

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
роботи та розвитку

_____ С.М. Кваша
« ____ » _____ 2022р.

РОЗГЛЯНУТО І СХВАЛЕНО

на засіданні Вченої ради факультету
ветеринарної медицини

Протокол № ____ від « ____ » _____ 2022 р.
Декан факультету _____ М.І. Цвіліховський

на засіданні кафедри біохімії і фізіології тварин

Протокол № ____ від « ____ » _____ 2022 р.
Завідувач кафедри _____ В.А. Томчук

**РОБОЧА ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
НОВІТНІ МЕТОДИ У БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ**

Рівень вищої освіти – третій (освітньо-науковий) рівень

Галузь знань – 09 Біологія

Спеціальність – 091 «Біологія»

Освітньо-наукова програма – БІОЛОГІЯ

Гарант ОНП – Л.Г. Калачнюк

Розробники: д.б.н., проф. Калачнюк Л. Г., к. б. н., доц., Цвіліховський В. І.
кафедра біохімії і фізіології тварин; к.вет.н., с.н.с. Іщенко Л.М., УЛЯБП АПК

Київ 2022

1. Опис навчальної дисципліни

НОВІТНІ МЕТОДИ У БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

(назва)

Галузь знань, спеціальність, освітній ступінь		
Галузь знань	09 Біологія	
Освітньо-науковий рівень	Третій	
Освітній ступінь	доктор філософії	
Спеціальність	091 «Біологія»	
Освітньо-наукова програма	Біологія	
Характеристика навчальної дисципліни		
Вид	вибіркова	
Загальна кількість годин	150	
Кількість кредитів ECTS	5	
Кількість змістових модулів	Не передбачено	
Курсовий проект (робота)	Не передбачено	
Форма контролю	екзамен	
Показник навчальної дисципліни для денної та заочної форми навчання		
	денна форма навчання	заочна форма навчання
Рік підготовки (курс)	1	1
Семестр	2	2
Лекційні заняття	20	20
Практичні, семінарські заняття		
Лабораторні заняття	20	20
Самостійна робота	110	110
Індивідуальні завдання		
Кількість тижневих аудиторних годин для денної форми навчання	4	4

2. Мета та завдання навчальної дисципліни

Предметом дисципліни «Новітні методи у біологічних дослідженнях» є питання методичних підходів із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) за вивчення і характеристики біохімічних процесів у біоб'єктах.

Мета дисципліни «Новітні методи у біологічних дослідженнях» - сформувати в аспірантів цілісну систему знань, до якої входитимуть теоретичні й методичні основи використання полімеразної ланцюгової реакції у біологічних дослідженнях.

Завдання курсу «Новітні методи у біологічних дослідженнях» освоїти основні методичні підходи із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції за характеристики біохімічних процесів у біоб'єктах, а також вивчити переваги, обмеження та етичні питання використання ПЛР у біологічних дослідженнях.

Основними компетентностями, якими повинен володіти здобувач під вивчення дисципліни є:

- здатність виявляти, формулювати та вирішувати проблеми дослідницького характеру в галузі біології, оцінювати та забезпечувати якість досліджень, які проводять;
- здатність дотримуватись етики досліджень, а також правил академічної доброчесності в наукових дослідженнях та науково-педагогічній діяльності;
- здатність до ретроспективного аналізу наукового доробку у напрямі дослідження біохімічних процесів у живих організмах;
- здатність до абстрактного мислення, аналізу та синтезу;
- здатність генерувати нові науково-теоретичні та практично спрямовані ідеї (креативність);
- комплексність у володінні інформацією щодо сучасного стану і тенденцій розвитку світової і вітчизняної біологічної науки;
- комплексність у розробці та реалізації наукових проектів та програм;

- комплексність у прийнятті обґрунтованих рішень.

У результаті вивчення дисципліни здобувач повинен:

знати:

- основні теоретичні та методичні аспекти проведення полімеразної ланцюгової реакції ;
- ефективність та доцільність використання полімеразної ланцюгової реакції у біологічних дослідженнях.

