

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова

Кафедра экологии и зоологии

УТВЕРЖДАЮ

Декан факультета биологии и экологии



О.А. Маракаев
«19» мая 2023 г.

Рабочая программа
«Методы молекулярной филогенетики»

Направление подготовки
06.03.01 Биология

Направленность (профиль)
«Биоинженерия и биотехнология»

Форма обучения
очная

Программа одобрена
на заседании кафедры
протокол № 7 от «14» апреля 2023 года

Программа одобрена
НМК факультета биологии и экологии
протокол № 8 от «28» апреля 2023 года

Ярославль

1. Цели освоения дисциплины.

Целями освоения дисциплины «Методы молекулярной филогенетики» являются: получение знаний, умений и практических навыков в области молекулярно-эволюционного анализа генетических последовательностей.

2. Место дисциплины в структуре образовательной программы.

Дисциплина «Методы молекулярной филогенетики» относится к части, формируемой участниками образовательных отношений Блока 1.

Для освоения данной дисциплиной студенты должны пройти дисциплины «Молекулярная биология» и «Теория эволюции», а также обладать основами знаний по ботанике, зоологии, микробиологии, генетике, органической химии и информационным технологиям.

Полученные в курсе «Методы молекулярной филогенетики» знания необходимы для изучения последующих дисциплин «Молекулярная диагностика» и «Генетическая безопасность», а также для продолжения обучения в магистратуре по направлению Биология.

3. Планируемые результаты обучения по дисциплине, соотнесенные с планируемыми результатами освоения образовательной программы.

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих элементов компетенций в соответствии с ФГОС ВО, ООП ВО и приобретения следующих знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности:

Формируемая компетенция (код и формулировка)	Индикатор достижения компетенции (код и формулировка)	Перечень планируемых результатов обучения
Профессиональные компетенции		
ПК-2. Способен исследовать молекулярные основы функционирования природных и искусственных биосистем, проводить биотехнологический процесс с использованием клеточных культур.	ПК-2.1. Применяет знания и навыки исследования функционирования природных и искусственных биосистем, владеет методами ведения и использования клеточных культур в биотехнологиях.	Знать: -основные понятия молекулярной филогенетики; -компьютерные программы для филогенетического анализа. Уметь: -работать с базами генетических данных; - работать с современным оборудованием для проведения молекулярного филогенетического анализа. Владеть навыками: -построения филогенетических деревьев; -оценки достоверности получаемых филогенетических деревьев с использованием статистических методов.

<p>ПК-3. Способен использовать основные средства и методы контроля качества материалов и продукции при решении проектных биотехнологических задач.</p>	<p>ПК-3.2. Участвует в разработке и реализации проектов с учетом правил и норм техники безопасности и охраны труда, соблюдения требований нормативно-правовой и технической документации.</p>	<p>Знать: -правила работы в молекулярно-генетической лаборатории, современную аппаратуру и вычислительные комплексы.</p> <p>Уметь: - применять существующие в РФ нормативные документы в области использования молекулярно-генетических методов анализа при разработке и реализации проектов.</p> <p>Владеть навыками: - работы с нормативной документацией в области использования молекулярно-генетических методов анализа при разработке и реализации проектов.</p>
---	--	--

4. Объем, структура и содержание дисциплины.

Общая трудоемкость дисциплины составляет 4 зачетные единицы, 144 ак. часа.

№ п/п	Темы (разделы) дисциплины, их содержание	Семестр	Виды учебных занятий, включая самостоятельную работу студентов, и их трудоемкость (в академических часах)						Формы текущего контроля успеваемости Форма промежуточной аттестации (по семестрам)
			Контактная работа					самостоятельная работа	
			лекции	практические	лабораторные	консультации	аттестационные испытания		
1	Молекулярная филогенетика как наука: цель, задачи и место в системе наук. Ключевые этапы филогенетического анализа: выделение ДНК, методы секвенирования ДНК (NGS), биоинформационный анализ генетических последовательностей.	7	12	4	6	4		10	Устный опрос
2	Концепция молекулярных часов и нейтральная теория молекулярной эволюции.	7	2						
3	Методы выравнивания генетических последовательностей.	7	4	6	2	2		10	Задания для самостоятельной работы
4	Генетические дистанции и эволюционные модели.	7	4	6	2	2		10	Устный опрос
5	Филогенетический анализ. Построение филогенетических деревьев. Дистанционные методы, их принципы. Метод UPGMA. Метод минимума эволюции. Методы анализа дискретных признаков, их принципы. Метод	7	6	4	10	2		10	Задания для самостоятельной работы

