

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПРИКАРПАТСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТЕФАНІКА
Факультет природничих наук
Кафедра біохімії та біотехнології



СИЛАБУС НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

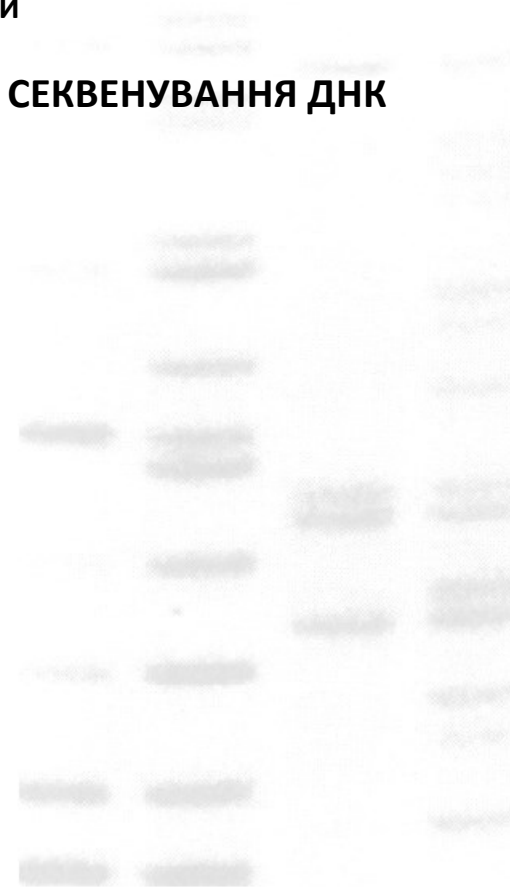
ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ (ПЛР) ТА СЕКВЕНУВАННЯ ДНК



Для спеціальностей
091 Біологія та біохімія

Освітній рівень Магістр

3 кредити ECTS
18 годин лекцій,
10 годин практичних робіт
12 годин лабораторних
50 годин – самостійна робота



Затверджено на засіданні
Кафедри біохімії та біотехнології
факультету природничих наук
Протокол № ____
від __ квітня 2024 р.

ОПИС КУРСУ

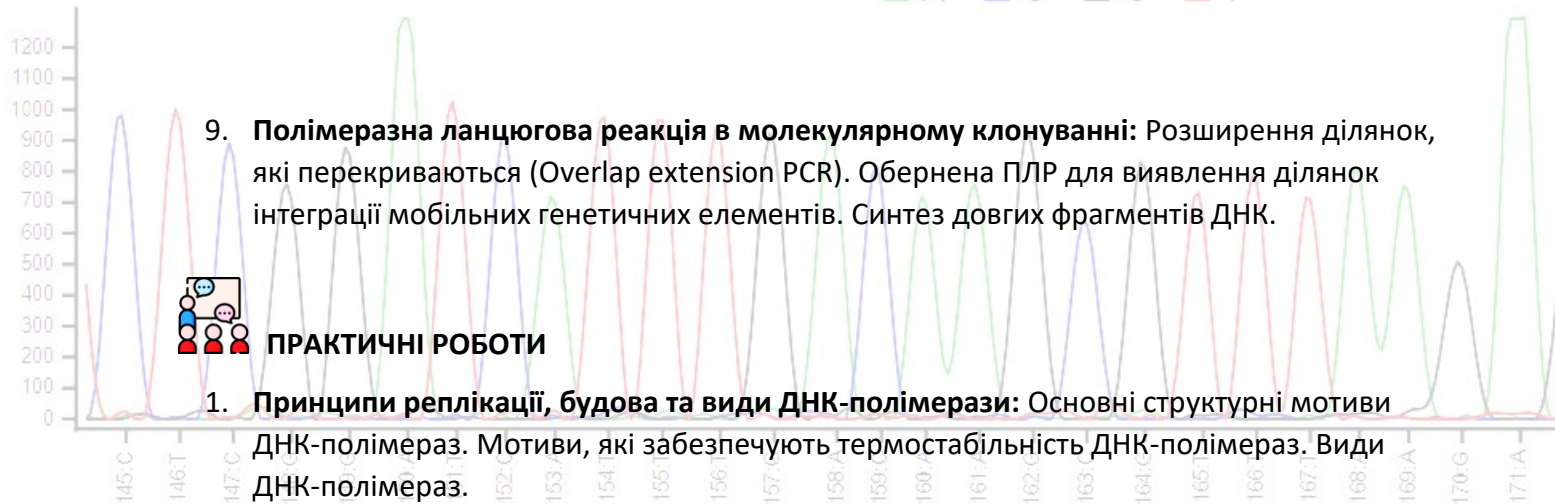
Курс спрямований на вивчення основних технік молекулярної біології – полімеразної ланцюгової реакції та секвенування. Обидві техніки також є одними з основних джерел даних, з якими працюють спеціалісти в комп'ютерній біології. Знання курсу дозволять в майбутньому розуміти спектр застосування полімеразної ланцюгової реакції та секвенування, обмеження цих методів і можливі джерела помилок. Курс також розкриває стиль мислення молекулярних біологів і демонструє алгоритми, які ведуть до потенційного винайдення нових інноваційних технік збору даних, які стосуються геному і транскриптому, а також розширює діапазон навичок студентів. Корисними навичками, які може допомогти розвинути даний курс, є здатність розробляти олігонуклеотидні послідовності для різних цілей, здійснювати полімеразну ланцюгову реакцію, обробляти дані секвенаторів, тощо.