вміти:

- проводити основні етапи полімеразної ланцюгової реакції (екстракція нуклеїнових кислот, проведення ампліфікації, інтерпретація результатів);
- створювати нові знання через оригінальні дослідження, якість яких може бути визнана на національному та міжнародному рівнях;
- брати участь у наукових дискусіях на міжнародному рівні, відстоювати свою власну позицію на конференціях, семінарах та форумах;
- брати участь у критичному діалозі та зацікавити результатами дослідження;
- проводити критичний аналіз різних інформаційних джерел, конкретних освітніх, наукових та професійних текстів у галузях біологічних наук;
- критично сприймати та аналізувати чужі думки й ідеї, шукати власні шляхи вирішення проблеми, здійснювати критичний аналіз власних матеріалів;
- генерувати власні ідеї та приймати обґрунтовані рішення.

3. Програма і структура навчальної дисципліни повного терміну денної (заочної) форми навчання

Тема лекційного заняття 1. Полімеразна ланцюгова реакція

Історія відкриття. Основні принципи. Обмеження, переваги та етика використання у біологічних дослідженнях.

Тема лекційного заняття 2. Загальні вимоги до організації роботи у ПЛР-лабораторії

Поняття контамінації нуклеїновими кислотами і продуктами ампліфікації. «Чиста» і «брудна» зони у ПЛР-лабораторії. Етапи проведення ПЛР. Екстракція нуклеїнових кислот, ампліфікація.

Тема лекційного заняття 3. Основні аспекти горизонтального електрофорезу продуктів ампліфікації полімеразної ланцюгової реакції

Підготовка проб для електрофоретичного аналізу ампліфікаційних продуктів. Підготування гелю для розділення продуктів ампліфікації та їх детекція.

Тема лекційного заняття 4. Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі

Характеристика флуоресцентних барвників. Основні підходи до мультиплексного аналізу. Ефективність та лінійність полімеразної ланцюгової реакції. Граничний цикл (Ct). Обладнання для ПЛР у реальному часі.

Тема лекційного заняття 5. Модифікації полімеразної ланцюгової реакції, їх особливості

Характеристика зворотної та гніздової ПЛР та ефективність їх використання.

Структура навчальної дисципліни

Назви змістових модулів і тем	Кількість годин											
	денна форма						Заочна форма					
	усь ого	у тому числі					усьо го	у тому числі				
		л	п	ла б	ін д	с.р.		л	п	ла б	і н д	с.р.
Тема 1. Полімеразна ланцюгова реакція	33	4		4		25	33	4		4		25
Тема 2. Загальні вимоги до організації роботи у ПЛР-лабораторії	33	4		4		25	33	4		4		25
Тема 3. Основні аспекти горизонтального електрофорезу продуктів ампліфікації полімеразної ланцюгової реакції	33	4		4		25	33	4		4		25
Тема 4. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі	33	4		4		25	33	4		4		25
Тема 5. Модифікації полімеразної ланцюгової реакції, їх особливості	18	4		4		10	18	4		4		10
Усього годин	150	20		20		110	150	20		20		110

4. Теми лабораторних занять

№ п/п	Назва теми	Кількість годин
1	2	3
1.	Виділення дезоксирибонуклеїнової кислоти методом сорбції на оксиді кремнію. Принцип методу. Підготовка реактивів, матеріалів та обладнання. Етапи виконання. Пояснення ризику контамінації на етапі екстракції ДНК.	4
2.	Проведення полімеразної ланцюгової реакції на прикладі ідентифікації гену, специфічного для великої рогатої худоби. Принцип методу. Підготовка реактивів, матеріалів та обладнання. Приготування реакційного середовища для ПЛР. Етапи виконання.	4
3.	Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації в агарозному гелі. Підготовка реактивів, матеріалів та обладнання. Приготування агарозного гелю. Етапи виконання.	4
4.	Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі на прикладі ідентифікації гену лектину сої. Принцип методу. Підготовка реактивів, матеріалів та обладнання. Приготування реакційного середовища для ПЛР. Етапи виконання. Інтерпретація результатів.	4
5.	Проведення мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції на прикладі ідентифікації генетично модифікованої сої. Принцип методу. Підготовка реактивів, матеріалів та обладнання. Приготування реакційного середовища для ПЛР. Етапи виконання. Інтерпретація результатів.	4
Всього		20

5. Контрольні питання, комплекти тестів для визначення рівня засвоєння знань здобувачами.

