Министерство образования и науки Республики Адыгея

Государственная бюджетная организация дополнительного образования Республики Адыгея «Республиканская естественно-математическая школа»

Региональный центр выявления и поддержки одаренных детей «Полярис – Адыгея»

«СОГЛАСОВАНО»

Председатель экспертного совета

_____ Д.К. Мамий

«20» августа 2021 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора ГБО ДО РА РЕМШ

_____ Ю.Т. Мамышев

«20» августа 2021 г.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА «ИММУНОГЕНЕТИКА И БИОМЕДИЦИНА»

(ПРОГРАММА ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ УГЛУБЛЕННОЙ ПОДГОТОВКИ ПО ИММУНОЛОГИИ И ГЕНЕТИКЕ, РЕАЛИЗУЮЩАЯСЯ НА РЕГУЛЯРНОЙ ОСНОВЕ)

Направление: Наука
Направленность программы: Естественнонаучная
Срок освоения: 1 учебный год (60 учебных часов)
Возраст участников: 15-17 лет

Автор программы:
Шумилов Дмитрий Сергеевич,
к.б.н., старший научный сотрудник отдела медико-биологических проблем НИИ Комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», заведующий лабораторией «Биохакинга» регионального центра выявления и поддержки одаренных детей «Полярис – Адыгея»

г. Майкоп
2021- 2022 учебный год

Пояснительная записка.

Дополнительная общеобразовательная программа имеет естественнонаучную направленность и ориентирована на освоение её участниками знаний и умений в области молекулярной биологии, иммунологии и генетики.

Программа реализуется на базе регионального центра выявления и поддержки одаренных детей «Полярис-Адыгея». Образовательный центр «Полярис-Адыгея» создан и функционирует по модели образовательного центра «Сириус», основанного образовательным фондом «Талант и успех», что накладывает определенную **специфику** в плане разработки и реализации программ, а именно:

- согласно заданной ОЦ «Сириус» структуре программа относится к направлению «Наука»;
- программа реализуется для особого контингента детей – обучающихся, прошедших конкурсный отбор, проявляющих способности и мотивированных на освоение данной программы;
- программа в обязательном порядке включает индивидуальную работы с каждым обучающимся, выстраивание индивидуального образовательного маршрута;
- участие в инициируемых ОЦ «Сириус» конкурсах и олимпиадах (конкурс научно-технологических проектов «Большие вызовы», Всероссийская образовательная инициатива по поиску и реализации научно-технологических проектов школьниками под руководством наставников «Сириус.Лето: начни свой проект», конкурсный отбор на участие в программах ОЦ «Сириус» и др.).

Мониторинг реализации и экспертизу программ осуществляет Образовательный фонд «Талант и успех».

Программа является **авторской**, так как не имеет аналогов в области дополнительного образования школьников.

Данная программа в 2021-2022 учебном году реализуются в образовательном центре «Полярис-Адыгея» впервые. По результатам её реализации содержание будет совершенствоваться. Срок реализации программы – 1 год.

Данная программа является **рабочей программой**, так как для дополнительных общеобразовательных программ не существует государственных стандартов и типовых программ.

Потенциальными участниками программы являются старшие школьники, демонстрирующие способности в биологии и химии, интерес к медицине и генетике, ориентированные на получение профессий, связанных с данными областями науки.

Содержание программы ориентировано на выполнение Указа «О национальных целях развития Российской Федерации на период до 2030 года» в рамках национальной цели «Возможности для самореализации и развития талантов» – «формирование эффективной системы выявления, поддержки и развития способностей и талантов у детей и молодежи, основанной на принципах справедливости, всеобщности и направленной на самоопределение и профессиональную ориентацию всех обучающихся».

Актуальность и практическая значимость данной программы обусловлена также тем, что социально значимые заболевания, имеющие различную этиологию и патогенез, чаще всего развиваются не в следствии внешних воздействий, а в результате нарушений в генах ответственных за функционирование иммунной системы. Данные, полученные школьниками на занятиях, могут быть использованы в прогностической и персонифицированной медицине.

Педагогическая целесообразность программы заключается в развитии у школьников живого интереса к комплексу биологических наук, понимания сложности современной молекулярной биологии, а также в мотивации учащихся к углубленному освоению биологических знаний в области иммунологии и генетики, для их дальнейшего применения в персонализированной и прогностической медицине.

Программа реализуется в соответствии с одной из задач «Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019 – 2027 годы», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 22 апреля 2019 г. № 479 – «развитие кадрового потенциала российской науки и высокопрофессиональных компетенций исследователей в области генетических технологий».

Программой обучения предусмотрено проведение лекционных и практических занятий, групповой и индивидуальной работы. Школьники изучают темы из молекулярной биологии, генетики и иммунологии, во время обучения используется технология научно-исследовательской работы.

На практических занятиях ребята учатся проводить анализ распределения частот SNP (single nucleotide polymorphisms) генов-кандидатов социально значимых заболеваний методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией результатов и в режиме реального времени, осуществляют поиск ключевых микро РНК, участвующих в эпигенетической регуляции генома человека, обучаются культуральным методам работы с клетками; проведению статистических расчетов, полученных экспериментальных данных с использованием пакета прикладных программ SPSS Statistics 17.0 (Inc., Chicago, USA) и Office Excel 2016 (Microsoft).

По окончании обучения все учащиеся разрабатывают теоретически обоснованную концепцию проведенного научного исследования в виде итоговой научной работы.

Участники программы:
Кол-во обучающихся – 12 человек.
Количество учебных групп – 1 группа.
Условия набора – предварительный конкурсный отбор.
Возраст обучающихся: 15-17 лет (9-10 класс).

Сроки, режим занятий, форма обучения, место реализации программы.
Сроки проведения: октябрь 2021 года – май 2022 года.
Длительность реализации программы:

Продолжительность занятия	Количество занятий в неделю	Количество занятий в течение учебного года (октябрь-май)	Общее количество учебных часов
2 учебных часа (1,5 астрономических часа)	1 занятие	30 занятий	60 учебных часов

Форма обучения: очная
Место реализации программы: Региональный центр выявления и поддержки одаренных детей «Полярис-Адыгея», расположенный по адресу г. Майкоп, ул. Гагарина, д.13, лаборатория «Биохакинга» (ауд.201).

Целевой блок программы.
Цель: выявление и поддержка талантливой молодёжи Республики Адыгея, демонстрирующей способности в биологии; углубление и расширение теоретических и практических знаний в области генетики, прогностической и персонализированной медицины, научно-исследовательской работы.

Задачи:
Личностные (воспитательные)**:**
- формирование гражданско-патриотической позиции, чувства гордости за достижения отечественных ученых-биологов и генетиков;
- мотивация обучающихся к углубленному освоению биологических знаний в области иммунологии и генетики.