	максимальной экономии. Метод максимального правдоподобия. Статистическая оценка эволюционных деревьев: бутстреп-анализ.								
6	Компьютерные программы для эволюционного анализа.	7	2	4				10	Устный опрос
							0,3	9,7	Зачет
	ИТОГО		30	24	20	10	0,3	59,7	

4.1 Информация о реализации дисциплины в форме практической подготовки.

№ п/п	Темы (разделы) дисциплины, их содержание	Семестр	Виды учебных занятий, включая самостоятельную работу студентов, и их трудоемкость (в академических часах)						Место проведения занятий в форме практической подготовки
			Контактная работа						
			лекции	практические	лабораторные	консультации	аттестационные испытания	самостоятельная работа	
1	Молекулярная филогенетика как наука: цель, задачи и место в системе наук. Ключевые этапы филогенетического анализа: выделение ДНК, методы секвенирования ДНК (NGS), биоинформационный анализ генетических последовательностей.				6				Факультет биологии и экологии ЯрГУ
3	Методы выравнивания генетических последовательностей.				2				Факультет биологии и экологии ЯрГУ
4	Генетические дистанции и эволюционные модели.				2				Факультет биологии и экологии ЯрГУ
5	Филогенетический анализ. Построение филогенетических								

деревьев. Дистанционные методы, их принципы. Метод UPGMA. Метод минимума эволюции. Методы анализа дискретных признаков, их принципы. Метод максимальной экономии. Метод максимального правдоподобия. Статистическая оценка эволюционных деревьев: бутстреп-анализ.				10				Факультет биологии и экологии ЯрГУ
Итого				20				

5. Общие положения.

Содержание разделов дисциплины:

1. Тема № 1.

Молекулярная филогенетика как наука: цель, задачи и место в системе наук. Генетическая концепция вида. ДНК-штрихкодирование. Современная научная систематика. Эволюционная систематика. Филогеография. Трехдоменная организация жизни: археи, прокариоты и эукариоты. Исследования Карла Вёзе. Примеры исследований с использованием филогенетического анализа. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности. Генетический код. Мутации, их виды. Нуклеотидные замены. Транзиции, трансверсии, синонимичные и несинонимичные замены. Нуклеотидный и аминокислотный состав. Кодон, использование кодонов. Эволюция нуклеотидной последовательности. Консенсусные последовательности. Гомологичные признаки. Конвергенция.

Ключевые этапы филогенетического анализа. Основные этапы методов выделения ДНК из клеток: лизис клеток и ядра, удаление ингибиторов, инактивация клеточных нуклеаз, отделение ДНК от клеточной массы, очистка и концентрирование ДНК. Метод выделения ДНК с помощью органических растворителей (фенол, хлороформ), преимущества и недостатки метода. Метод выделения ДНК с помощью силики, преимущества и недостатки метода. Метод выделения ДНК на микроцентрифужных колонках, преимущества и недостатки. Метод выделения ДНК с помощью ионообменной смолы, преимущества и недостатки. Метод выделения ДНК с помощью магнитных частиц, преимущества и недостатки. Методы оценки количества и качества ДНК после выделения. Правила и техника безопасности при работе с ДНК. Необходимое оборудование для процедур выделения ДНК из клеток.