1. Дати визначення полімеразної ланцюгової реакції.
2. Які модифікації полімеразної ланцюгової реакції Ви знаєте?
3. Назвіть речовини, які можуть інгібувати ПЛР.
4. Дайте визначення контамінації.
5. Що таке «чиста» та «брудна» зона у ПЛР-лабораторії?
6. Що таке «гніздова» полімеразна ланцюгова реакція?
7. Вказати послідовність стадій полімеразної ланцюгової реакції.
8. Що таке праймери?

9. Принцип виділення ДНК на оксиді кремнію.
10. З якою метою використовують ензим протеїназу К за екстракції ДНК?
11. Яка довжина хвилі спектрофотометра використовується для визначення концентрації ДНК?
12. Вкажіть основні компоненти реакційного середовища для полімеразної ланцюгової реакції.
13. Яка роль магнію хлориду у реакційному середовищі для ПЛР?
14. У якому напрямку відбувається видовження ланцюгів ДНК при елонгації?
15. Який оптимум дії Taq-ДНК-полімерази?
16. Який барвник використовується для візуалізації продуктів ампліфікації при проведенні електрофорезу в агарозному гелі?
17. Що таке мультиплексна ПЛР?
18. Що таке ПЛР у реальному часі? Її переваги.
19. Яка роль флуоресцентних барвників у проведенні ПЛР в реальному часі?
20. Перелічіть флуоресцентні барвники, які найчастіше використовують для ПЛР в реальному часі.
21. Що таке граничного циклу Ct у ПЛР у реальному часі?
22. Які матеріали і речовини використовуються для електрофоретичного розділення ДНК, РНК і протеїнів?
23. Типи електрофоретичних систем для розділення біологічних молекул.
24. Характеристика розділення фрагментів біологічних зразків у електрофоретичних системах залежно від їх розмірів і заряду.
25. Яким чином оцінюється чистота біологічних зразків?
26. Спектрофотометричне обладнання та детектори, які використовуються для кількісного визначення, чистоти біопрепаратів і спектральної характеристики ДНК, РНК.
27. Приклади барвників, які застосовують у електрофоретичних системах розділення фрагментів нуклеїнових кислот.
28. Який принцип методу електрофоретичного розділення біопроб?

29. Дати визначення електрофорезу.
30. Яким чином можна оцінити масу чи розмір біопрепарату за допомогою електрофорезу?

6. Методи навчання

Основними видами навчальних занять дисципліни «Новітні методи у біологічних дослідженнях» є заняття: аудиторні (лекція, лабораторне заняття, консультація) та позааудиторні - самостійна робота аспірантів.

7. Форми контролю

1. Усний і письмовий поточний контроль знань.
2. Формою самостійної роботи здобувача є вивчення спеціальної літератури та виконання індивідуальних завдань.
3. Екзамен.

8. Методичне забезпечення

Науково-методичне забезпечення навчального процесу передбачає: державні стандарти, навчальні плани, підручники і навчальні посібники; інструктивно-методичні матеріали лабораторних занять; індивідуальні навчально-дослідні завдання; контрольні роботи; текстові та електронні варіанти тестів для поточного і підсумкового контролю, методичні матеріали для організації самостійної роботи здобувачів.

9. Рекомендована література

Основна література

1. Ishchenko L., Ushkalov V., Vygovska L. Principles of molecular diagnostics / in Laboratory practice. Manual / edited by M.Klopčič and T.Ishchenko. –SMC VFPO. – Kyiv. 2020. – 280p. (колективний посібник) <http://www.ag-lab.org/sites/default/files/manuals/Structure%20of%20the%20manual%20and%20WG.pdf>