ПРОГРАМА КУРСУ



ЛЕКЦІЇ

- 1. Реплікація ДНК в клітинах:** Принцип комплементарності. Принцип синтезу ДНК в клітинах. Основні білки, потрібні для синтезу ДНК в клітинах прокариотів та еукаріотів. Термостійкі ДНК-полімерази архей. Причини та наслідки можливих порушень реплікації у живих організмів.
- 2. Синтез нуклеїнових кислот *in vitro*:** Основи хімічного синтезу нуклеїнових кислот. Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот, на яких ґрунтується полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Види ДНК-полімераз, які використовують в біотехнології. Температурні режими для ПЛР.
- 3. Історія секвенування ДНК:** Відкриття ДНК-полімерази та механізмів реплікації. Перші підходи та спроби секвенування нуклеїнових кислот. Секвенування на основі карт фрагментів ДНК. Первинне застосування полімеразної ланцюгової реакції. Секвенування РНК.
- 4. Сучасна полімеразна ланцюгова реакція:** Реагенти сучасних наборів для полімеразної ланцюгової реакції. Принципи вибору реагентів. Схема ампліфікації фрагмента ДНК. Основні різновиди ПЛР. Електрофорез в агарозному гелі та виявлення фрагментів нуклеїнових кислот.
- 5. Дизайн праймерів:** Спектр застосування олігонуклеотидних послідовностей. Основні характеристики ефективних праймерів. Обмеження дизайну послідовностей олігонуклеотидних фрагментів залежно від застосування. Оптимізація праймерів.
- 6. Секвенування за Сенгером:** Принцип секвенування на основі термінації синтезу ланцюга. Мічення дідезоксинуклеотидів. Автоматизація секвенування. Секвенування цілих геномів.
- 7. Сучасні методи секвенування:** Створення бібліотек фрагментів. Піросеквенування. Емульсійна ПЛР. Твердофазна ПЛР на пластинці, ампліфікація містків та Illumina/Solexa секвенування. Сучасні методи секвенування РНК.
- 8. Мутагенез за допомогою полімеразної ланцюгової реакції:** Дизайн праймерів для сайт-специфічного мутагенезу. Загальні принципи спрямованого мутагенезу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Збирання Гібсона.



9. **Полімеразна ланцюгова реакція в молекулярному клонуванні:** Розширення ділянок, які перекриваються (Overlap extension PCR). Обернена ПЛР для виявлення ділянок інтеграції мобільних генетичних елементів. Синтез довгих фрагментів ДНК.



