

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН ГНЦ
прикладной
микробиологии и биотехнологии
академик РАН, доктор
медицинских
наук, профессор



И.А. Дятлов

« 05 » 20 24 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ (2.1.7)

"Генетические технологии в микробиологии"

**Группа специальностей: 1.5- Биологические науки
специальность 1.5.11 МИКРОБИОЛОГИЯ**

Трудоёмкость программы дисциплины - 2 з.е. (72 академ. часа)

Оболенск-2024

Рабочая программа дисциплины "Генетические технологии в микробиологии" разработана в соответствии с Федеральными государственными требованиями к структуре программ подготовки научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре, условиям их реализации, срокам освоения этих программ с учетом различных форм обучения, образовательных технологий и особенностей отдельных категорий аспирантов утвержденными Приказом Минобрнауки России от 20.10.2021 г. N 951 .

Составитель программы



д-р биол. наук, доцент, ведущий
научный сотрудник Хохлова О.Е.

Рецензенты:

Прудникова С.В. д-р. биол. наук,
профессор базовой кафедры биотехнологии ИФБиТ СФУ
(ФИО, ученая степень, ученое звание, должность)

Платонов М.Е. канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ПМБ

Рабочая программа утверждена на Ученом совете ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Протокол № 3 от 23.05. 2024г.

1. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ДИСЦИПЛИНЫ

1.1. **Цель** освоения дисциплины **"Генетические технологии в микробиологии"** – получение и совершенствование теоретических знаний и практических умений, направленных на выявление, определение и изучение как самих возбудителей, их генетических особенностей, так и их роли в возникновении и развитии инфекционных заболеваний, а также применение полученных теоретических знаний и практических навыков для осуществления научно-исследовательской деятельности в области микробиологии, эпидемиологии, бактериологии, биотехнологии, генной инженерии в целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации, позволяющих самостоятельно ставить и решать актуальные научные задачи, адекватно воспринимать научные достижения специалистов в области генетических технологий, микробиологии, вирусологии, клинической иммунологии, передавать свои знания научной общественности.

1.2. К **задачам** изучения дисциплины относятся:

- повышение уровня образования, научной и педагогической квалификации;
- формирование и углубление знаний в области микробиологии, генетики, иммунологии молекулярной микробиологии;
- формирование навыков использования современных ресурсов и генетических технологий в области молекулярной микробиологии;
- обучение методам и технологиям подготовки и оформления результатов научных исследований;
- формирование профессиональных компетенций в области микробиологии и современных генетических технологий - обучение практическим навыкам выделения чистых культур, культивирования, индикации и идентификации микроорганизмов, генетической инженерии, молекулярно-генетическим методам исследования микробного генома, редактировании генома.

2. МЕСТО ДИСЦИПЛИНЫ В СТРУКТУРЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ.

Дисциплина **"Генетические технологии в микробиологии"** входит в образовательный компонент программы и является обязательной для изучения.

Общая трудоемкость дисциплины составляет 2 зачетные единицы (72 академических часа).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ОБУЧЕНИЯ.

В результате освоения дисциплины **"Генетические технологии в микробиологии"** у аспирантов должны быть сформированы устойчивые профессиональные компетенции.

- ПК-1 способность и готовность использовать научную методологию исследования: знания современных теоретических и экспериментальных методов исследования в области микробиологии, их практического использования и внедрения результатов исследований, основ планирования эксперимента, методов математической обработки данных
- ПК-2 способность и готовность формулировать цели и задачи научных исследований в соответствии с современными тенденциями и перспективами развития микробиологии и смежных наук, обоснованно выбирать экспериментальные методы и средства решения сформулированных задач.
- ПК-3 способность и готовность использовать навыки самостоятельного сбора данных, изучения, комплексного анализа и аналитического обобщения научной информации и результатов научно-исследовательских работ в области микробиологии и медицины.
- ПК-6 способность к критическому анализу и оценке современных научных достижений, генерированию новых идей при решении исследовательских и практических задач, в том числе в междисциплинарных областях.

