-чипы: виды, устройство, изготовление, применение.
3. Преимплантационная генетическая диагностика.
4. Получение меченых ДНК-зондов с помощью полимеразной цепной реакции.
5. Использование ДНК-зондов в микробиологии.
6. Пренатальная диагностика наследственных заболеваний. Применение FISH
7. Прямая и косвенная диагностика наследственной патологии.
8. Методы идентификации потенциальных онкогенов.
9. Детекция аллельных вариантов. Применение SNP генотипирования.
10. Обнаружение продуктов генно-модифицированных организмов методами молекулярной диагностики.
11. Использование молекулярно-диагностических методов в лесном и сельском хозяйстве.
12. Применение молекулярно-диагностических методов для установления видовой принадлежности ингредиентов в продуктах и кормах.
13. Применение методов молекулярной диагностики в гематологии и трансфузиологии.
14. Расшифровка геномов.
15. Применение и методы анализа транскрипционной активности генов.

Требования к выполнению заданий (или шкалы и критерии оценивания)

Оценка знаний, умений и навыков, характеризующая этапы формирования компетенций в рамках изучения дисциплины осуществляется в ходе текущей и промежуточной аттестаций.

Текущая аттестация проводится в формах: устного опроса (индивидуальный опрос); защиты доклада.

Промежуточная аттестация включает в себя теоретические вопросы и тестовые задания, позволяющие оценить уровень полученных знаний, и практические задания, позволяющие оценить степень сформированности умений и навыков.

При оценивании используется следующая шкала:

5 баллов ставится, если обучающийся демонстрирует полное соответствие знаний, умений, навыков приведенным в таблицах показателям, свободно оперирует приобретенными знаниями, умениями, применяет их при решении практических задач;

4 балла ставится, если обучающийся демонстрирует соответствие знаний, умений, навыков приведенным в таблицах показателям, но допускает незначительные ошибки, неточности, испытывает затруднения при решении практических задач;

3 балла ставится, если обучающийся демонстрирует неполное соответствие знаний, умений, навыков приведенным в таблицах показателям, допускает значительные ошибки при решении практических задач;

2 балла ставится, если обучающийся демонстрирует явное несоответствие знаний, умений, навыков приведенным в таблицах показателям.

Перечень вопросов к коллоквиуму 1:

- 01 Предмет и задачи молекулярной диагностики.
- 02 Основные направления использования методов молекулярной диагностики
- 03 Объекты исследования молекулярной диагностики
- 04 Основные подходы к генодиагностике. Некоторые методы молекулярной диагностики
- 05 Прямая и косвенная ДНК-диагностика
- 06 Методы выделения нуклеиновых кислот
- 07 Качественный анализ нуклеиновых кислот
- 08 Количественный анализ нуклеиновых кислот
- 09 Принцип гибридизационных методов.
- 10 Классификация гибридизационных зондов по структуре и происхождению
- 11 Классификация гибридизационных зондов по типу метки
- 12 Гибридизационный зонд-«маяк»
- 13 Ферментная метка и типы субстратов для нее
- 14 Способы получения гибридизационных зондов
- 15 Виды гибридизационных методов. Гибридизация в растворе.
- 16 Виды гибридизационных методов. Гибридизация на твердом носителе
- 17 Гибридизация in situ
- 18 Блот-гибридизация
- 19 Сэндвич-гибридизация
- 20 Метод разветвленной ДНК

Перечень вопросов к коллоквиуму 2:

- 21 Методы амплификации нуклеиновых кислот
- 22 Принцип метода ПЦР
- 23 Подготовка проб для ПЦР
- 24 Материалы и приборы для ПЦР. Амплификация
- 25 Детекция результатов ПЦР
- 26 Методы предотвращения контаминации при проведении ПЦР. Устройство ПЦР-лаборатории
- 27 Варианты стандартного метода – ПЦР в реальном времени
- 28 Варианты стандартного метода – гнездная ПЦР
- 29 Варианты стандартного метода – обратно-транскрипционная ПЦР
- 30 Варианты стандартного метода – ПЦР in situ
- 31 Варианты стандартного метода – мультиплексная ПЦР
- 32 Применение ПЦР
- 33 Лигазная цепная реакция
- 34 Методы первичной идентификации мутаций. Секвенирование ДНК
- 35 Анализ конформационного полиморфизма однонитевой ДНК
- 36 Метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза
- 37 Метод гетеродуплексного анализа
- 38 Метод химического расщепления мест нуклеотидного несоответствия
- 39 Методы обнаружения известных мутаций: метод амплификации-рестрикции. Применение для диагностики серповидноклеточной анемии