Метапредметные (развивающие)**:**
- формирование умений решать социально ориентированные научные проблемы: дизайн научных исследований, публикаций; разработка прорывных проектов на примере выявления молекулярно-генетических маркеров социально значимых заболеваний.

Предметные (обучающие)**:**
- освоение теоретических знаний в области генетики, иммунологии и медицинской статистики, работы в международных базах данных;
- овладение умениями выделения ДНК и РНК, постановки полимеразной цепной реакции, иммуноферментного анализа и проточной цитометрии, анализа данных с использованием методов медицинской статистики;
- формирование умений работы с биологическими объектами в лабораторных условиях.

Предполагаемые результаты программы:
Личностные:
- участники программы демонстрируют чувство гордости за достижения ведущих отечественных ученых биологов и генетиков, выражают желание вносить собственный вклад в развитие региона и страны.

Метапредметные:
Участники программы:

- могут самостоятельно разрабатывать дизайн проекта, оформлять доклад и презентацию;
- анализируют информационные источники и работают в современных базах данных;
- получают, анализируют и статистически обрабатывают экспериментальные данные.

Предметные:
Участники программы:

- участники программы знают ведущих отечественных ученых биологов и генетиков;
- знают определения основных понятий генетики и иммунологии, а также основы медицинской статистики и работы в международных базах данных;
- владеют навыками постановки полимеразной цепной реакции, иммуноферментного анализа и проточной цитометрии.

Общественно признанные достижения:

- более 70% обучающихся активно участвуют в профильных конкурсах и проектах, более 50% из них занимают призовые места,
- более 70% участников программы публикуют свои работы в научных изданиях.

Удовлетворенность обучающихся участием в программе (на основе письменного опроса).

Критерии оценки качества программы

Оценка качества реализации программы происходит на основе следующих критериев:

1. уровень достижения заявленных образовательных результатов (личностных, метапредметных и предметных), представленных в дополнительной общеобразовательной программе;
2. наличие общественно признанных достижений (участие и победы в конкурсах, олимпиадах, значимых проектах);
3. наличие публикаций в научных изданиях;
4. степень удовлетворенности детей участием в программе.

Результаты программы согласно данным критериям представляются в Аналитической справке по итогам реализации программы.

Система диагностики образовательных результатов.

Формулировка результата	Уровни проявления результата	Способ диагностики и диагностический инструментарий	Номер занятия, на котором проводится диагностический замер	Где фиксируются данные замера	Кто проводит замер и обрабатывает диагностические данные
Личностные: Участники программы: - демонстрируют чувство гордости за достижения ведущих отечественных ученых, выражают желание вносить собственный вклад в развитие региона и страны. Результат считается достигнутым, если не менее 70% участников программы: - повысили свой начальный уровень, либо по итогам сохранили уровень «2», - по итогам программы продемонстрировали уровень «2».	**0 уровень** – обучающийся не демонстрирует, не выражает желание. **1 уровень** – нейтрально относиться к их достижениям, не выражает устойчивого желания приносить общественную пользу, либо делает это ситуативно. **2 уровень –** озвучивает значимость достижений для российской и мировой науки, выражает желание приносить общественную пользу и ищет возможные способы.	Устный опрос	1 занятие (начальный замер) 30 занятие (итоговый замер)	Карты фиксации образовательных результатов (см. Приложение №1, стр. 20-23)	Шумилов Дмитрий Сергеевич
Метапредметные: Участники программы: - могут самостоятельно разрабатывать дизайн проекта, оформлять доклад и презентацию; - анализируют информационные источники и работают в современных базах данных; - получают, анализируют и статистически обрабатывают экспериментальные данные. Результат считается достигнутым, если по итогам программы: - не менее 70% участников программы повысили свой начальный уровень; - не менее 50% продемонстрировали уровень «2» и 50% – уровень «3»	**0 уровень** – обучающийся не владеет 70% и более умений. **1 уровень –** - способен при постоянной поддержке преподавателя оформлять проект, ставить цели и задачи. - умеет, пользуясь постоянной помощью преподавателя, анализировать отечественную и зарубежную литературу, получать и обрабатывать информацию при помощи современных методов медицинской статистики, проводить ее анализ. **2 уровень –** - способен, пользуясь время от времени помощью преподавателя оформлять проект, ставить цели и задачи. - умеет самостоятельно, анализировать отечественную и зарубежную литературу, получать и обрабатывать информацию при	- Наблюдение в процессе выполнения практического задания - итоговая оценка проекта	11,14,15 занятия (начальный замер) 28-30 занятие (итоговый замер)		

	помощи современных методов медицинской статистики, проводить ее анализ. **3 уровень –** - умеет самостоятельно оформлять проект, ставить цели и задачи. - умеет самостоятельно анализировать отечественную и зарубежную литературу, получать и обрабатывать информацию при помощи современных методов медицинской статистики, проводить ее анализ.				
Предметные: Участники программы: - знают ведущих отечественных ученых биологов и генетиков, - знают определения основных понятий генетики и иммунологии (ген, ДНК, РНК, репликация, транскрипция, трансляция, взаимодействие генов, мутация, SNP, полиморфизм, иммунитет, цитокины, продукция, t-критерий Стьюдента, хи-квадрат, корреляция, доверительный интервал, уровень значимости), а также основы медицинской статистики и работы в международных базах данных. Результат считается достигнутым, если по итогам программы: - не менее 70% участников программы повысили свой начальный уровень; - не менее 70% продемонстрировали уровень «3»	**Уровень 0** – решено 0-40% задания **Уровень 1** – решено 41-60% задания **Уровень 2** – решено 61-80% задания **Уровень 3** – решено 81-100% задания	- Тестирование	1 занятие (начальный замер) 15 занятие (промежуточный замер) 30 занятие (итоговый замер)		
Предметные: Участники программы: - владеют навыками постановки полимеразной цепной реакции, иммуноферментного анализа и проточной цитометрии.	**0 уровень** – обучающийся не владеет навыками. **1 уровень** – обучающийся способен при постоянной помощи преподавателя проводить эксперименты с использованием методов полимеразной цепной реакции,	- Устный опрос - Наблюдение в процессе выполнения практического задания	2-3 занятие (начальный замер) 16-17 занятие (промежуточный замер)		

Результат считается достигнутым, если по итогам программы: - не менее 70% участников программы повысили свой начальный уровень; - не менее 70% продемонстрировали уровень «3»	иммуноферментного анализа и проточной цитометрии. **2 уровень** – способен с небольшими подсказками педагога проводить эксперименты с использованием методов полимеразной цепной реакции, иммуноферментного анализа и проточной цитометрии. **3 уровень** – способен самостоятельно проводить эксперименты с использованием методов полимеразной цепной реакции, иммуноферментного анализа и проточной цитометрии.		25 занятие (итоговый замер)		