Аспиранты, завершившие изучение дисциплины **"Генетические технологии в микробиологии"**, должны:

- ЗНАТЬ

- организацию работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, подозрительным на содержание микроорганизмов I-IV групп патогенности;
- современную базу классических, биохимических, иммунохимических и молекулярно-генетических методов изучения микроорганизмов;
- технологию и алгоритм выделения нуклеиновых кислот из исследуемых проб;
- фундаментальные основы микробиологии, генетики, иммунологии и вакцинопрофилактики; современные методы исследования с целью создания новых перспективных средств изучения возбудителей бактериальных инфекций;

- основные характеристики наборов реагентов, используемых для проведения амплификации нуклеиновых кислот, секвенирования и других генетических технологий;
- современные тенденции и перспективы развития диагностических методов, применяемых в микробиологических исследованиях и смежных науках;
- принципы сбора данных, изучения, комплексного анализа и аналитического обобщения научной информации и результатов научно-исследовательских работ в области общей и молекулярной микробиологии;
- принципы формулирования и представления научно-обоснованных выводов с позиции диагностической и доказательной микробиологии по результатам собственных исследований;

-УМЕТЬ

- организовать условия для безопасной и эффективной работы по выявлению, диагностике и дальнейшему изучению возбудителей бактериальных инфекционных заболеваний;
- проводить очистку ДНК/РНК исследуемых образцов от примесей;
- проводить исследования с использованием методов амплификации нуклеиновых кислот, секвенирования и другое неукоснительно соблюдая требования биологической безопасности к проведению работ;
- детектировать результаты амплификации, секвенирования;
- составлять общий план работы по фундаментальному направлению научного исследования, предлагать методы исследования и способы обработки результатов;
- планировать научно-исследовательскую работу в области микробиологии;
- формулировать цели и задачи научных исследований в соответствии с современными тенденциями и перспективами развития вакцинопрофилактики и смежных наук;
- выполнять комплексный анализ и аналитическое обобщение научной информации и результатов научно-исследовательских работ в области микробиологии, и биологии в целом;
- представлять научные результаты по теме диссертационной работы в виде публикаций в рецензируемых научных изданиях;
- готовить заявки на получение научных грантов и заключения контрактов по НИР в области микробиологии;

- представлять результаты НИР (в т.ч., диссертационной работы) на научных конференциях и круглых столах;

-ВЛАДЕТЬ

- практическими навыками классических, иммунологических и молекулярно-генетических методов изучения, применяемых в микробиологических исследованиях и смежных науках;
- техникой выполнения процедур при проведении ПЦР-диагностики, секвенирования и др.;
- основами биоинформационного анализа данных секвенирования;
- навыками планирования научного исследования, анализа получаемых результатов и формулировки выводов;
- методами перспективного планирования, подготовки и проведения НИР, математической обработки результатов экспериментальных исследований в области микробиологии и смежных наук;
- навыками аналитического обобщения и критического анализа экспериментальных данных с позиций доказательной микробиологии.

4. СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ «ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В МИКРОБИОЛОГИИ»

4.1. Объем дисциплины и виды учебной работы.

Вид учебной работы	Объем з.е. / часов
Общая трудоемкость дисциплины	2 з.е. / 72 часа
Аудиторные занятия:	
лекции	26 часов
практические занятия	10 часов
Самостоятельная работа	36 часа
Вид итогового контроля	Дифференцированный зачет (устный- вопросы билетов)

4.2. Тематический план занятий.

п/п	Разделы дисциплины	Лекции (часы)	Практические занятия (часы)	Самостоятельная работа (часы)	Формы текущего и итогового контроля (часы)
1.	Микробиологические и иммунологические методы	8	4	12	