Что такое ПЦР? (механизм полимеразной цепной реакции). Компоненты реакционной смеси. Программы амплификации, дизайн праймеров и проб. ПЦР в режиме реального времени (Real-time PCR), преимущества перед ПЦР с детекцией по конечной точке. Способы визуализации результатов ПЦР в режиме реального времени. Методы количественного анализа данных ПЦР в реальном времени. Нормативная документация. Методы секвенирования ДНК второго поколения (NGS-технологии): приготовление библиотеки (дробление ДНК и лигирование адаптеров), амплификация фрагментов ДНК, регистрация сигнала, сборка сиквенса. Технологии секвенирования ДНК второго поколения: метод 454 (пиросеквенирования), полупроводниковое секвенирование,

секвенирование ДНК путем синтеза с обратимым терминованием Illumina. Технологии секвенирования ДНК третьего поколения. Ключевое отличие от методов второго поколения. Секвенирование единичных молекул ДНК с использованием обратимых терминовующих нуклеотидов (Pacific Biosciences) и секвенирование путем протаскивания ДНК через нанопоры (Oxford Nanopore).

2. Тема № 2.

Концепция молекулярных часов и нейтральная теория молекулярной эволюции. Установление и калибровка молекулярных часов. Тест относительных скоростей эволюции. Различные подходы к установлению молекулярных часов. Несоблюдение молекулярных часов, их причины и проблемы филогенетического анализа.

3. Тема № 3.

Методы выравнивания генетических последовательностей. Понятие о выравнивании генетических последовательностей, его цели и принципы. Алгоритмы выравнивания последовательностей. Принцип матрицы точек. Алгоритмы Нидлмана-Вунша и Смита-Уотермана. Глобальное и локальное выравнивание. Принципы динамического программирования при выравнивании последовательностей. Множественное выравнивание.

4. Тема № 4.

Генетические дистанции и эволюционные модели. Генетические дистанции: наблюдаемые, истинные и расчетные. Дистанции между нуклеотидными последовательностями и эволюционные модели. Модель Джукса-Кантора. Модель Кимуры. Модель Таджимы-Неи. Другие эволюционные модели, их сравнительная характеристика. Гамма-дистанции. Синонимичные и несинонимичные дистанции, их отношение. Аминокислотные дистанции, матрицы вероятностей аминокислотных замещений. Учет делеций и отсутствующей информации.

5. Тема № 5.

Филогенетический анализ. Построение филогенетических деревьев. Дистанционные методы, их принципы. Метод UPGMA. Метод минимума эволюции. Методы анализа дискретных признаков, их принципы. Метод максимальной экономии. Метод максимального правдоподобия. Статистическая оценка эволюционных деревьев: бутстреп-анализ.

6. Тема № 6.

Компьютерные программы для эволюционного анализа. Типы компьютерных программ. Программы для хранения и редактирования последовательностей. Международные базы генетических данных. Программы для выравнивания последовательностей. Программы для филогенетического анализа.

5. Образовательные технологии, в том числе технологии электронного обучения и дистанционные образовательные технологии, используемые при осуществлении образовательного процесса по дисциплине.

В процессе обучения используются следующие образовательные технологии:

Академическая лекция с элементами лекции-беседы – последовательное изложение материала, осуществляемое преимущественно в виде монолога преподавателя. Элементы лекции-беседы обеспечивают контакт преподавателя с аудиторией, что позволяет привлекать внимание студентов к наиболее важным темам дисциплины,

активно вовлекать их в учебный процесс, контролировать темп изложения учебного материала в зависимости от уровня его восприятия.

Практическое занятие – занятие, посвященное освоению конкретных умений и навыков по закреплению полученных на лекции знаний.

Лабораторная работа – организация учебной работы с реальными материальными и информационными объектами, экспериментальная работа с аналоговыми моделями реальных объектов.

Консультации – вид учебных занятий, являющийся одной из форм контроля самостоятельной работы студентов. На консультациях по просьбе студентов рассматриваются наиболее сложные моменты при освоении материала дисциплины, преподаватель отвечает на вопросы студентов, которые возникают у них в процессе самостоятельной работы.

6. Перечень лицензионного и (или) свободно распространяемого программного обеспечения, используемого при осуществлении образовательного процесса по дисциплине.

В процессе осуществления образовательного процесса по дисциплине используются:

- программы Microsoft Office;
- Adobe Acrobat Reader;
- программа PHYLIP <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>;
- программа BioEdit <https://bioedit.software.informer.com>;
- база генетических данных GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>;
- программа ClustalW <http://www.clustal.org>;
- программа MEGA <http://www.megasoftware.net>.