Календарный учебный график

Дата начала занятий	Дата окончания занятий	Количество учебных недель	Количество учебных дней	Количество учебных часов	Режим занятий
7 октября 2021 года	19 мая 2022 года	30 недель	30 дней	60 часов	1 занятие в неделю (четверг) по 2 учебных часа

Учебно-тематический план программы

№	Наименование учебных тем	Количество часов		Всего часов
		Теория	Практика	
1.	Введение в тему.	2	1	3
2.	Гены – это ДНК. Гены кодируют белки	2	0	2
3.	Прерывистый ген. Структура генома. Последовательности генома и число генов. Кластеры и повторы	2	2	4
4.	Матричная РНК. Синтез белка. Расшифровка генетического кода	2	2	4
5.	Локализация белка. Транскрипция. Оперон. Регуляторная РНК. Международные базы данных	2	2	4
6.	Репликон. Внехромосомные репликоны. Репликация ДНК. Системы репликации	2	2	4
7.	Транспозоны. Промоторы и энхансеры. Активация транскрипции	2	2	4

8.	Сплайсинг и процессинг РНК. Анализ статистическая обработка экспериментальных данных.	2	2	4
9.	Хромосомы. Нуклеосомы. Контроль структуры хроматина. Наследование эпигенетических эффектов	2	0	2
10.	Как работает иммунитет	3	2	5
11.	Лимфоидные клетки иммунной системы	2	2	4
12.	Как формируется многообразие антител	2	2	4
13.	Основы медицинской статистики.	4	4	8
14.	Проектирование.	1	5	6
15.	Подведение итогов.	1	1	2
Итого		**31**	**29**	**60**

Содержание программы

Программа включает в себя проведение теоретических и практических занятий, а также научные семинары для закрепления пройдённых тем. Материал теоретических занятий содержит основные разделы генетики и иммунологии.

На первых занятиях рассматриваются такие базовые понятия как – ген, наследственность, мутации и т.д., приводится историческая справка о великих открытиях и достижениях отечественных ученых.

На последующих занятиях материал уходит все глубже в частную генетику, рассматриваются узкие вопросы организации и функционирования генома.

Завершающими этапами теоретического материала являются лекции по иммунологии, показывается связь наследственности с дисфункцией иммунной системы, что приводит к дезорганизации иммунных программ организма и развитию социально значимых заболеваний.

Практические занятия помогают школьникам на всех этапах изучения материала погрузиться в исследовательский процесс, почувствовать весь спектр эмоций, который ощущали великие ученые на пороге своих открытий при этом сделать и свое собственное. И, наконец, то, без чего не обходится ни одно сообщество ученых – это научные семинары, на которых ребята могут поделиться результатами своих исследований, посмотреть со стороны на решаемую другим коллективом проблему и поделиться своим мнением, вступить в научную дискуссию и, как итог, улучшить свой проект, расширить горизонты знаний.

Тезисное описание тем. Формы занятий и формы контроля

№	Тема	Тезисное описание темы	Формы занятий, формы контроля
1.	Введение в тему. Великие достижения отечественных ученых	Знакомство с содержанием программы, режимом занятий, педагога с обучающимися, обучающихся друг с другом. Ученые и их достижения. Вавилов Николай Иванович (1887-1943) – советский учёный-биолог, генетик, химик, географ, общественный и государственный деятель. Автор учения об иммунитете растений, основоположник генетической науки в СССР. Русский ученый Сергей Четвериков, изучал дрозофил, привезенных им с Северного Кавказа. Он обнаружил большое количество скрытых мутаций и показал, что они служат материалом естественного отбора и обеспечивают приспособление к изменениям условий среды. Александр Серебровский исследовал, как распределяются некоторые гены кур в горном Дагестане. Мечников Илья Ильич (1845-1916) – русский и французский биолог (микробиолог, цитолог, эмбриолог, иммунолог, физиолог и патолог). Лауреат Нобелевской премии в области физиологии и медицины (1908). Вклад в биологию: Илья Мечников является автором теории происхождения многоклеточных животных, иными словами теории фагоцителлы. В 1882 году он обнаружил новое явление для науки – фагоцитоз. Об этом открытии он заявил спустя год на VII съезде врачей и естествоиспытателей в Одессе. Позже, в 1892 году, на основе фагоцитоза он разработает патологию воспаления. Также Илья Ильич совершил огромный прыжок в науке – он создал фагоцитарную теорию иммунитета. Начальный замер знаний и умений	Лекция. Беседа. Тестирование.
2.	Гены – это ДНК. Гены кодируют белки.	ДНК-генетический материал клеток животных. Структура ДНК. Генетическая информация закодирована в последовательностях ДНК и РНК. Нуклеиновые кислоты гибридизуются по принципу комплементарности. Мутации изменяют последовательность ДНК. Эффекты мутаций могут быть обратимы. Мутации наиболее часты в	Лекция.

		«горячих точках» генома. Один ген кодирует один пептид. Почему геномы такие большие? Гены можно локализовать, используя консервативность их экзонов. Консервативность организации генома позволяет выявить гены.	
3.	Прерывистый ген. Структура генома. Последовательности генома и число генов. Кластеры и повторы	Прерывистый ген состоит из экзонов и интронов. Эндонуклеазы рестрикции – это один из основных инструментов картирования ДНК. Организация прерывистых генов консервативна. Последовательности экзонов консервативны, а интронов — вариабельны. Некоторые последовательности ДНК кодируют более одного белка. Как эволюционировали прерывистые гены? Некоторые экзоны напоминают последовательности, кодирующие целые белки. Гены, относящиеся к одному семейству, имеют схожую организацию. Лабораторная работа №1. Необходимо выполнить рестрикцию генов по определенным локусам, провести электрофорез в агарозном геле в присутствии маркера молекулярных масс.	Лекция. Дискуссия. Лабораторная работа №1
4.	Матричная РНК. Синтез белка. Расшифровка генетического кода	мРНК, полученная в результате транскрипции, транслируется в аминокислотную последовательность белка. Транспортная РНК по форме напоминает лист клевера. Акцепторный конец и антикодон расположены по краям пространственной структуры. Стабильность мРНК зависит от ее структуры и последовательности. Местонахождение мРНК может быть четко детерминировано. Семинар: Доклады на тему достижений отечественных ученых и их вкладе в генетику и иммунологию Лабораторная работа №2. Выделение и полиаденилирование микроРНК, работа с амплификаторами	Лекция. Семинар. Лабораторная работа №2
5.	Локализация белка. Транскрипция. Оперон. Регуляторная РНК. Международные базы данных	Шапероны обеспечивают формирование правильной пространственной структуры. Белки семейства H5p70 встречаются во всех компартментах клетки. Сигнальные последовательности инициируют транслокацию. Для деградации белки возвращаются в цитозоль путем обратной транслокации. РНК-интерференция причина молчания генов. Лабораторная работа №3. Работа с международными базами данных UniProt и RCSB PDB. Построение 3D моделей взаимодействия белков	Лекция. Лабораторная работа №3