ПРАКТИЧНІ РОБОТИ

1. **Принципи реплікації, будова та види ДНК-полімерази:** Основні структурні мотиви ДНК-полімераз. Мотиви, які забезпечують термостабільність ДНК-полімераз. Види ДНК-полімераз.
2. **Кількісна полімеразна ланцюгова реакція:** Загальна схема кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі, яка ґрунтується на ДНК-зв'язувальних барвниках. Полімеразна ланцюгова реакція, яка ґрунтується на ДНК-зв'язувальних зондах.
3. **Види полімеразної ланцюгової реакції:** Низхідна (touch-down) ПЛР. Вкладена ПЛР. Асиметрична ПЛР.
4. **Використання ПЛР для генотипування:** Алель-специфічна ПЛР. *A/i* ПЛР. Ампліфікація коротких тандемних повторів. Аналіз мітохондріальної ДНК.
5. **Полімеразна ланцюгова реакція у секвенуванні:** Швидка ампліфікація кінців комплементарної ДНК. Створення бібліотек ДНК. Особливості твердофазної ПЛР.
6. **Діагностична полімеразна ланцюгова реакція:** Опосередкована петлею ізотермічна ампліфікація. Цифрова полімеразна ланцюгова реакція. Використання ПЛР в ідентифікації прокаріотів.
7. **Специфічні види ПЛР і дотичні методи:** Мікročіпи: принцип методу та особливості аналізу. Полімеразна ланцюгова реакція для виявлення ділянок метилювання. Множинна ампліфікація зондів, опосередкованих лігазою.
8. **Методи секвенування першого покоління:** Секвенування за Сенгером. Сучасні варіанти секвенування за Сенгером. Секвенування цілого геному.
9. **Методи секвенування другого покоління:** Секвенування поодиноких молекул у реальному часі. Секвенування шляхом з'єднання і детекції олігонуклеотидних послідовностей. Секвенування з використанням нанопор.
10. **Секвенування РНК:** Транскриптоміка поодиноких клітин. Масове паралельне секвенування сигнатур. Серійний аналіз експресії генів.



ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

1. **Дизайн олігонуклеотидних послідовностей:** Створення праймерів для детекції. Створення праймерів для кількісної ПЛР з використанням онлайн-інструментів (Ensembl, Primer Blast, Primer3Plus, тощо).
2. **Розшифровка даних секвенатора:** Ідентифікація генів та аналіз нуклеотидних послідовностей за допомогою вільних онлайн-інструментів.
3. **Виявлення наявності гена:** Виділення ДНК. Налаштування ампліфікатора. Полімеразна ланцюгова реакція.
4. **Виявлення наявності гена:** Електрофорез в агарозному гелі. Візуалізація результатів ПЛР. Аналіз результатів ПЛР.
5. **Кількісна полімеразна ланцюгова реакція:** Виділення РНК. Розрахунки реагентів і налаштування ампліфікатора. Синтез кДНК.

6. **Кількісна полімеразна ланцюгова реакція:** Дизайн планшету. Підготовка праймерів та мастер-міксу. Аналіз даних полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

ЛІТЕРАТУРА ТА МАТЕРІАЛИ

d-learn

<https://d-learn.pnu.edu.ua/course/subscription/through/url/612925c46b714dab8276>