7. Перечень современных профессиональных баз данных и информационных справочных систем, используемых при осуществлении образовательного процесса по дисциплине (при необходимости).

В процессе осуществления образовательного процесса по дисциплине используются:

1. Автоматизированная библиотечно-информационная система «БУКИ-NEXT» http://www.lib.uniyar.ac.ru/opac/bk_cat_find.php
2. База генетических данных GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>.

8. Перечень основной и дополнительной учебной литературы, ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» (при необходимости), рекомендуемых для освоения дисциплины.

а) основная литература:

1. Кони́чев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология: Учебник для вузов / УМО по специальностям пед. образования. - М.: Академия, 2003. – 397 с.
http://www.lib.uniyar.ac.ru/opac/bk_cat_card.php?rec_id=307761&cat_cd=YARSU

б) дополнительная литература:

1. Биохимия и молекулярная биология: методические указания / Сост. Е.Л. Грачева, Г.А. Урванцева. - Ярославль: ЯрГУ, 2008. - 43 с.
http://www.lib.uni Yar.ac.ru/opac/bk_cat_card.php?rec_id=365467&cat_cd=YARSU

9. Материально-техническая база, необходимая для осуществления образовательного процесса по дисциплине.

Материально-техническая база, необходимая для осуществления образовательного процесса по дисциплине включает в свой состав специальные помещения:

- учебные аудитории для проведения занятий лекционного типа;
- учебные аудитории для проведения лабораторных и практических занятий;
- учебные аудитории для проведения групповых и индивидуальных консультаций;
- учебные аудитории для проведения текущего контроля и промежуточной аттестации;
- помещения для самостоятельной работы;
- помещения для хранения и профилактического обслуживания технических средств обучения.

Помещения для самостоятельной работы обучающихся оснащены компьютерной техникой с возможностью подключения к сети «Интернет» и обеспечением доступа к электронной информационно-образовательной среде ЯрГУ.

Химическая посуда, культуральная комната, спектрофотометр Unico UV/VIS 2802, микроскопы Альтами, амплификатор CFX96 (BioRad), амплификатор БИС, оборудование для выделения ДНК и гель-электрофореза, гель-документирующая видеосистема BioRad.

Автор:

Доцент кафедры
экологии и зоологии, к.б. н.



С.И. Сиделев

Приложение № 1
к рабочей программе дисциплины
«Методы молекулярной филогенетики»

Фонд оценочных средств
для проведения текущего контроля успеваемости
и промежуточной аттестации студентов
по дисциплине

1. Типовые контрольные задания и иные материалы,
используемые в процессе текущего контроля успеваемости.

Устный опрос по теме № 1.

Примерный список вопросов:

1. Молекулярная филогенетика как наука: цель, задачи и место в системе наук.
2. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности. Генетический код.
3. Мутации, их виды. Нуклеотидные замены. Транзиции, трансверсии, синонимичные и несинонимичные замены.
4. Нуклеотидный и аминокислотный состав. Кодон, использование кодонов. Эволюция нуклеотидной последовательности. Консенсусные последовательности.
5. Гомологичные признаки. Конвергенция.
6. Методы секвенирования ДНК второго поколения (NGS-технологии): приготовление библиотеки (дробление ДНК и лигирование адаптеров), амплификация фрагментов ДНК, регистрация сигнала, сборка сиквенса.
7. Технологии секвенирования ДНК второго поколения: метод 454 (пиросеквенирования).
8. Полупроводниковое секвенирование ДНК.
9. Секвенирование ДНК путем синтеза с обратимым терминированием Illumina.
10. Технологии секвенирования ДНК третьего поколения. Ключевое отличие от методов второго поколения. Секвенирование единичных молекул ДНК с использованием обратимых терминирующих нуклеотидов (Pacific Biosciences) и секвенирование путем протаскивания ДНК через нанопоры (Oxford Nanopore).

Устный опрос по теме № 4.