6.	Репликон. Внехромосомные репликоны. Репликация ДНК. Системы репликации.	ДНК-полимеразы — ферменты, создающие ДНК. ДНК-полимеразы контролируют точность репликации. Сайт-специфичная рекомбинация сопровождается разрывом и воссоединением. Семинар. ПЦР, виды ПЦР, история открытия, применение ПЦР метода в современных исследованиях. Лабораторная работа №4 Постановка полимеразной цепной реакции, заливка агарозных гелей, проведение электрофореза, визуализация продуктов амплификации.	Лекция. Семинар. Лабораторная работа №4
7.	Транспозоны. Промоторы и энхансеры. Активация транскрипции.	ДНК-полимераза состоит из многих субъединиц. Есть несколько разновидностей факторов транскрипции. Активаторы взаимодействуют с основным аппаратом транскрипции. Транспозоны перетаскивают ДНК. Лабораторная работа №5. Работа с международными базами данных: NCBI, PubMed, GenCards и т.д.	Лекция. Лабораторная работа №5
8.	Сплайсинг и процессинг РНК. Анализ статистическая обработка экспериментальных данных.	Сайты сплайсинга ядерных генов представляют собой короткие последовательности. Границы сплайсинга распознаются аппаратом сплайсинга в парах. В реакциях транс-сплайсинга участвуют малые РНК. Эндонуклеаза сплайсинга распознает т-РНК. рРНК образуется в результате расщепления. Лабораторная работа №6. Статистическая обработка полученных результатов, построение диаграмм и графиков, подготовка презентаций	Лекция. Лабораторная работа №6
9.	Хромосомы. Нуклеосомы. Контроль структуры хроматина. Наследование эпигенетических эффектов	В ДНК эукариот есть петли и домены, прикрепленные к каркасу. Теломеры опечатывают концы хромосом. Центромеры связываются с белковым комплексом. Нуклеосомная организация промотора может быть не стандартной. Ацетилирование гистонов происходит в двух случаях. У белков, модифицирующих хроматин, есть общие аминокислотные мотивы.	Лекция.
10.	Как работает иммунитет.	Введение в иммунологию. Структурная организация и функции иммунной системы. Виды иммунитета. Неспецифический и специфический иммунитет. Интерферон Система комплемента Фагоцитоз Медиаторы иммунной системы – цитокины. Рецепторы цитокинов. Специфический иммунитет. Антигены. Антитела. Иммуноглобулины. Эффекторные клетки иммунной системы. Популяции и субпопуляции лимфоцитов. Главный комплекс гистосовместимости. Межклеточная кооперация. Регуляция	Лекция. Круглый стол. Лабораторная работа №7

		иммунитета. Иммунная память. Патология иммунной системы. Иммунодефициты. Иммунологические и молекулярно-генетические методы исследований. Апоптоз – программированная клеточная смерть. Круглый стол на тему – Актуальные проблемы иммунологии Лабораторная работа №7. Постановка иммуноферментного анализа	
11.	Лимфоидные клетки иммунной системы.	Натуральные киллеры. Рецепторы естественных киллеров. Моллекулярные процессы на поверхности NK. Лимфоциты. Циркуляция лимфоцитов. Морфологические признаки. Популяции и субпопуляции. В-лимфоциты. Дифференцировка В-лимфоцитов. Т-лимфоциты. Иммунологическая память. Продукция цитокинов Т-лимфоцитами. Семинар. Основные понятия и методы иммунологии. Лабораторная работа №8. Определение фенотипа субпопуляций лимфоидных клеток иммунной системы методом проточной цитометрии.	Лекция. Семинар. Лабораторная работа №8
12.	Как формируется многообразие антител.	Численность лимфоцитов, отвечающих на определенные антигены, увеличивается благодаря клональной селекции. Гены иммуноглобулинов компонуются из составных частей в лимфоцитах. Инициация сопровождается освобождением промотора. Конструкция промотора может видоизменяться, но контекст имеет значение. Энхансеры несут двунаправленные элементы, способствующие инициации. Семинар. Отечественные ученые, основные понятия и методы иммунологии и генетики. Лабораторная работа №9. Постановка цитотоксического МТТ теста	Лекция. Семинар. Лабораторная работа №9
13.	Основы медицинской статистики.	Вероятность, вмешивающийся фактор, выборка, выборочная совокупность, генеральная совокупность, доказательная медицина, исследование «случай–контроль», корреляционная связь, медиана, мета-анализ, нулевая гипотеза, объем выборки, относительный риск, отношение шансов, рандомизация, регрессионный анализ, средняя арифметическая, уровень значимости. Практическое занятие по медицинской статистике.	Лекция. Практическое занятие. Итоговый контроль по теме.

14.	Проектирование.	Технология SMART. Структура проекта. Правила представления научного проекта. Формирование научных команд, получение тем исследований. Разработка и оформление проекта. Представление проекта – итоговая конференция с защитой проектов и выставлением баллов.	Лекция. Беседа Подготовка итогового проекта. Итоговая конференция.
15.	Подведение итогов	Структурирование пройденного материала, выделение значимых тем, возможности реализации полученных знаний и умений (конкурсы, олимпиады). Итоговый контроль в тестовой форме по пройденным темам, а также методам исследования.	Беседа. Тестирование

Обеспечение программы

Методическое обеспечение программы:
Основные методы и формы реализации содержания программы:

- в рамках обучения – теоретические лекции, групповые дискуссии, семинары, обучающие беседы, проектная работа, конференция, поиск и обработка информации, лабораторные исследования;
- для оценки уровня освоения материала используется аналитические беседы, тестирование, письменный опрос, включенное наблюдение педагога за выполнением практических заданий, конференция.

Подробнее по использованию форм и методов в конкретных темах см. в разделе «Тезисное описание тем. Формы занятий и формы контроля» (стр.10-14).

Методические материалы представлены в Приложении № 3 (стр.31-52)

Выбор форм и методов обусловлен необходимостью погружения школьников в академическую среду с научными экспериментами, дискуссиями, конференциями и подготовкой своих собственных исследований в области иммуногенетики.