1. Сиволоб А. Молекулярна біологія: підручник (2-ге вид., перероб. і доп.) – К.: ВПЦ «Київський університет», 2023. – 511 с. ([доступний на сайті КНУ](#)) // Розділи 9 та 11.
2. Карпов О.В., Демидов С.В., Кир'яченко С.С. Клітинна та генна інженерія: Підручник – К.: Фітосоціоцентр, 2010. – 208 с. // Розділ 3.
3. Ніколайчук В.І., Горбатенко І.Ю. Генетична інженерія: підручник – Ужгород, 1999. – 182 с.
4. Гиль М.І., Сметана О.Ю., Юлевич О.І., Баркарь Є.В., Гобатенко І.Ю., Нежлукченко Т.І., Барановський Д.І., Повод М.Г. Молекулярна генетика та технології дослідження геному: навчальний посібник / за ред. проф. М.І. Гиль. – К.: Олді-Плюс, 2019. – 320 с. // Розділи 3, 9 та 10.
5. Мороховець Г.Ю., Сілкова О.В. Біоінформатика. Вступний курс: Навчальний посібник. – Полтава: Видавець Шевченко Р. В., 2017. – 118 с. // Розділ 3.
6. Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science, 2002. Isolating, Cloning, and Sequencing DNA. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26837/>
7. Heather J.M., Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Genomics. 2016; 107(1): 1-8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4727787/>
8. Green M.R., Sambrook J. Polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Protoc. 2019; 2019(6). doi: 10.1101/pdb.top095109. Available from: <https://cshprotocols.cshlp.org/content/2019/6/pdb.top095109.full>
9. Satam H., Joshi K., Mangrolia U., Waghoo S., Zaidi G., Rawool S., Thakare R.P., Bandy S., Mishra A.K., Das G., Malonia S.K. Next-generation sequencing technology: current trends and advancements. Biology (Basel). 2023; 12(7): 997. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10376292/>

ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКЛАДАЧА



Дмитро ГОСПОДАРЬОВ

Доцент кафедри біохімії та біотехнології

Вищу освіту отримав на біологічному факультеті Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича (1996–2001), після чого навчався в аспірантурі Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника під керівництвом професора Володимира Лушчака за спеціальністю 03.00.04 – біохімія (2001–2004). З 2004 року є штатним працівником кафедри біохімії та біотехнології. Науковий ступінь отримав у 2005 році, а вчене звання – в 2014. З 2021 року працює над докторською дисертацією на тему «Шляхи впливу на енергетичний метаболізм тваринного організму з метою збільшення тривалості життя». На кафедрі біохімії та біотехнології викладає дисципліни «Біологія клітини», «Генетика», «Моделі біохімічних досліджень».

Публікації, які стосуються поточного курсу:

1. Gospodaryov D.V., Lushchak O.V., Rovenko B.M., Perkhulyyn N.V., Gerards M., Tuomela T., Jacobs H.T. *Ciona intestinalis* NADH dehydrogenase NDX confers stress-resistance and extended lifespan on *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1837(11): 1861-1869. doi: 10.1016/j.bbabi.2014.08.001.
2. Yurkevych I.S., Gray L.J., Gospodaryov D.V., Burdyluk N.I., Storey K.B., Simpson S.J., Lushchak O. Development of fly tolerance to consuming a high-protein diet requires physiological, metabolic and transcriptional changes. *Biogerontology*. 2020; 21 (5): 619-636. doi: 10.1007/s10522-020-09880-0.
3. Bayliak M.M., Vatachchuk M.V., Gospodaryov D.V., Hurza V.V., Demianchuk O.I., Ivanochko M.V., Burdyluk N.I., Storey K.B., Lushchak O., Lushchak V.I. High fat high fructose diet induces mild oxidative stress and reorganizes intermediary metabolism in male mouse liver: Alpha-ketoglutarate effects. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2022; 1866 (12): 130226. doi: 10.1016/j.bbagen.2022.130226.
4. Demianchuk O., Vatachchuk M., Gospodaryov D., Hurza V., Ivanochko M., Derkachov V., Berezovskyi V., Lushchak O., Storey K.B., Bayliak M., Lushchak V.I. High-fat high-fructose diet and alpha-ketoglutarate affect mouse behavior that is accompanied by changes in oxidative stress response and energy metabolism in the cerebral cortex. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2024; 1868(1): 130521. doi: 10.1016/j.bbagen.2023.130521.