1.1.	Микробиологические исследования: виды и классификация. Микроскопический метод исследования. Биологический метод	2		3	
1.2.	Культуральный метод исследования. Автоматические методы идентификации микроорганизмов. Молекулярно-генетические основы антибиотикорезистентности микроорганизмов, определение чувствительности к антимикробным препаратам	2	2	3	
1.3.	Учение об иммунитете. Антигены и антитела	2		3	
1.4.	Иммунологические методы исследований в микробиологии	2	2	3	Собеседование
2.	Молекулярно-генетические методы исследования микробного генома	10	4	10	
2.1.	Полимеразная цепная реакция (ПЦР), суть, разновидности, методология	2		2	
2.2.	ПЦР в режиме реального времени, цифровая ПЦР, LAMP	2	2	2	
2.3.	Методы, основанные на анализе рестрикционных профилей ДНК. ДНК-гибридизация. Генотипирование микроорганизмов.	2		2	
2.4.	CRISPR/Cas системы в диагностике инфекционных заболеваний	2		2	
2.5.	Методы секвенирования ДНК, NGS секвенирование, NGS секвенирование: суть, основы применения секвенирования. Биоинформационный анализ	2	2	2	Собеседование
3.	Методы редактирования генома микроорганизмов	8	2	12	
3.1.	Трансформация компетентных клеток, особенности методологии	2		3	
3.2.	Клонирование, методы и инструменты молекулярного клонирования	2		3	
3.3.	Направленный сайт-мутагенез. Применение нуклеаз с «цинковыми пальцами». Суть, преимущества, недостатки и области применения. TALE-нуклеазы. Применение TALEN в науке, биотехнологии	2		3	
3.4.	Системы CRISPR/Cas для направленного редактирования генома. Преимущества, недостатки и области применения	2	2	3	Собеседование
	Подготовка к экзамену и экзамен			2	
Всего часов		26	10	36	

4.3. Содержание разделов и тем лекционного курса.

1. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Тема 1.1. **Микробиологические исследования: виды и классификация. Микроскопический метод исследования. Биологический метод**

Трудоемкость лекционного курса 2 часа, сам. работы 3 часа

Требования к технике проведения работ в микробиологической лаборатории. Микробиологические исследования в диагностике инфекционных болезней и санитарно-бактериологическом исследовании пищевых продуктов, воды, почвы и др. Виды микробиологических исследований. Классификация микробиологических исследований. Нормативные документы, регламентирующие проведение микробиологических исследований в клинической и санитарной микробиологии.

Микроскопический метод исследования.

Световая микроскопия. Микроскопия в темном поле зрения. Фазово-контрастная микроскопия. Люминесцентная микроскопия. Приготовление препаратов для световой микроскопии. Окраска мазков. Простые методы окраски мазков. Сложные (дифференциальные) методы окраски мазков. Окраска по Граму. Окраска кислотоустойчивых микробов. Окраска по методу Циль-Нильсена. Окраска по Романовскому-Гимза. Окраска капсул. Окраска спор. Окраска жгутиков. Выявление цитоплазматических включений. Метод раздавленной и висячей капли.

Электронная микроскопия. Просвечивающая электронная микроскопия. Сканирующая электронная микроскопия.

Выбор и характеристика экспериментальных животных. Подготовка экспериментальных животных. Отбор животных. Маркировка. Фиксация животных. Способы заражения. Заражение через рот. Подкожное заражение. Внутривенное заражение. Накожное заражение. Внутривенное заражение. Внутривенное заражение. Внутривенное заражение. Внутривенное заражение. Внутривенное заражение. Заражение через нос. Заражение в переднюю камеру глаза. Заражение в мозг. Вскрытие животных. Определение вирулентности микроорганизмов.

Моделирование экспериментальных инфекций у чувствительных животных — важный инструмент изучения патогенеза заболевания и характера взаимодействий внутри системы микроорганизм-макроорганизм.

Тема 1.2. **Культуральный метод исследования. Автоматические методы идентификации микроорганизмов. Молекулярно-генетические основы антибиотикорезистентности микроорганизмов, определение чувствительности к антимикробным препаратам**

Трудоемкость лекционного курса 2 часа, практ. занятий 2 часа, сам. работы 3 часов

Принципы и методы выделения чистых культур бактерий. Методы контроля биофизических факторов роста: pH, активность воды и осмотическое давление, температура, давление, концентрация кислорода, анаэробноз. Биохимические факторы роста бактерий, определение питательных потребностей. Синтетические и полусинтетические среды. Питательные среды жидкие, полужидкие, плотные. Питательные среды хромогенные. Питательные среды основные, консервирующие,

транспортные, накопительные, селективные, дифференциально-диагностические, специальные – обогащенные, среды хранения. Среда для культивирования анаэробов.