Оценочные материалы представлены в Приложении № 4 (стр. 53-61)

Рабочая программа воспитания представлена в Приложении № 2 (стр. 24-30).

Дидактическое обеспечение, необходимое для реализации программы: собственные разработки лекционных материалов, лабораторных и практических занятий, тестовых заданий повышенной сложности для контроля качества усвоения материала, учебная литература, международные базы данных.

Материальное-техническое обеспечение:

1. лабораторное помещение, оборудованное для работы 12 человек;
2. мультимедийная доска;
3. 16 ноутбуков;
4. оборудование, необходимое для:

- проведения ИФА: Планшетный монохроматорный флуориметр/люминометр /спектрофотометр CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия), Шейкер-термостат (ST3, ELMI, Латвия).
- выделения ДНК/тотальной РНК и её фракций: Термостат «Гном» твердотельный с крышкой 40x1,5 28x0,5 (ДНК-Технология, Россия), Спектрофотометр NanoDrop 2000C (Thermo-system, США), Центрифуга Centrifuge 5430 (Eppendorf), Qubit.
- проведения ПЦР: Амплификатор «Терцик» (ООО «ДНК-технология», Россия), Амплификатор Real-time CFX96 Touch (BioRad, США), Трансиллюминатор «Квант-С», 20 x 20 см (Компания Хеликон, Россия), Система гель-

документирования «Взгляд» (Компания Хеликон; Россия), Амплификатор Gene AMR System9700 (AppliedBiosystem, США), Система визуализации GelDoc XR («Био-Рад», США), Электрофоретическая камера SUB-CELL GT.
- проведения культуральных работ: Ламинарный шкаф I класса безопасности HERAguard 1,8 (Thermo Fisher, США), Микроскоп биологический для лабораторных исследований Primo Star (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия), Микроскоп инвертированный AxioVert 40 C (Carl Zeiss, Германия), CO2-инкубатор «CB 53» (Panasonic, Япония), Система для микроскопии в проходящем свете EVOS ® XL (AppliedBiosystem, США). Центрифуга CM-6M.01 (ELMI, Латвия). Сортер (BioRad, США) по договору ЦКП.
- для проточной цитометрии: Проточный цитофлуориметр CytoFlex в комплектации B2-R2-V2 (Beckman Coulter, США).
- хранения: Морозильник ультранизко-температурный (вертикальный) (MDF-U5386S, Sanyo, Япония), Холодильники лабораторные (Россия), Холодильники бытовые (Россия).

Имеющееся вспомогательное оборудование, необходимое для выполнения проекта:
- Микроцентрифуга/вортекс FV-2400 со всеми насадками (Biosan Латвия), Одно- и многоканальные дозаторы разных объемов (Thermo Fisher, США), Бокс для стерильных работ UVC/T-M-AR (BioSan, США), Источник питания PowerPack Basic (BioRad, США).
- Охлаждающая высокоскоростная бенчтоп-центрифуга.

Кадровое обеспечение:
- Шумилов Дмитрий Сергеевич, к.б.н., старший научный сотрудник отдела медико-биологических проблем НИИ Комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», автор программы, преподаватель;
- Тугуз Аминат Рамазановна, д.б.н., профессор кафедры ботаники Адыгейского государственного университета, преподаватель;
- Татаркова Елена Анатольевна, к.б.н., старший научный сотрудник отдела медико-биологических проблем НИИ Комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», преподаватель.

Список литературы.

Для педагога:

1. Al-Terehi M. Study MetheletetraHydrofolatredctase (MTHFR) Gene Polymorphism in Myocardial Infarction Patients in Babylon Province/Iraq //Journal of Global Pharma Technology. – 2017. – Т. 9. – №. 9.
2. Ansari W. M. et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on proinflammatory/anti-inflammatory cytokine imbalance in premature coronary artery disease //Postgraduate medical journal. – 2017. – Т. 93. – №. 1098. – С. 209-214.

3. Chehadeh S. W. E. H. et al. Relationship between MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and complications of type 2 diabetes mellitus in an Emirati population //Meta gene. – 2016. – Т. 9. – С. 70-75.
4. Eastwood J. A. et al. Premature atherosclerosis in premenopausal women: Does cytokine balance play a role? //Medical Hypotheses. – 2017. – Т. 109. – С. 38-41.
5. Hashad I. M. et al. Investigating the link between MCP-1 A-2518G, RANTES G-403A, CX3CR1 V249I and MTHFR C677T gene polymorphisms and the risk of acute myocardial infarction among Egyptians //Meta Gene. – 2017. – Т. 11. – С. 181-188.
6. Khatami M. et al. Simultaneous Genotyping of the rs4762 and rs699 Polymorphisms in Angiotensinogen Gene and Correlation with Iranian CAD Patients with Novel Hexa-primer ARMS-PCR //Iranian Journal of Public Health. – 2017. – Т. 46. – №. 6. – С. 811.
7. Masud R., Baqai H. Z. THE COMMUNAL RELATION OF MTHFR, MTR, ACE GENE POLYMORPHISMS, AND HYPERHOMOCYSTEINEMIA AS CONCEIVABLE RISK OF CORONARY ARTERY DISEASE //Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. – 2017. – №. ja.
8. Matia-García I. et al. Correlation between cytokine profile and metabolic abnormalities in young subjects //Int J Clin Exp Med. – 2016. – Т. 9. – №. 8. – С. 16596-16604.
9. Rath D. et al. gPla Polymorphisms are associated with Outcomes in Patients at high cardiovascular risk //Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2017. – Т. 4. – С. 52.
10. Shim A. L. et al. Serum interleukin-6: Association with circulating cytokine serum levels in patients with sinus arrhythmia and patients with coronary artery disease //Cellular immunology. – 2016. – Т. 310. – С. 178-183.
11. URL: http://www.who.int (дата обращения: 9.01.2018)
12. АЗОВА М. М. и др. Встречаемость полиморфизма Leu33Pro гена ITGB3 в выборках из популяций Алжира, Сирии и Центральной России //Auditorium. – 2016. – №. 2 (10).
13. Алугишвили А. З. А1166С полиморфизм гена рецептора 1 типа ангиотензина II и дисфункция эндотелия у мужчин, перенесших инфаркт миокарда в молодом возрасте //Российский кардиологический журнал. – 2017. – №. 6. – С. 5-9.
14. Балацкий А. В. и др. Полиморфизм гена Т-кадгерина (CDH13) ассоциирован с характером манифестации ишемической болезни сердца //Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2016. – №. 1.
15. Бернс С. А. и др. Динамика изменений уровней цитокинов на госпитальном этапе у больных с различными клиническими вариантами острого коронарного синдрома //Медицинская иммунология. – 2016. – Т. 18. – №. 1.
16. Гордеева Е. К., Каде А. Х. ДИНАМИКА УРОВНЯ ПРОТИВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ СТАБИЛЬНОЙ СТЕНОКАРДИИ НАПРЯЖЕНИЯ II-III ФУНКЦИОНАЛЬНОГО КЛАССА //Медицинский вестник Юга России. – 2016. – №. 3.
17. Литвиненко А. А. Тенденции в заболеваемости населения сердечно-сосудистыми заболеваниями //Научное сообщество студентов XXI столетия. Естественные науки. – 2017. – С. 82-88.
18. Маркелова Е. В., Шкорик Е. В., Силаев А. А. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ УРОВНЯ TNFα, IL-10 И ММП-1 У ПАЦИЕНТОВ С ИБС ПОСЛЕ

АОРТОКОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ //Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – №. SV. – С. 290-290.
19. Мешков А. Н., Щербакова Н. В. Молекулярно-генетическая диагностика предрасположенности к развитию ишемической болезни сердца: современное состояние проблемы //Consilium Medicum. – 2016. – Т. 18. – №. 12. – С. 22-26.
20. Минушкина Л. О. и др. Генетический полиморфизм генов цитокинов системы воспаления и состояние сосудистой стенки у больных артериальной гипертензией //Артериальная гипертензия. – 2017. – Т. 23. – №. 2.
21. Мирошников А. Е. и др. Генетические аспекты возможности прогнозирования затрат на медицинскую помощь у лиц с сердечно-сосудистыми заболеваниями //Universum: медицина и фармакология. – 2016. – №. 1-2 (24).
22. Морозова Е. В., Маль Г. С. Генетические аспекты нарушений липидного обмена и формирования ишемической болезни сердца //Тенденции науки и образования в современном мире. – 2017. – №. 26-3. – С. 12-17.
23. Огородова Л. М. и др. ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОВ НА РАЗВИТИЕ РЕСТЕНОЗА ПОСЛЕ СТЕНТИРОВАНИЯ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ //Успехи современной науки. – 2017. – Т. 5. – №. 1. – С. 128-135.
24. Рудакова Д. М. и др. ПРЕДИКТОРЫ КОРОНАРНОГО АТЕРОСКЛЕРОЗА У МУЖЧИН С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ //Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2017. – Т. 6. – №. 3.

Литература для обучающихся:

1. Ansari W. M. et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on proinflammatory/anti-inflammatory cytokine imbalance in premature coronary artery disease //Postgraduate medical journal. – 2017. – Т. 93. – №. 1098. – С. 209-214.
2. Chehadeh S. W. E. H. et al. Relationship between MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and complications of type 2 diabetes mellitus in an Emirati population //Meta gene. – 2016. – Т. 9. – С. 70-75.
3. Eastwood J. A. et al. Premature atherosclerosis in premenopausal women: Does cytokine balance play a role? //Medical Hypotheses. – 2017. – Т. 109. – С. 38-41.
4. Hashad I. M. et al. Investigating the link between MCP-1 A-2518G, RANTES G-403A, CX3CR1 V249I and MTHFR C677T gene polymorphisms and the risk of acute myocardial infarction among Egyptians //Meta Gene. – 2017. – Т. 11. – С. 181-188.
5. Masud R., Baqai H. Z. THE COMMUNAL RELATION OF MTHFR, MTR, ACE GENE POLYMORPHISMS, AND HYPERHOMOCYSTEINEMIA AS CONCEIVABLE RISK OF CORONARY ARTERY DISEASE //Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. – 2017. – №. ja.
6. Matia-García I. et al. Correlation between cytokine profile and metabolic abnormalities in young subjects //Int J Clin Exp Med. – 2016. – Т. 9. – №. 8. – С. 16596-16604.
7. Rath D. et al. gPla Polymorphisms are associated with Outcomes in Patients at high cardiovascular risk //Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2017. – Т. 4. – С. 52.

8. Shim A. L. et al. Serum interleukin-6: Association with circulating cytokine serum levels in patients with sinus arrhythmia and patients with coronary artery disease //Cellular immunology. – 2016. – Т. 310. – С. 178-183.
9. URL: http://www.who.int (дата обращения: 9.01.2018)
10. Алугишвили А. З. A1166C полиморфизм гена рецептора 1 типа ангиотензина II и дисфункция эндотелия у мужчин, перенесших инфаркт миокарда в молодом возрасте //Российский кардиологический журнал. – 2017. – №. 6. – С. 5-9.
11. Балацкий А. В. и др. Полиморфизм гена Т-кадгерина (CDH13) ассоциирован с характером манифестации ишемической болезни сердца //Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2016. – №. 1.
12. Бернс С. А. и др. Динамика изменений уровней цитокинов на госпитальном этапе у больных с различными клиническими вариантами острого коронарного синдрома //Медицинская иммунология. – 2016. – Т. 18. – №. 1.
13. Маркелова Е. В., Шкорик Е. В., Силаев А. А. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ УРОВНЯ TNFα, IL-10 И ММП-1 У ПАЦИЕНТОВ С ИБС ПОСЛЕ АОРТОКОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ //Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – №. SV. – С. 290-290.
14. Мешков А. Н., Щербакова Н. В. Молекулярно-генетическая диагностика предрасположенности к развитию ишемической болезни сердца: современное состояние проблемы //Consilium Medicum. – 2016. – Т. 18. – №. 12. – С. 22-26.
15. Мирошников А. Е. и др. Генетические аспекты возможности прогнозирования затрат на медицинскую помощь у лиц с сердечно-сосудистыми заболеваниями //Universum: медицина и фармакология. – 2016. – №. 1-2 (24).
16. Морозова Е. В., Маль Г. С. Генетические аспекты нарушений липидного обмена и формирования ишемической болезни сердца //Тенденции науки и образования в современном мире. – 2017. – №. 26-3. – С. 12-17.