ORCID [0000-0001-8387-339X](https://orcid.org/0000-0001-8387-339X)



Scopus [8914696900](https://scopus.com/authid/detail.url?authorID=8914696900)



[Сторінка на сайті кафедри](#)



Робочі години: Пн-Пт – 11:00 – 19:00



dmytro.gospodaryov@pnu.edu.ua

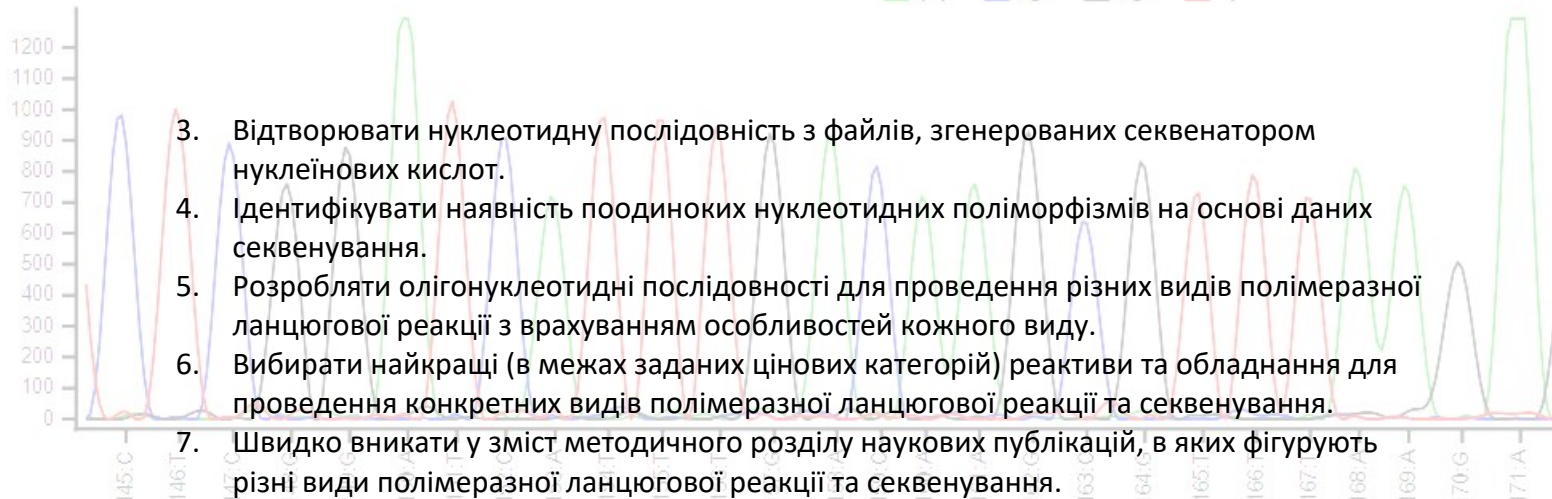
ЦІЛІ КУРСУ

Метою курсу є сформуванню уявлення про полімеразну ланцюгову реакцію, її принцип та різновиди, про сучасні методи секвенування нуклеїнових кислот, спектр застосування цих двох фундаментальних молекулярно-біологічних технік, передумови їх винайдення та подальшої розробки.

ОЧІКУВАНІ РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після успішного проходження курсу студенти зможуть:

1. Організувати і проводити полімеразну ланцюгову реакцію будь-якого виду за наявності необхідних реагентів.
2. Готувати зразки для проведення полімеразної ланцюгової реакції та секвенування.



3. Відтворювати нуклеотидну послідовність з файлів, згенерованих секвенатором нуклеїнових кислот.
4. Ідентифікувати наявність поодиноких нуклеотидних поліморфізмів на основі даних секвенування.
5. Розробляти олігонуклеотидні послідовності для проведення різних видів полімеразної ланцюгової реакції з врахуванням особливостей кожного виду.
6. Вибирати найкращі (в межах заданих цінкових категорій) реактиви та обладнання для проведення конкретних видів полімеразної ланцюгової реакції та секвенування.
7. Швидко вникати у зміст методичного розділу наукових публікацій, в яких фігурують різні види полімеразної ланцюгової реакції та секвенування.