Получение накопительных и чистых культур. Правила взятия, хранения и транспортировки материала для бактериологического исследования. Выделение и идентификация микроорганизмов. Выделение и идентификация аэробных и факультативно-анаэробных бактерий. Выделение и идентификация анаэробных бактерий. Биохимические методы идентификации бактерий. Способность к ферментации углеводов у бактерий. Пёстрый ряд при диагностике бактерий. Расщепление белков бактериями. Система индикаторных бумажек (СИБ).

Автоматизация культуральных исследований. Автоматизированные станции посева биологического материала. Системы автоматизированного гемокультивирования. Автоматические анализаторы для идентификации микроорганизмов.

Метод матрично-ассоциированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) времяпролетной масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов.

АРМ - автоматизированное рабочее место микробиолога. Автоматический и полуавтоматический анализаторы. VITEK – Бактериологический автоматический анализатор, позволяющий идентифицировать грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также грибы. Подготовка к работе пластиковых луночных карт, содержащих различные субстраты. Процесс идентификации. Время получения результата идентификации.

Молекулярно-генетические механизмы устойчивости к антимикробным препаратам. Множественная лекарственная устойчивость: MDR, XDR и PDR. Методы, используемые при изучении резистентности микроорганизмов. Мониторинг за циркуляцией антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Метод серийных разведений в бульоне. Метод серийных разведений в агаре. Диско-диффузионный метод. Е-тесты. Методы ускоренного определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Определение фагочувствительности. Определение чувствительности бактерий к антимикробным препаратам с использованием автоматических анализаторов. Нормативные документы по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам в РФ: Методические указания и Клинические рекомендации по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Тема 1.3. Учение об иммунитете. Антигены и антитела

Трудоемкость лекционного курса 2 часа, сам. работы 3 часа

Иммунитет. Общая и частная иммунология. Строение и функции органов иммунной системы. Клеточный и гуморальный иммунитет. Первичный и вторичный иммунный ответ. Понятие врожденного и адаптивного иммунитета.

Иммунология инфекционных процессов.

Пассивный и активный иммунитет. Фазы иммунного ответа. Этапы активации иммунной системы. Первичное и вторичное образование антител. Динамика образования иммуноглобулинов при инфекционных процессах, вакцинации.

Типы антигенов. Понятие иммуногенности антигена. Строение и состав основных клеточных антигенов. Антигены белковой и небелковой природы. Полноценные и неполноценные антигены и способы их выявления. Классы и подклассы антител. Строение и функции антител. Сывороточные и моноклональные антитела. Понятия эпитопов, аффинности и авидности. Методы выявления взаимодействия антиген-антитело. Антивидовые антитела и их применение.

Тема 1.4. Иммунологические методы исследований в микробиологии

Трудоемкость лекционного курса 2 часа, практ. занятий 2 часа, сам. работы 3 часа

Реакции, основанные на взаимодействии антиген-антитело: аглютинации, преципитации, гемаглютинации, радиоиммунный анализ, иммуноферментный анализ, иммунофлуоресценция, иммуноблоттинг, иммунохроматография, иммуночипы, иосенсоры.

Иммуноферментный анализ (сокращённо ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) — как один из основных лабораторных иммунологических методов определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Разновидности ИФА. Применение ИФА для выявления антигенов. Применение ИФА для серодиагностики. Количественный и качественный ИФА. Ограничения метода. Основные материалы, реактивы и оборудование для ИФА.

2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБНОГО ГЕНОМА.

Тема 2.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР), суть, разновидности, методология