Информационные ресурсы для обучающихся

1. ALFRED. URL: [Электронный ресурс] http://alfred.med.yale.edu (дата обращения 12.12.2017)
2. HuGENavigator. [Электронный ресурс] URL: http://hugenavigator.net (дата обращения 12.12.2017)
3. WHO [Электронный ресурс] URL:http://www.who.int (дата обращения: 9.01.2018)
4. NCBI [Электронный ресурс] URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov
5. КИБЕРЛЕНИНКА [Электронный ресурс] URL:https://cyberleninka.ru/
6. Медицинская статистика [Электронный ресурс] URL: http://medstatistic.ru/calculators/averagestudent.html

Приложение №1

Карта фиксации образовательных результатов.
РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ПРЕДМЕТНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предметный результат Обучающийся: - знает ведущих отечественных ученых биологов и генетиков, - знает определения основных понятий генетики и иммунологии (ген, ДНК, РНК, репликация, транскрипция, трансляция, взаимодействие генов, мутация, SNP, полиморфизм, иммунитет, цитокины, продукция, t-критерий Стьюдента, хи-квадрат, корреляция, доверительный интервал, уровень значимости), а также основы медицинской статистики и работы в международных базах данных	**Фамилия, имя ребенка**												**Итого**
начальный замер													0- 1- 2- 3-
промежуточный замер													0- 1- 2- 3-
итоговый замер													0- 1- 2- 3-

Уровень 0 – решено 0-40% задания
Уровень 1 – решено 41-60% задания
Уровень 2 – решено 61-80% задания
Уровень 3 – решено 81-100%

Карта фиксации образовательных результатов.
РЕЗУЛЬТАТЫ ОВЛАДЕНИЯ ЛИЧНОСТНЫМИ, МЕТАПРЕДМЕТНЫМИ, ПРЕДМЕТНЫМИ РЕЗУЛЬТАТАМИ

Образовательные результаты		**Фамилия, имя ребенка**															**итого**
Личностные: - обучающийся демонстрирует чувство гордости за достижения ведущих отечественных учёных, выражают желание вносить собственный вклад в развитие региона и страны	начальный замер																0__, 1__, 2__
	итоговый замер																0__, 1__, 2__
Метапредметный: - обучающийся может самостоятельно разрабатывать дизайн проекта, оформлять доклад и презентацию	начальный замер																0__, 1__, 2__, 3__
	финальный замер																0__, 1__, 2__, 3__
Метапредметный: - обучающийся анализирует информационные источники и работают в современных базах данных	начальный замер																0__, 1__, 2__, 3__
	финальный замер																0__, 1__, 2__, 3__

Метапредметный: - обучающийся получает, анализирует и статистически обрабатывает экспериментальные данные	начальный замер																0__, 1__, 2__, 3__
	финальный замер																0__, 1__, 2__, 3__
Предметные: - владеют навыками постановки полимеразной цепной реакции, иммуноферментного анализа и проточной цитометрии	начальный замер																0__, 1__, 2__, 3__
	промежу-точный замер																0__, 1__, 2__, 3__
	финальный замер																0__, 1__, 2__, 3__

Уровень 0 – не владеет всеми перечисленными умениями, не демонстрирует качества
Уровень 1 – владеет умениями на низком уровне, проявляет качества и положительное отношение нестабильно
Уровень 2 – уровень владения умениями хороший, качества и положительное отношение проявляет стабильно
Уровень 3 – умеет и владеет всеми необходимыми навыками на отличном уровне

СУММАРНЫЙ УРОВЕНЬ ДОСТИЖЕНИЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОГРАММЫ

№	Образовательный результат	По итогам начального замера	По итогам итогового замера	Вывод по достижению предполагаемого результата
1.		**на уровне 3** – …чел. **на уровне 2** – …чел. **на уровне 1** – …чел. **на уровне 0** – …чел.	**на уровне 3** – …чел. **на уровне 2** – …чел. **на уровне 1** – …чел. **на уровне 0** – …чел.	

Приложение № 2

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ВОСПИТАНИЯ,
реализующаяся в рамках дополнительной общеобразовательной программы «Иммуногенетика и биомедицина»

Цель программы:
Формирование активной гражданско-патриотической позиции, выражающейся в демонстрации чувства гордости за достижения отечественных ученых-биологов и генетиков, готовности вносить профессиональный вклад в развитие отечественной науки и практики.

Задачи программы:
1. актуализировать роль генетики и иммунологии в жизни российского сообщества;
2. познакомить обучающихся с именами ведущих отечественных ученых биологов и генетиков, с их достижениями в отечественной и мировой науке;
3. мотивировать обучающихся на внесение собственного вклада в развитие отечественной науки и практики;
4. познакомить с перечнем профессий, связанных с генетикой и иммунологией, особенностями каждой профессии;
5. предоставить возможность профессиональных проб.

Предполагаемые результаты:
1. участники программы демонстрируют чувство гордости за достижения ведущих отечественных ученых биологов и генетиков, выражают желание вносить собственный вклад в развитие региона и страны;
2. участники программы осознают роль генетики и иммунологии в жизни российского сообщества;
3. участники программы знают ведущих отечественных ученых биологов и генетиков;
4. участники программы знают основные профессии, связанные с генетикой и иммунологией, особенности каждой профессии;
5. участники программы с интересом и желанием участвуют в лабораторных и экспериментальных работах, разрабатывают на их основе проектные работы.

Содержание программы.

Региональный центр выявления и поддержки одаренных детей «Полярис-Адыгея» создан 17 мая 2019 года в рамках федерального проекта «Успех каждого ребенка» национального проекта «Образование». Он создан

по модели образовательного центра «Сириус», координатором которого является образовательный фонд «Талант и успех».

Согласно регламентирующим документам фонда «Талант и успех» одними из ключевых направлений деятельности образовательного центра «Полярис-Адыгея» являются:

- выявление проявляющих выдающиеся способности детей и молодежи, проживающих в Республике Адыгея, сопровождение и мониторинг их дальнейшего развития;
- разработка и реализация программ по направлениям «Искусство», «Наука» и «Спорт» для детей и молодежи, проявивших выдающиеся способности;
- обеспечение индивидуальной работы с детьми и молодежью, проявившими выдающиеся способности, по формированию и развитию их познавательных интересов, построению индивидуальных образовательных маршрутов, в том числе тьюторской и (или) тренерской поддержки;
- формирование и развитие партнерской сети из предприятий, научных и образовательных организаций, организаций культуры и спорта, общественных организаций, осуществляющих свою деятельность на территории Республики Адыгея, для обеспечения сопровождения и дальнейшего развития детей и молодежи, проявивших выдающиеся способности.

Таким образом, особенности воспитательного процесса образовательного центра «Полярис-Адыгея» ориентированы на стратегические задачи государства, обозначенные в «Стратегии научно-технического развития Российской Федерации», утвержденной Указом Президента Российской Федерации от 1 декабря 2016 г. N 642, федеральном проекте «Успех каждого ребенка» и Методических рекомендациях по созданию и функционированию региональных центров выявления, поддержки и развития способностей и талантов у детей и молодежи, созданных с учетом опыта Образовательного Фонда «Талант и успех» в рамках реализации федерального проекта «Успех каждого ребенка» национального проекта «Образование», утвержденных Министерством просвещения РФ 19 января 2022 г.

Воспитательная деятельность, реализующаяся в рамках образовательной программы «Иммуногенетика и биомедицина», осуществляется в рамках учебных занятий. Ниже представлен её план, система интегрирования воспитательной и обучающей деятельности, содержание и формы воспитательной деятельности.