Примерный список вопросов:

1. Наблюдаемые генетические дистанции.
2. Истинные генетические дистанции.
3. Расчетные генетические дистанции.
4. Эволюционная модель Джукса-Кантора.
5. Эволюционная модель Кимуры.
6. Эволюционная модель Таджимы-Неи.
7. Гамма-дистанции.
8. Синонимичные и несинонимичные дистанции, их отношение.
9. Аминокислотные дистанции, матрицы вероятностей аминокислотных замещений.
10. Учет делеций и отсутствующей информации.

Устный опрос по теме № 6.

Примерный список вопросов:

1. Программы для хранения и редактирования последовательностей.
2. Программы для выравнивания последовательностей.
3. Программы для филогенетического анализа.
4. Программы для расчета параметров праймеров.
5. Программы для подбора праймеров.
6. Программы для депонирования генетических последовательностей.
7. Форматы записи нуклеотидных последовательностей.
8. Международные базы генетических данных.

Правила выставления оценки по результатам устного опроса: каждому студенту задается пять вопросов по выбору преподавателя, в зависимости от полноты и содержательности ответа студент может получить оценку от 0 до 5 баллов.

Задания для самостоятельной работы по теме № 3.

Студентам выдается хроматограмма с неизвестной нуклеотидной последовательностью ДНК. Задание заключается в самостоятельной обработке данной хроматограммы в программе BioEdit, поиске и устранении ошибок секвенирования. Затем студенты должны самостоятельно найти гомологичные сиквенсы ДНК в базе генетических данных GenBank выравниванием с помощью Blast и определить биологический вид, которому принадлежит проверенный ими сиквенс ДНК. Критерием успешного выполнения работы является правильное определение биологического вида по генетической последовательности

Задания для самостоятельной работы по теме № 5.

Студентам предлагается самостоятельно выбрать любую интересующую группу организмов (от вируса до человека), точнее конкретный род с набором видов. Самостоятельно провести поиск в генетической базе данных GenBank наличия тех или иных генетических маркеров у видов данного рода. Выбрать один генетический маркер, который есть в GenBank у всех видов данного рода организмов. Провести выравнивание нуклеотидной последовательности этого гена у разных видов организмов в программе MEGA. Корректно выбрать одну из эволюционных моделей. После этого построить филогенетическое дерево, провести бутстреп-анализ и сделать заключение о степени эволюционного родства видов. Критерием успешного выполнения работы является корректно построенное и правильно интерпретируемое эволюционное дерево. Каждый студент по итогам проделанной самостоятельной работы представляет презентацию своего проектного исследования перед группой.

Фонды оценочных средств по дисциплине предусматривают проверку индикаторов достижения компетенций.

2. Список вопросов и (или) заданий для проведения промежуточной аттестации.

Примерный список вопросов к зачету:

1. Молекулярная филогенетика как наука: цель, задачи и место в системе наук.
2. Генетическая концепция вида. ДНК-штрихкодирование.
3. Современная научная систематика. Эволюционная систематика. Трехдоменная организация жизни: археи, прокариоты и эукариоты. Исследования Карла Вёзе.
4. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности. Генетический код.
5. Мутации, их виды. Нуклеотидные замены. Транзиции, трансверсии, синонимичные и несинонимичные замены.
6. Нуклеотидный и аминокислотный состав. Кодон, использование кодонов. Эволюция нуклеотидной последовательности. Консенсусные последовательности.
7. Гомологичные признаки. Конвергенция.
8. Основные этапы методов выделения ДНК из клеток: лизис клеток и ядра, удаление ингибиторов, инактивация клеточных нуклеаз, отделение ДНК от клеточной массы, очистка и концентрирование ДНК.
9. Метод выделения ДНК с помощью органических растворителей (фенол, хлороформ), преимущества и недостатки метода.
10. Метод выделения ДНК с помощью силики, преимущества и недостатки метода.
11. Метод выделения ДНК на микроцентрифужных колонках, преимущества и недостатки.
12. Метод выделения ДНК с помощью ионообменной смолы, преимущества и недостатки.
13. Метод выделения ДНК с помощью магнитных частиц, преимущества и недостатки.
14. Методы оценки количества и качества ДНК после выделения.
15. Правила и техника безопасности при работе с ДНК. Необходимое оборудование для процедур выделения ДНК из клеток.
16. Что такое ПЦР? (механизм полимеразной цепной реакции). Компоненты реакционной смеси. Программы амплификации, дизайн праймеров и проб.
17. ПЦР в режиме реального времени (Real-time PCR), преимущества перед ПЦР с детекцией по конечной точке.
18. Способы визуализации результатов ПЦР в режиме реального времени.
19. Методы количественного анализа данных ПЦР в реальном времени.
20. Методы секвенирования ДНК второго поколения (NGS-технологии): приготовление библиотеки (дробление ДНК и лигирование адаптеров), амплификация фрагментов ДНК, регистрация сигнала, сборка сиквенса.
21. Технологии секвенирования ДНК второго поколения: метод 454 (пиросеквенирования).
22. Полупроводниковое секвенирование ДНК.
23. Секвенирование ДНК путем синтеза с обратимым терминированием Illumina.
24. Технологии секвенирования ДНК третьего поколения. Ключевое отличие от методов второго поколения. Секвенирование единичных молекул ДНК с использованием обратимых терминирующих нуклеотидов (Pacific Biosciences) и секвенирование путем протаскивания ДНК через нанопоры (Oxford Nanopore).
25. Концепция молекулярных часов и нейтральная теория молекулярной эволюции.
26. Установление и калибровка молекулярных часов. Тест относительных скоростей эволюции. Различные подходы к установлению молекулярных часов. Несоблюдение молекулярных часов, их причины и проблемы филогенетического анализа.
27. Понятие о выравнивании генетических последовательностей, его цели.