- 40 ПЦР-опосредованный сайт-направленный мутагенез
 41 Метод обнаружения мутаций в разных сайтах одного гена.
 42 Метод, основанный на лигировании олигонуклеотидных зондов (ПЦР/ЛОЗ)
 43 Идентификация личности молекулярно-биологическими методами. ДНК-фингерпринтинг с использованием мини- и микросателлитов

Критерии оценивания компетенций	Уровень сформированности компетенций	Шкала оценок
<i>Всесторонние и глубокие знания, полное обоснованное изложение материала по соответствующим разделам дисциплины. Безупречное выполнение в процессе изучения дисциплины всех заданий, предусмотренных формами текущего контроля. Свободное владение навыками, осваиваемыми в ходе обучения, умение пользоваться информационными технологиями.</i>	<i>Повышенный уровень</i>	<i>Отлично</i>
<i>Полное знание учебного материала, предусмотренного рабочей программой, успешное выполнение всех заданий, предусмотренных формами текущего контроля. Ответ обоснован, аргументирован. Допущены незначительные ошибки, неточности, которые исправлены после замечаний преподавателя.</i>	<i>Базовый уровень</i>	<i>Хорошо</i>
<i>Знание основных положений программы. Ответ неполный, без обоснований, объяснений. Значительные затруднения в вопросах комплексного использования аналитических подходов в биохимическом анализе. Ошибки устраняются по дополнительным вопросам преподавателя.</i>	<i>Пороговый уровень</i>	<i>Удовлетворительно</i>
<i>Знания несистематические, отрывочные. В ответах допущены грубые, принципиальные ошибки. Затруднения в формулировании основных определений, при решении задач, которые не устранены после наводящих вопросов.</i>	<i>–</i>	<i>Неудовлетворительно</i>

ЗАДАНИЯ, УКАЗАННЫЕ НИЖЕ, РЕКОМЕНДУЮТСЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ РАБОТ С ЦЕЛЬЮ ОЦЕНКИ ОСТАТОЧНЫХ ЗНАНИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ОСВОЕНИЯ ДАННОЙ ДИСЦИПЛИНЫ

1) тестовые задания: (шт.)

1. Рестриктазы – ферменты, использующиеся в молекулярной диагностике и относящиеся к группе:

Синтезирующих ферментов

Расщипляющих ферментов

Модифицирующих ферментов

Ферментные метки

2. Хромогенные субстраты применяются для зондов:

С пероксидазой хрена

Флюоресцирующих зондов-маяков

Зондов с изотопами фосфора

Зондов с биотином

3. Разделение РНК и перенос их на мембрану с целью проведения гибридизации называют:

Саузерн-блоттинг

Нозерн-блоттинг

Истерн-блоттинг
Вестерн-блоттинг

4. Экспрессионные микрочипы относятся к группе:

Аналитических чипов
Чипов с обращенной фазой
Гелевых чипов
Функциональных чипов

5. Метод ПЦР, подразумевающий использование ДНК-зондов, меченых флюорофорами, называется:

Метод «FLASH»
ПЦР с SYBR Green I
ПЦР с горячим стартом
Гнездовая ПЦР

6. Метод, основанный на сшивании фосфодиэфирной связи между участками ДНК, комплиментарно присоединившимися к мишени, называют:

ПЦР in situ
Реакции транскрипционно опосредованной амплификации (NASBA)
Амплификация с вытеснением цепи
Лигазная цепная реакция

7. Диагностику серповидно-клеточной анемии проводят методом:
химического расщепления мест (нуклеотидного) несоответствия
денатурирующего градиентного гель-электрофореза

модификации-рестрикции
ПЦР/ЛОЗ

8. Секвенирование по Сенжеру предполагает внесение в реакционную среду:

флуоресцентно меченных дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTP)
зондов с ферментной меткой и флуоресцирующего субстрата
дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) с изотопами фосфора в составе
реагенты для запуска реакции с пирофосфатом, сопровождающейся выделением света

9. Метод создания генетических «отпечатков пальцев», основанный на анализе полиморфизма ДНК – это:

ДНК-фингерпринтирование (DNA-fingerprinting)
Анализ RAPD – случайно амплифицированные полиморфные ДНК
Анализ ISSR – межмикросателлитные последовательности
RAPD ПЦР – ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК

2) ситуационные задания с развернутым ответом сложные:

1. Вам необходимо провести real time ПЦР-диагностику бактериальной инфекции, течение которой сопровождается развитием сепсиса. Известно, что значительная часть участка ДНК-мишени, на котором отжигаются праймеры, является консервативной у нескольких возбудителей инфекции. После проведения анализа вы получили следующие результаты. Данные пациента 1: Ct гена-мишени = 12; Ct референсного гена = 25. Данные пациента 2: Ct гена-мишени = 18; Ct референсного гена = 24. Эффективность амплификации с используемыми праймерами составляет 1,92. Предложите схему анализа, ответив на следующие вопросы: Что может являться исходным материалом для исследования? Какой метод анализа ДНК будет предпочтителен, в чём его принцип? У какого пациента выше инфекционная нагрузка и во сколько раз? Ответ представьте в

виде целого числа или, если нет возможности воспользоваться калькулятором, числа в n -ой степени.

В случае септической бактериальной инфекции исходным материалом может служить сыворотка крови с циркулирующими в ней бактериями. В качестве высокоспецифичного *real time* ПЦР метода может быть использован метод с эффектом FRET (fluorescence resonance energy transfer). В ходе амплификации к одноцепочечной ДНК-мишени присоединяются два зонда с флуорофорами. Принцип метода заключается в переносе энергии от одного флуорофора, находящегося на 3' конце первого зонда, ко второму флуорофору, находящемуся на 5' конце второго зонда, причем расстояние между флуорофорами составляет 1-3 нуклеотида. При связывании обоих зондов с матрицей испускаемое первым флуорофором излучение передается на второй флуорофор, а его излучение детектируется прибором. Данный подход обеспечивает высокую специфичность анализа. Инфекционная нагрузка выше у первого пациента, поскольку в данном случае разница между *St* гена-мишени и целевого гена меньше, чем у второго пациента. Используя формулу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ и подставив значение эффективности находим, что у первого пациента инфекционная нагрузка выше в 96, или $1,92^7$ раза.

3) ситуационные с развернутым ответом простые

1. Вы собираетесь провести ПЦР-диагностику инфекционного заболевания. Какие факторы вы должны учесть при планировании, проведении анализа и интерпретировании результатов?

- наличие регистрационного удостоверения у оборудования и изделий медицинского назначения
- правильность получения, доставки и хранения биологических образцов
- правильное выполнение процедур обработки проб и постановки анализа
- привлечение данных клинической картины и лабораторно-инструментальных методов в ходе оценки результатов анализа

2. Вы проводите гибридизацию *in situ*. Анализируемый образец чувствителен к действию щелочей и нагреванию выше 70 градусов Цельсия. Каким образом вы будете проводить стадию денатурации и гибридизации ДНК?

Денатурацию можно провести в присутствии формамида (ослабляет внутримолекулярные водородные связи) и солей, что позволяет снизить температуру денатурации и гибридизации. Используются следующие условия: 50% формамид, двукратная концентрация стандартного солевого раствора, температура 42 градуса Цельсия.

3. Вы проводите идентификацию личности. Какое количество локусов необходимо проанализировать, если ваш анализ относится к разряду особо важных?

14 локусов

4. Какой метод молекулярной диагностики можно использовать для диагностики серповидноклеточной анемии, в чём его принцип?

Серповидноклеточная анемия – это генетическое заболевание, обусловленное заменой одного из нуклеотидов в кодоне, который соответствует шестой аминокислоте бета-цепи молекулы гемоглобина. Для выявления мутации используют метод модификации-рестрикции. Подбирают рестриктазу, сайт рестрикции для которой находится в месте предполагаемой мутации. После проведения реакции наблюдают наличие или отсутствие разрезания ДНК.

4) задания, требующего короткого ответа

1. Вам необходимо обнаружить мутацию в ДНК пациента с помощью микрочипового анализа. Как будет проводиться данный анализ и какой тип микрочипов необходимо использовать?

Для анализа мутаций используются функциональные микрочипы. ДНК пациента гибридизуется с коротким фрагментом «референсной» ДНК, закрепленной на поверхности ДНК-микрочипа. После гибридизации происходит удлинение референсной цепи на один нуклеотид в том самом месте, где находится искомая мутация. Нуклеотиды, участвующие в достройке ДНК, помечены различными флуоресцентными метками, и по регистрации флуоресценции в лазерном луче можно определить,

какой именно нуклеотид включился в ДНК и, следовательно, какую мутацию содержит ДНК пациента.

2. Вы осуществляете анализ ДНК с помощью ПЦР в реальном времени. В вашем распоряжении имеется две системы для детекции: TaqMan и SYBR green I. Какая из них обеспечивает специфичность детекции результатов? Как можно проверить специфичность в случае, если система детекции её не обеспечивает?