Трудоемкость лекционного курса 2 часа, сам. работы 2 часа

Организация диагностической ПЦР-лаборатории и стадии постановки ПЦР. Методы выделения нуклеиновых кислот. Сущность метода ПЦР. Основные компоненты ПЦР. Разновидности ПЦР: Nested-ПЦР, инвертированная ПЦР, ПЦР с обратной транскрипцией, ступенчатая ПЦР (touchdown-PCR). Применение ПЦР для секвенирования ДНК. Использование ПЦР в биотехнологии для клонирования генов, основные методические подходы. Использование ПЦР для лабораторной диагностики инфекционных болезней и выявления ПБА. Электрофорез нуклеиновых кислот. Электрофоретическое определение количества, молекулярной массы и чистоты ПЦР-продукта. Подбор условий и приборной базы для электрофоретического анализа продуктов ПЦР. Влияние на эффективность реакции концентрации основных компонентов ПЦР. Типы используемых полимераз. Подбор режима проведения ПЦР. Подбор мишеней для ПЦР. Принципы дизайна праймеров и зондов, используемых в ПЦР. Знакомство с программным обеспечением и он-лайн ресурсами, используемыми для подбора мишеней для ПЦР, праймеров и зондов

Тема 2.2. ПЦР в режиме реального времени, цифровая ПЦР, LAMP

Трудоемкость лекционного курса 2 часа, практ. занятий 2 часа, сам. работы 2 часа

ПЦР в режиме реального времени, достоинства, недостатки. Оборудование для ПЦР в реальном времени, визуализация накопления ДНК при проведении ПЦР в реальном времени. Дизайн праймеров и проб, программы амплификации. Анализ данных ПЦР в реальном времени. Количественное определение уровня нуклеиновой кислоты.

Использование ПЦР в реальном времени для определения однонуклеотидного полиморфизма. Преимущества и недостатки ПЦР-РВ. Мультиплексная ПЦР. Виды ПЦР-РВ. Обратная транскрипция, анализ уровня экспрессии генов с помощью ПЦР-РВ после проведения обратной транскрипции. Капельная цифровая ПЦР. Цифровая ПЦР, отличия, возможности использования, достоинства и недостатки. LAMP, суть, применение, достоинства и недостатки.

Тема 2.3. Методы, основанные на анализе рестрикционных профилей ДНК. ДНК-гибридизация. Генотипирование микроорганизмов

Трудоемкость лекционного курса 2 часа, сам. работы 2 часа

Рестриктазы. Методы, основанные на анализе рестрикционных профилей ДНК. ДНК-гибридизация. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов ПЦР (PCR-RFLP). AFLP-PCR. Генотипирование микроорганизмов, суть, применение в научных исследованиях и при проведении эпидемиологических расследований. Виды молекулярных маркеров, используемых для генотипирования. MLVA, SNP, In/Del, RAPD, MLST-типирование. Риботипирование. Методические подходы для применения ПЦР с целью выявления однонуклеотидных замен.

Тема 2.4. CRISPR/Cas системы в диагностике инфекционных заболеваний

Трудоемкость лекционного курса 2 часа, сам. работы 2 часа

Типы CRISPR/Cas систем, используемых в разработке диагностических тест-систем. SHERLOCK и DETECTR: суть, методология, применение. LEOPARD, CRISPR-чипы: суть, методология, применение. CRISPR/Cas III типа в диагностике, MORIARTY: суть, методология, применение. Другие методы, основанные на применении CRISPR/Cas систем, например с применением Cas14. Методы, используемые в детекции результатов при применении CRISPR/Cas систем в диагностике инфекционных заболеваний.

Тема 2.5. Методы секвенирования ДНК, NGS секвенирование, NGS секвенирование: суть, основы применения секвенирования. Биоинформационный анализ

Трудоемкость лекционного курса 2 часа, практ. занятий 2 часа, сам. работы 2 часа

Секвенирование ДНК. Суть, разновидности, методология. Возможности использования секвенирования в изучении генома микроорганизмов, в геномной инженерии. Геномная библиотека. Знакомство с принципами проведения экспериментов по массивному параллельному секвенированию. Знакомство с аппаратными платформами для проведения экспериментов. Изучение принципов проведения биоинформационного анализа – картирование на существующий геном, сборка геномов de novo. Идентификация штаммов микроорганизмов на уровне генома. Оценка качества данных секвенирования (программа FastQC). Фильтрация низкокачественных ридов (программа Trimmomatic 0.33). Сборка контигов de novo (Newbler 2.9 GS De Novo Assembler или SPAdes 3.1). Картирование ридов на специфичные нуклеотидные последовательности и на последовательности референсных геномов (программы Lasergene 11 (DNASTAR, USA) и Newbler 2.9. GS Reference Mapper). Картирование контигов на специфичные нуклеотидные последовательности и на последовательности референсных геномов (программы MAUVE, BRIG). Анализ SNP (программа wombac). Функциональный анализ и аннотация (RAST, NCBI Genome). Основы применения секвенирования.

3. МЕТОДЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА МИКРООРГАНИЗМОВ

Тема 3.1. Трансформация компетентных клеток, особенности методологии

Трудоемкость лекционного курса 2 часа, сам. работы 3 часа

Трансформация, суть метода, механизм трансформации. Разновидности трансформации: электропорация, химическая трансформация, использование генных пушек. Компетентные клетки, используемые для трансформации, особенности методологии. Применение трансформации для различных целей.

Тема 3.2. Клонирование, методы и инструменты молекулярного клонирования

Трудоемкость лекционного курса 2 часа, практ. занятий 2 часа, сам. работы 3 часа

Клонирование, суть метода, основные этапы. Подбор подходящего для исследования вектора, например, плазмиды. Выделение плазмидной ДНК из бактериальной культуры экспресс-методами. Выделение и очищение целевого фрагмента ДНК: вырезание с помощью эндонуклеаз рестрикции, копирование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и др. Линелизация плазмиды при помощи эндонуклеаз рестрикции. Визуализация результатов рестрикции методом гель-электрофореза в агарозном геле. Приготовление лигата - сшивка плазмиды и целевой последовательности. Трансформация лигата в реципиентные клетки. Трансформация компетентных клеток. Анализ трансформантов. Применение клонирования для различных целей.

Тема 3.3. Направленный сайт-мутагенез. Применение нуклеаз с «цинковыми пальцами». Суть, преимущества, недостатки и области применения. TALE-нуклеазы. Применение TALEN в науке, биотехнологии

Трудоемкость лекционного курса 2 часа, сам. работы 3 часа

Радиационный мутагенез. Химический мутагенез. Мутагенез с использованием химерных РНК-ДНК олигонуклеотидов. ПЦР сайт-направленный мутагенез с олигонуклеотидными праймерами. Мутагенез всей плазмиды с использованием высокоточной ДНК-полимеразы. Использование метода в белковой инженерии и исследовании функций и свойств последовательности ДНК и белка, а также посттрансляционных модификаций белков. Недостатки метода. Структура и функции нуклеаз с «цинковыми пальцами». Применение нуклеаз с «цинковыми пальцами». Суть, преимущества, недостатки и области применения. Метод TALEN. Избирательное воздействие на ДНК химерных нуклеаз TALEN, сконструированных на основе TALE нуклеаз. Структура TALE. Специфичность и эффективность RVD. Белки семейства TALE. Создание и доставка TALEN. Онлайн-ресурсы для разработки TALEN. Основные достоинства и недостатки методов TALEN. Применение TALEN в науке, биотехнологии.

Тема 3.4. Системы CRISPR/Cas для направленного редактирования генома. Преимущества, недостатки и области применения

Трудоемкость лекционного курса 2 часа, практ. занятий 2 часа, сам. работы 3 часа

Типы CRISPR/Cas систем, используемых для направленного редактирования генома. Белки системы CRISPR/Cas. Узнавание целевого участка ДНК, технологии единой направляющей РНК (sgРНК). Типы

защитных систем CRISPR, функционирующих в клетках различных бактерий. Репарация двуцепочечных разрывов ДНК за счёт негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ) и путём гомологичной рекомбинации. Типы доставки CRISPR/Cas систем в клетки-мишени in vitro, in vivo. Web-ресурсы, используемые при работе с CRISPR/Cas системами. Применение метода для целенаправленного редактирования геномов прокариот и эукариот. Эффективность метода. Методы подтверждения нецелевых мутаций в предсказанных сайтах. Методы скрининга нецелевых мутаций по всему геному: Полногеномное секвенирование, Секвенирование полного экзона, Хроматин-иммунопреципитационное секвенирование (ChIP-seq), Полногеномное определение двунитевых разрывов с помощью секвенирования, Полногеномное секвенирование транслокаций, опосредованное линейной амплификацией, Селективное обогащение и идентификация меченых концов геномной ДНК с помощью секвенирования и др. Идентификация колоний клеток, несущих множественные мутации генов посредством прямого скрининга, а также с использования системы селективных маркеров.

5. ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ ОСВОЕНИИ ДИСЦИПЛИНЫ

5.1. Дисциплина реализуется классическими образовательными технологиями (лекции, практические занятия, самостоятельная работа). При организации изучения дисциплины предусматривается широкое использование активных форм проведения занятий (групповые дискуссии) в сочетании с внеаудиторной и практической работой для формирования и развития профессиональных навыков обучающихся в соответствии с требованиями по направлению подготовки.

Самостоятельная работа включает самостоятельное освоение определенных разделов теоретического материала, подготовку к практическим занятиям.

Целью организации самостоятельной работы аспирантов по дисциплине является получение глубоких дополнительных знаний о предметной области и приобретение умений по основам самостоятельной работы.

Самостоятельное изучение теоретического курса аспирантом включает следующие виды деятельности:

- конспектирование и реферирование первоисточников и другой научной и учебной литературы;
- проработку учебного материала (по конспектам, учебной и научной литературе);
- изучение учебного материала, перенесенного с аудиторных занятий на самостоятельную проработку;
- выполнение переводов научных текстов с иностранных языков;

5.2. Формы контроля. Текущий контроль проводится в форме собеседования по пройденному материалу. Промежуточный контроль проводится в форме зачета (собеседование).

5.3. Итоговая аттестация проводится в форме устного ответа по билетам (дифференцированного зачета).

ВОПРОСЫ ДЛЯ БИЛЕТОВ

1. Особенности микроскопического метода исследования?
2. Особенности культурального метода исследования?
3. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам?
4. Особенности биологического метода исследования?
5. Моделирование экспериментальных инфекций у чувствительных животных?
6. Использование ПЦР для лабораторной диагностики инфекционных болезней?
7. Использование ПЦР для клонирования генов?
8. Генотипирование микроорганизмов. Применение генотипирования в научных исследованиях и при проведении эпидемиологических исследований?
9. Принципы полимеразной цепной реакции, ее разновидности?
10. Принципы организации диагностической ПЦР-лаборатории?
11. Метод ПЦР в реальном времени. Разновидности и область применения ПЦР-РВ?
12. Метод LAMP, суть, применение?
13. Цифровая ПЦР, суть, применение?
14. Применение технологии высокопроизводительного параллельного секвенирования для решения задач бактериологии?
15. Способы анализа генов и геномов микроорганизмов?
16. Что такое биоинформационный анализ? Где и когда его применяют?
17. Принцип работы секвенаторов Illumina?
18. Принцип работы секвенатора Ion Torrent?
19. Что позволяет определять анализ геномов *de novo*?
20. Основные иммунологические методы исследований?
21. Учение об иммунитете. Понятие врожденного и адаптивного иммунитета?
22. Классификация антигенов?
23. Трансформация, суть метода, механизм трансформации?
24. Клонирование, суть метода, основные этапы?
25. Направленный сайт-мутагенез. Суть, преимущества, недостатки и области применения?
26. Применение нуклеаз с «цинковыми пальцами». Суть, преимущества, недостатки и области применения?
27. TALE-нуклеазы, их применение в науке, биотехнологии?
28. Системы CRISPR/Cas для направленного редактирования генома, их преимущества, недостатки и области применения?
29. Использование CRISPR/Cas систем в диагностике инфекционных заболеваний?
30. Методы определения неспецифической активности систем редактирования генома?

6. УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ И ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Основная литература:

1. Современная микробиология. Прокариоты; в 2 т. / Под.ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. Москва: Мир, 2014. (Лучший зарубежный учебник) *Biology of the Prokaryotes*, Stuttgart, New York, Blackwell.
2. Медицинская и санитарная микробиология: Уч. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Ширококов. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.
3. Руководство по медицинской микробиологии. Кн.1: Общая санитарная микробиология. Кн.1 / Под ред. Лабинской А.С., Волиной Е.Г. – 2008. – 1080 с.
4. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С.– М.: Издательство «Медицина», 2016. – 576 с.
5. Патрушев Л. И. Искусственные генетические системы. — М.: Наука, 2005. — В 2 т. — ISBN 5-02-033278-X
6. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы / И.А. Дятлов, В.В. Кутырев, М.В. Храмов - Москва, 2012 г. – 415 с.
7. ПЦР «в реальном времени» / Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др.; под ред. Д.б.н. Д.В. Ребрикова; предисл. Л.А. Остермана и акад. РАН И РАСХН Е.Д. Свердлова; 2-е изд., исправ. И доп. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.: ил. ISBN 978-5-9963-0086-0
8. NGS: высокопроизводительное секвенирование / Д.В. Ребриков и др.; под общей редакцией Д.В. Ребрикова. – 2-е изд. – М.:БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – 232 с.: ил.
9. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с. Англ. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с., ил. ISBN 5-03-003060-3
10. Шуваева, Г.П. Микробиология с основами биотехнологии (теория и практика) / Г.П. Шуваева, Т.В. Свиридова, О.С. Корнеева. Воронеж: ВГУИТ, 2017.
11. Льюин, Б. Гены / Б. Льюин. – Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 896 с.

Дополнительная литература:

1. *Щелкунов С. Н.* Генетическая инженерия. — Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. — 496 с.; илл. — ISBN 5-94087-098-8
2. Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. - Москва: Техносфера, 2012. - 176 с.+ 4 с. цв. вкл. ISBN 978-5-94836-334-9
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. — М.: Мир, 2002. — 589 с., илл. — ISBN 5-03-003328-9
4. Тимочко, В.Р. Теория ошибок real-time ПЦР / В.Р. Тимочко. Руководство. М.: ГЭОТАР, 2018 - 256 с.
5. Браун, Т.А. Геномы / Т.А. Браун. – Москва: Институт компьютерных исследований, 2011. – 944 с.
6. Уилсон, К. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии / К. Уилсон, Д. Уолкер. – Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2013. – 848 с. [Электронный

Информационно-справочные и поисковые системы:

Сайты для поиска информации:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (свободный доступ)
- <http://highwire.stanford.edu/> (свободный доступ)
- <http://elibrary.ru/defaultx.asp> (свободный доступ)
- www.molbiol.ru (свободный доступ)
- www.who.int/en (свободный доступ)
- www.asm.org (свободный доступ)
- www.escmid.org (свободный доступ)
- <http://www.protocol-online.org/prot/Microbiology/index.html> (свободный доступ)
- <http://www.restrictionmapper.org/> (свободный доступ)
- <https://pubmlst.org/> (свободный доступ)
- <https://services.healthtech.dtu.dk/> (свободный доступ)
- <https://www.cdc.gov/> (свободный доступ)
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (свободный доступ)
- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (свободный доступ)
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (свободный доступ)
- <https://www.ebi.ac.uk/> (свободный доступ)
- <http://www.illumina.com> (свободный доступ)
- <http://www.appliedbiosystems.com> (свободный доступ)
- <http://www.polonator.org/> (свободный доступ)
- <http://www.helicosbio.com> (свободный доступ)
- <http://www.pacificbiosciences.com> (свободный доступ)
- <http://www.nanoporetech.com> (свободный доступ)
- <http://www.roche-applied-science.com> (свободный доступ)

7. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» имеет специальные помещения для проведения занятий лекционного типа, занятий семинарского типа, групповых и индивидуальных консультаций, текущего контроля и промежуточной аттестации, а также помещения для практической и самостоятельной работы, помещения для хранения и профилактического обслуживания оборудования. Специальные помещения укомплектованы специализированной мебелью и техническими средствами обучения, служащими для представления информации большой аудитории. Для демонстрации лекций, наглядных материалов во время занятий имеется экран, компьютер, мультимедийный проектор.

Помещения для самостоятельной работы обучающихся оснащены компьютерной техникой с возможностью подключения к сети "Интернет" и обеспечением доступа в электронную информационно-образовательную среду организации.

Практические занятия проводятся в специализированных лабораторных помещениях учреждения с наличием ламинарных шкафов для проведения микробиологических, биохимических, иммунологических работ и генетических работ, а также специального лабораторного и приборного оборудования.