2. Курс лекцій і методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт з дисципліни: «Спеціальна біохімія», частина 3: «Основи методичних підходів молекулярної діагностики» для студентів факультету ветеринарної медицини / С.Д. Мельничук, Л.Г. Калачнюк, Г.І. Калачнюк. К: Видавничий центр НУБіП України, 2014. – 196 с.
3. Спеціальна біохімія: навчальний посібник для підготовки фахівців освітнього рівня «Магістр» у вищих навчальних закладах зі спеціальності “Ветеринарна медицина” за спеціалізацією “Лабораторна справа”/ С.Д. Мельничук, Д.О. Мельничук, С.В. Хижняк, В.А. Грищенко, В.А. Томчук, Л.Г. Калачнюк, Н.М. Мельникова, Л.В. Кліх, Т.М. Кучмеровська, В.І. Цвіліховський, Є.А. Деркач, О.М. Тупицька ; за ред. чл.-кор. НААН України С.Д. Мельничука. – К.: НУБіП України, 2015. – 649 с.
4. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени / Ребриков Д. В., Саматон Г.А., Трофимов Д. Ю. – [2-е изд. испр. и доп.]. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
5. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Глик Б., Пастернак Дж. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
6. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / [под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги ; пер. с англ.]. – М. : Мир, 1999. – 558 с.
7. Сингер М. Гены и геномы / Сингер М., Берг П. – М.: Мир, 1998. – 373с.
8. White T. J. The polymerase chain reaction: clinical applications / T. J. White, R. Madej, D. H. Persing, H. A. Erlich // Adv. Clin. Chem. – 1992. – V. 29. – P. 161–196.
9. Стегній Б. Т. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях : наук.-метод. посіб. / Б. Т. Стегній, А. П. Герілович, О. Ю. Лиманська ; ред. Б. Т. Стегній, А. П. Герілович. — Х. : НТМТ, 2010. — 227 с.

Додаткова література

1. Калачнюк Л.Г. Молекулярні механізми регуляції метаболічних процесів за дії екзогенних чинників (монографія). – К: Компрінт, 2016. – 361 с.
2. Калачнюк Л.Г. Трансляційні і транс-трансляційні процеси у клітині та окремі механізми їх регуляції (монографія). – К: Компрінт, 2017. – 155 с.
3. Аналітичні методи досліджень. Імунологічні методи аналізу і методи виявлення генетично модифікованих організмів та їх інгредієнтів: теоретичні основи і методики. Войціцький В.М., Стародуб М.Ф., Хижняк С.В., Іщенко Л.М. – К.: ЦП «Компрінт», 2018.
4. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions // R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson // Biotechnology. – 1993. – V. 11. – P. 1026-1030

5. Longo M. C. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions / M. C. Longo, M. S. Berninger, J. L. Hartley // *Gene*. – 1990. – V. 93(1). – P. 125-128
6. Умови проведення полімеразної ланцюгової реакції у лабораторній практиці (методичні аспекти) / М.С. Калачнюк, Л. Г. Калачнюк, Д. О. Мельничук [та ін.] // *Біологія тварин*. – 2012. – Т. 14, № 1–2.
7. Визначення чутливості та специфічності засобу для виявлення *Salmonella spp* методом ПЛР-РЧ / Іщенко Л., Виговська Л., Давидовська Л., Калакайло Л., Іщенко В., Ушкалов В., Данчук В.В., Калачнюк Л. // Матеріали XV Міжнародної науково-практичної конференції «Біологічно активні препарати в рослинництві. Наукове обґрунтування – Рекомендації – Практичні результати» Київ, 25-29 червня 2019 року. С. 125-126.
8. Вдосконалення способу виявлення генів β -лактамаз (група *ctx-m*- β -лактамази) у бактерій групи кишкової палички методом ПЛР / Іщенко Л., Виговська Л., Калакайло Л., Данчук В.В., Ушкалов В., Калачнюк Л., Давидовська Л. // Матеріали XV Міжнародної науково-практичної конференції «Біологічно активні препарати в рослинництві. Наукове обґрунтування – Рекомендації – Практичні результати» Київ, 25-29 червня 2019 року. С. 128-129.
9. Обухов И.Л. Использование полимеразной цепной реакции в практических лабораториях / И.Л. Обухов, К.Н. Груздев, А.Н. Панин // *Ветеринария*. – 1997. – № 2. – С. 24–26.
10. Aslanzadeh J. Preventing PCR Amplification Carryover Contamination in a Clinical Laboratory / J. Aslanzadeh // *Ann. Clin. Lab. Sci.* Fall. – 2004. – V. 34(4). – P. 389–396.
11. Ballagi-Pordany A. The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR // A. Ballagi-Pordany, S. Belak / *Mol. Cell. Probes*. – 1996. – V. 10. – P. 159–164.
12. Якісне і кількісне визначення генетично модифікованих сільськогосподарських культур та їх компонентів в продуктах харчування й кормах методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (Методичні рекомендації) // В. Г. Спиридонов, Л. М. Іщенко, А. В. Плотницька, М. Ф. Парій, К. Ф. Шитюк, С. Д. Мельничук, М. Д. Мельничук, І. П. Григорюк. – К.: Видавничий центр НУБіП України, 2010. – 38с.
13. Біологічна безпека: Результати моніторингу агроресурсів, продукції АПК та харчових продуктів за 2014-2016 роки. Ушкалов В.О., Данчук В.В., Самкова О.П., Баранов Ю.С. [та ін]. *Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник*. – Харків, 2017. – № 103. – С. 88-92.
14. Підбір праймерів та оптимізація методу ПЛР для детекції ДНК вірусу АЧС / С. С. Мандигра, Л. М. Музикіна, Л. М. Іщенко, І. В. Галка, В. Г.