ПОЛІТИКА КУРСУ

Загальні положення

Основою політики курсу є взаємоповага у спілкуванні та концентрація на навчанні. Мобільні телефони під час занять повинні бути переведені в беззвучний режим і відключення з аудиторії для спілкування допускається тільки в особливих випадках. Очікується використання імені та прізвища студента в назвах акаунтів у Zoom, Google Meet, Skype або Microsoft Teams під час онлайн-спілкування. При оформленні письмових робіт важливо, щоб студент чітко зазначав своє ім'я та прізвище, і тип роботи. Письмові роботи повинні відповідати вимогам, окресленим викладачем, а також містити всю інформацію, необхідну для розуміння та оцінювання роботи без додаткових усних пояснень.

Лекції

Уточнювальні запитання або коментарі під час лекцій враховуються і позитивно впливають на оцінку. Втім, запитання і коментарі не мають займати більше, ніж 15% часу лекції. Загалом, активність під час лекції, а також присутність на лекціях, можуть бути відзначені додатковим балом. Регулярних оцінок за лекції не виставляється. Конспект лекцій не вимагається. Матеріали лекції (презентація і текст, гіперпосилання на ключові джерела) за наявності та повної готовності висилаються електронною поштою на запит. Окремі матеріали курсу публікуються у системі дистанційного навчання.

Практичні та лабораторні роботи

Участь у семінарах та виконання лабораторних робіт необхідні для допуску до заліку. Семінари являють собою презентацію (доповідь) на задану тему. Доповідач, яким є студент, має вміти відповісти на запитання викладача та аудиторії. Враховується також активність на семінарах – запитання до доповідача і доповнення. Семінари і лабораторні роботи вимагають 100% уваги і за замовчуванням проводяться очно. У випадку крайньої необхідності та за взаємною домовленістю окремі семінари можуть бути проведені дистанційно.

Відвідування

Дистанційне проходження курсу не допускається. Допускаються нарахування балів на основі сертифікатів курсів, пройдених на платформах Udemy, Prometheus, Coursera чи аналогічних після погодження їхньої теми з викладачем.

Академічна доброчесність

Письмові роботи мають бути оригінальними і не містити шматків тексту зі вже опублікованих джерел (статей, підручників чи веб-сторінок), включаючи текст дослівно перекладений з іноземних джерел. Письмова робота, яка містить плагіат, не оцінюється.

- Під час заліку допускається використання конспектів, електронних та друкованих підручників, пошук інформації в інтернеті. Проте, будь-яке спілкування з іншими людьми призведе до завершення іспиту з незадовільною оцінкою.

Неформальна освіта

Сертифікат про успішне проходження курсу, зміст якого частково або повністю відповідає змісту дисципліни дає можливість замінити або доповнити підсумковий контроль згідно з «Положенням про порядок зарахування результатів неформальної освіти у Прикарпатському національному університеті»

імені Василя Стефаника». Цю можливість, а також назви та програми курсів бажано обговорити з викладачем завчасно.

ОЦІНЮВАННЯ

Активність	Частина від оцінки	Термін	Примітки
Практичні роботи	30	Впродовж курсу	Підсумкова оцінка є середнім арифметичним з усіх наявних оцінок за практичні роботи
Контроль самостійної роботи	10	Впродовж курсу	Контроль здійснюватиметься у вигляді тестів
Виконані лабораторні	10	Впродовж курсу	Лабораторні захищаються. Студент має показати розуміння суті роботи і обґрунтувати висновки
Екзамен	50	В кінці курсу	Екзамен може бути у вигляді тестів або білетів

За підсумками вивчення курсу студент зможе отримати максимальну 100 балів: 50 балів впродовж курсу та 50 балів за екзамен.

Сума балів	Оцінка ECTS	Оцінка за національною шкалою
90 – 100	A	відмінно
80 – 89	B	добре
70 – 79	C	добре
60 – 69	D	задовільно
50 – 59	E	задовільно
25 – 49	Fx	незадовільно з можливістю повторного складання
0 – 24	F	незадовільно з обов'язковим повторним вивченням дисципліни