28. Принцип выравнивания последовательностей. Положительные оценки (сохранение нуклеотида) и штрафы (замены, пробелы). Критерий оптимального выравнивания.
29. Глобальное (алгоритм Нидлмана-Вунша) и локальное (алгоритм Смита-Уотермана). Выравнивание. Множественное выравнивание.
30. Генетические дистанции между нуклеотидными последовательностями: р-дистанции (наблюдаемые), истинные и расчетные дистанции. Ограничения использования р-дистанций.
31. Эволюционные модели: Джукса-Кантора. Модель Кимуры. Модель Таджимы-Неи. Другие эволюционные модели, их сравнительная характеристика.
32. Гамма-дистанции. Синонимичные и несинонимичные дистанции, их отношение.
33. Филогенетические деревья. Топология дерева. Виды деревьев.
34. Методы построения деревьев. Дистанционные методы, их принципы. Метод UPGMA.
35. Методы анализа дискретных признаков, их принципы. Метод максимальной экономии.
36. Статистическая оценка деревьев. Бутстреп-анализ.
37. Типы компьютерных программ. Программы для хранения и редактирования последовательностей. Международные базы генетических данных. Программы для выравнивания последовательностей. Программы для филогенетического анализа.

Правило выставления оценки на зачете.

Преподаватель задает десять вопросов из списка вопросов к зачету по своему усмотрению, охватывая все темы дисциплины. Студент должен отвечать на вопросы без подготовки. По итогам зачета выставляется одна из двух оценок: «зачтено» - если студент правильно отвечает на не менее чем 7 вопросов из 10, «незачтено» - если студент дает правильные ответы на менее чем 7 вопросов из 10.

Приложение № 2
к рабочей программе дисциплины
«Методы молекулярной филогенетики»

Методические указания для студентов по освоению дисциплины.

Обязательным условием освоения дисциплины является систематическое посещение курса лекций и 100% посещаемость лабораторных и практических занятий. Зачет проводится в устной форме. Для успешного освоения дисциплины важно знание лекционного материала, которое по ключевым темам проверяется с помощью заданий для самостоятельной работы и устного опроса. Основными критериями оценки при выполнении самостоятельной работы в процессе текущей аттестации являются своевременность выполнения работы, глубина проведенного анализа, предложенные студентом пути решения поставленных в работе задач, обоснованность выводов, способность студента вступать в дискуссии с преподавателем по теме самостоятельной работы, отстаивать свою точку зрения, приводить доводы в пользу тех или иных положений, искать противоречия в выдвинутых преподавателем тезисах, видеть слабые и сильные стороны обсуждаемых вопросов.