- Спиридонов, М. П. Ситюк, С. А. Ничик // Ветеринарна медицина. – 2017. – № 103. – С. 304–306.
15. Розробка тест-системи для диференційної діагностики африканської та класичної чуми свиней методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу / С. С. Мандигра, Л. М. Музикіна, Л. М. Іщенко, Г. А. Коваленко, І. В. Галка, М. П. Ситюк, С. А. Ничик, В. Г. Спиридонов // Ветеринарна біотехнологія. – № 31. – 2017. – С. 103–111.
16. Іщенко Л.М., Музикіна Л.М., Коваленко Г.А, Галка І.В., Гудзь Н.В., Ничик С.А., Спиридонов В.Г. Нодулярний дерматит великої рогатої худоби: епізоотологія, характеристика збудника, діагностика. (оглядова стаття) // Ветеринарна біотехнологія. – 2017. – №31 – С. 58-68.
17. Валідація ЗТ-ПЛР тест-системи для диференційної діагностики африканської та класичної чуми свиней / С.С. Мандигра, Л.М. Музикіна, Л.М. Іщенко, Г.А. Коваленко, І.В. Галка, В.Г. Спиридонов, М.П. Ситюк, С.А. Ничик, С.Д. Мельничук // Наукові доповіді НУБіП України. – 2017. V.6 (70). – С.
18. Ушкалов В.О., Данчук В.В., Спиридонов В.Г., Іщенко Л.М., Андреев І.В., Калакайло Л.І., Новгородова О.Ю., Бублик О.О. / Обіг генетично модифікованих речовин в Україні // Вісник аграрної науки. – 2018. №3 (780). С. 45-50. http://agrovisnyk.com/archive_en_2018_03_08.html
19. Іщенко Л.М., Андреев І.В., Плотницька А.В., Шинкаренко Л.М., Калакайло Л.І., Колесникова Т.П., Ушкалов В.О. / Використання молекулярно-генетичних методів дослідження для контролю якості та безпеки продукції агропромислового комплексу // Ветеринарна біотехнологія. – 2018. – №32 (1). – С. 98-105.
20. Конструювання та апробація праймерів для детекції вірусу нодулярного дерматиту великої рогатої худоби методом ПЛР у реальному часі Л.М. Іщенко, Г.А. Коваленко, Л.М. Музикіна, С.С. Мандигра, І.В. Галка, С.А. Ничик, В.Г. Спиридонов // Ветеринарна біотехнологія. – 2018. – №32 (2). – С. 202-208. http://vetbiotech.kiev.ua/volumes/JRN32/2_25.pdf
21. Апробація ЗТ-ПЛР тест-системи для диференційної діагностики африканської та класичної чуми свиней / С.С. Мандигра, Л.М. Музикіна, Л.М. Іщенко, Г.А. Коваленко, І.В. Галка, В. Г. Спиридонов, С.А. Ничик // Науковий вісник ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. – № 20(83). – 2018. – С. 221–225. <https://doi.org/10.15421/nvlvet8343>

Інформаційні ресурси

1. Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
2. Методи класичної і молекулярної біології (<http://molbiol.ru/>)
3. Web-сторінки «Вікіпедії» та інших інтернет-ресурсів