Специфичность обеспечивает система TaqMan. Происходит расщепление прикрепленного зонда между «прямым» и «обратным» праймерами с 5' конца за счёт 5'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы. При расщеплении зонда высвобождается флуорофор, сигнал которого детектирует прибор.

При использовании SYBR green I флуоресценция раствора вызывается накоплением любой двуцепочечной ДНК. Для получения корректных результатов необходимо построения "кривых плавления" (melting curves). Для этого после окончания ПЦР реакционную смесь нагревают и непрерывно измеряют флуоресценцию. По достижении температуры плавления продукта амплификации флуоресценция резко снижается. Каждое резкое уменьшение флуоресценции на графике соответствует числу разных типов ампликонов.

3. Вам необходимо получить большое число копий коротких фрагментов ДНК (40-150 н.п.). Каким методом выгоднее пользоваться, в чём принцип его реализации?

Амплификация с вытеснением цепи (SDA). Метод использует свойство ДНК-полимеразы, лишенной экзонуклеазной активности, синтезировать новую цепь ДНК, вытесняя рестрицированную цепь. Предварительно в ходе инициирования реакции с использованием специальных праймеров создается сайт рестрикции для эндонуклеазы Hinc II. Поскольку в качестве предшественников в синтезе используются тиопроизводные аденозина, гидролиз рестриктазой Hinc II приводит к образованию насечки (гидролизуется одна цепь), в то время как вторая цепь остается нативной. SDA относится к классу изотермических реакций. Изотермические методы позволяют использовать в качестве инкубаторов лабораторные термостаты. Этот метод амплификации позволяет получить до 10^6 - 10^7 копий на одну используемую матрицу. Метод пригоден для амплификации коротких фрагментов ДНК

4. На втором этапе секвенирования вы проводите амплификацию одноцепочечных фрагментов. Какой компонент вам необходимо добавить в реакционные смеси для детекции сигнала, в чём принцип работы этого компонента?

Раствор с одноцепочечными фрагментами и праймерами распределяют по четырем пробиркам, в каждую из которых добавлены четыре разные dNTP и один из флуоресцентно меченных дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTP). Удлинение гибридизовавшегося с ДНК-фрагментом праймера происходит до тех пор, пока в цепь не включится ddNTP. В этом месте синтез останавливается, и в результате в каждой из пробирок образуется набор отрицательно заряженных фрагментов разной длины, оканчивающихся одним из меченых ddNTP. ddNTP – это полученный искусственным путем нуклеотид, лишенный 2'- и 3'-гидроксильных групп при углеродных атомах рибозы. Фрагменты разделяют по размеру с помощью, например, капиллярного электрофореза. Когда фрагменты определенной длины проходят через окно детектора, освещаемое лазерным лучом, ddNTP начинают флуоресцировать. Длина волны флуоресценции зависит от того, какой именно ddNTP находится у них на конце, так что на выходе получается цветная картинка, которую можно трансформировать в нуклеотидную последовательность.

5. При обследовании больного заподозрили наличие хромосомной аномалии. Каким методом вы будете оценивать данную патологию, в чём его принцип?

Для данного случая подойдёт молекулярно-цитогенетическая диагностика с использованием FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*). Суть метода заключается в приготовлении коротких последовательностей ДНК, называемых зондами, которые являются комплементарными по отношению к последовательностям ДНК, представляющим объект изучения. Зонды

гибридизуются с комплементарными участками ДНК и благодаря тому, что они помечены флуоресцентной меткой, позволяют видеть локализацию интересующих генов в составе ДНК или хромосом.

20.2. Промежуточная аттестация

Промежуточная аттестация по дисциплине осуществляется с помощью следующих оценочных средств:

Комплект КИМ

- 01 Предмет и задачи молекулярной диагностики.
- 02 Основные направления использования методов молекулярной диагностики
- 03 Объекты исследования молекулярной диагностики
- 04 Основные подходы к генодиагностике. Некоторые методы молекулярной диагностики
- 05 Прямая и косвенная ДНК-диагностика
- 06 Методы выделения нуклеиновых кислот
- 07 Качественный анализ нуклеиновых кислот
- 08 Количественный анализ нуклеиновых кислот
- 09 Принцип гибридизационных методов.
- 10 Классификация гибридизационных зондов по структуре и происхождению
- 11 Классификация гибридизационных зондов по типу метки
- 12 Гибридизационный зонд-«маяк»
- 13 Ферментная метка и типы субстратов для нее
- 14 Способы получения гибридизационных зондов
- 15 Виды гибридизационных методов. Гибридизация в растворе.
- 16 Виды гибридизационных методов. Гибридизация на твердом носителе
- 17 Гибридизация *in situ*
- 18 Блот-гибридизация
- 19 Сэндвич-гибридизация
- 20 Метод разветвленной ДНК
- 21 Методы амплификации нуклеиновых кислот
- 22 Принцип метода ПЦР
- 23 Подготовка проб для ПЦР
- 24 Материалы и приборы для ПЦР. Амплификация
- 25 Детекция результатов ПЦР
- 26 Методы предотвращения контаминации при проведении ПЦР. Устройство ПЦР-лаборатории
- 27 Варианты стандартного метода – ПЦР в реальном времени
- 28 Варианты стандартного метода – гнездная ПЦР
- 29 Варианты стандартного метода – обратно-транскрипционная ПЦР
- 30 Варианты стандартного метода – ПЦР *in situ*
- 31 Варианты стандартного метода – мультиплексная ПЦР
- 32 Применение ПЦР
- 33 Лигазная цепная реакция
- 34 Методы первичной идентификации мутаций. Секвенирование ДНК
- 35 Анализ конформационного полиморфизма однонитевой ДНК
- 36 Метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза
- 37 Метод гетеродуплексного анализа
- 38 Метод химического расщепления мест нуклеотидного несоответствия
- 39 Методы обнаружения известных мутаций: метод амплификации-рестрикции. Применение для диагностики серповидноклеточной анемии
- 40 ПЦР-опосредованный сайт-направленный мутагенез
- 41 Метод обнаружения мутаций в разных сайтах одного гена.

42 Метод, основанный на лигировании олигонуклеотидных зондов (ПЦР/ЛОЗ)

43 Идентификация личности молекулярно-биологическими методами. ДНК-фингерпринтинг с использованием мини- и микросателлитов

Требования к выполнению заданий, шкалы и критерии оценивания

Оценка знаний, умений и навыков, характеризующая этапы формирования компетенций в рамках изучения дисциплины осуществляется в ходе текущей и промежуточной аттестаций.

Текущая аттестация проводится в формах: устного опроса (индивидуальный опрос); защиты доклада.

Промежуточная аттестация включает в себя теоретические вопросы и тестовые задания, позволяющие оценить уровень полученных знаний, и практические задания, позволяющие оценить степень сформированности умений и навыков.

При оценивании используется следующая шкала:

5 баллов ставится, если обучающийся демонстрирует полное соответствие знаний, умений, навыков приведенным в таблицах показателям, свободно оперирует приобретенными знаниями, умениями, применяет их при решении практических задач;

4 балла ставится, если обучающийся демонстрирует соответствие знаний, умений, навыков приведенным в таблицах показателям, но допускает незначительные ошибки, неточности, испытывает затруднения при решении практических задач;

3 балла ставится, если обучающийся демонстрирует неполное соответствие знаний, умений, навыков приведенным в таблицах показателям, допускает значительные ошибки при решении практических задач;

2 балла ставится, если обучающийся демонстрирует явное несоответствие знаний, умений, навыков приведенным в таблицах показателям.

Критерии оценивания компетенций	Уровень сформированности компетенции	Шкала оценок
<i>Всесторонние и глубокие знания, полное обоснованное изложение материала по соответствующим разделам дисциплины. Безупречное выполнение в процессе изучения дисциплины всех заданий, предусмотренных формами текущего контроля. Свободное владение навыками, осваиваемыми в ходе обучения, умение пользоваться информационными технологиями.</i>	<i>Повышенный уровень</i>	<i>Зачтено</i>
<i>Полное знание учебного материала, предусмотренного рабочей программой, успешное выполнение всех заданий, предусмотренных формами текущего контроля. Ответ обоснован, аргументирован. Допущены незначительные ошибки, неточности, которые исправлены после замечаний преподавателя.</i>	<i>Базовый уровень</i>	<i>Зачтено</i>
<i>Знание основных положений программы. Ответ неполный, без обоснований, объяснений. Значительные затруднения в вопросах комплексного использования аналитических подходов в биохимическом анализе. Ошибки устраняются по дополнительным вопросам преподавателя.</i>	<i>Пороговый уровень</i>	<i>Зачтено</i>
<i>Знания несистематические, отрывочные. В ответах допущены грубые, принципиальные ошибки. Затруднения в формулировании основных определений, при решении задач, которые не устранены после наводящих вопросов.</i>	<i>–</i>	<i>Не зачтено</i>