Тематический план воспитательной деятельности

Тема занятия согласно учебно-тематического плана ДОП	Воспитательные задачи	Краткое содержание воспитательной работы	Форма работы
Введение в генетику и иммунологию.	- актуализировать роль генетики и иммунологии в жизни российского сообщества; - познакомить обучающихся с именами ведущих отечественных ученых биологов и генетиков, с их достижениями в отечественной и мировой науке; - познакомить с перечнем профессий, связанных с генетикой и иммунологией, особенностями каждой профессии	На лекции ребят знакомят с мировыми достижениями российских ученых в области генетики и иммунологии. Приводятся примеры современных ученых, их вклада в развитие науки. Рассматриваются достижения в области вакцинации, продовольственной безопасности, редактирования генома, секвенирования единичных клеток. Во время занятий у школьников формируется развитие чувства неравнодушия к судьбе Отечества, к его прошлому, настоящему и будущему с целью мотивации обучающихся к реализации и защите интересов Родины.	Лекция, дискуссия, опрос, работа в группах.
Гены – это ДНК. Гены кодируют белки	- актуализировать роль генетики и иммунологии в жизни российского сообщества	На занятиях мы говорим о генах, о роли наследственной информации в формировании строения человека, его поведении и привычках, а также о проблемах, связанных с мутациями в генах, о том, к каким социально значимым заболеваниям они могут привести. У ребят формируется воспитанность в отношении к ценностям общества, развиваются нравственные чувства.	Лекция, дискуссия, опрос, работа в группах
Прерывистый ген. Структура генома. Последовательности генома и число генов. Кластеры и повторы	- мотивировать обучающихся на внесение собственного вклада в развитие отечественной науки и практики	На занятии рассматриваются основные методы изучения генов, раскрываются проблемы анализа генов и некодирующей ДНК. Перед ребятами ставятся задачи по поиску решений для изучения генов, раскрываются возможности применения новых решений в отечественной науке.	Лекция, дискуссия, опрос, работа в группах

Матричная РНК. Синтез белка. Расшифровка генетического кода	- мотивировать обучающихся на внесение собственного вклада в развитие отечественной науки и практики	Школьники осваивают методы секвенирования генома, в процессе обучения развивается тяга к открытиям в области расшифровки специфических геномных последовательностей жителей РФ, для поиска таргетных участков ДНК	Лекция, дискуссия, опрос, работа в группах
Локализация белка. Транскрипция. Оперон. Регуляторная РНК. Международные базы данных	- мотивировать обучающихся на внесение собственного вклада в развитие отечественной науки и практики	Анализ международных баз данных и их сравнение с отечественными базами дает ребятам представление о слабых и сильных сторонах отечественной литературы, у школьников формируется тяга к развитию отечественных баз, ученики формируют свои предложения по их развитию	Выполнение исследовательского задания, работа в группах
Репликон. Внехромосомные репликоны. Репликация ДНК. Системы репликации	- мотивировать обучающихся на внесение собственного вклада в развитие отечественной науки и практики	Репликация ДНК – фундаментальный процесс биологии, изучая репликацию школьники чувствуют тягу к новым открытиям в этом процессе, понимают важность открытий для Российской науки	Лекция, дискуссия, опрос, работа в группах
Транспозоны. Промоторы и энхансеры. Активация транскрипции	- мотивировать обучающихся на внесение собственного вклада в развитие отечественной науки и практики	Транскрипция и ее активация важный и многокомпонентный процесс, во время изучения данной темы школьники стремятся предложить новые методы его изучения, для того, чтобы внести свой вклад в развитие отечественной науки.	Лекция, дискуссия, опрос, работа в группах
Сплайсинг и процессинг РНК. Анализ статистическая обработка экспериментальных данных.	- предоставить возможность профессиональных проб	На занятиях ребята проходят все этапы исследовательской деятельности, представляют себя в роле настоящих научных сотрудников. Развиваются психологическая готовность к профессиональной деятельности по избранной профессии.	Образовательный хакатон
Хромосомы. Нуклеосомы. Контроль структуры хроматина. Наследование эпигенетических эффектов	- актуализировать роль генетики и иммунологии в жизни российского сообщества	Ребята узнают о роли эпигенетики в жизни человека, понимают зависимость развития человека от среды обитания, у ребят формируется четкое представление о том, как	Лекция, дискуссия, опрос, работа в группах

		их знания можно использовать для поиска этногенетических маркеров развития социально значимых заболеваний с целью создания тест-систем для донозологической диагностики	
Как работает иммунитет	- актуализировать роль генетики и иммунологии в жизни российского сообщества; - познакомить обучающихся с именами ведущих отечественных ученых биологов и генетиков, с их достижениями в отечественной и мировой науке	Приводятся примеры отечественных ученых иммунологов, современные достижения иммунологии, дается понятие о том, как работает иммунитет, у школьников формируется культура ведения здорового и безопасного образа жизни, развитие способности к сохранению и укреплению здоровья	Лекция, дискуссия, опрос, работа в группах
Лимфоидные клетки иммунной системы	- мотивировать обучающихся на внесение собственного вклада в развитие отечественной науки и практики	На примере пандемии COVID-19 рассматривается значение лимфоидных клеток в противостоянии инфекциям, приводятся примеры успешной вакцинации отечественной вакциной «Спутник V», развивается мотивация к созданию вакцины на основе РНК для предотвращения возможных новых пандемий.	Лекция, дискуссия, опрос, работа в группах
Как формируется многообразие антител	- актуализировать роль генетики и иммунологии в жизни российского сообщества;	Антитела играют значительную роль в противовирусном и противобактериальном иммунитете, школьники узнают о лекарственных препаратах, разрабатываемых Российскими фармацевтическими клиниками на основе антител, предлагают сои варианты лекарственных препаратов необходимых для лечения социально значимых заболеваний, наиболее распространенных в России	Лекция, дискуссия, опрос, работа в группах
Основы медицинской статистики.	- предоставить возможность профессиональных проб	Во время статистического анализа полученных результатов ученики осваивают профессию биоинформатика, знакомятся с языком программирования «R».	Лекция, практическая экспериментальная работа

Проектирование.	- предоставить возможность профессиональных проб	На занятиях по проектированию, школьники оформляют свои проекты в соответствии с академическими принципами и методами, защищают свои проекты, пробуют себя в качестве научных сотрудников и преподавателей.	Индивидуальна работа и работа в группах, проектирование, конференция
Подведение итогов.	- познакомить с перечнем профессий, связанных с генетикой и иммунологией, особенностями каждой профессии	На последних занятиях школьники знакомятся с профессиями в области биологии, посещают другие лаборатории, приходят в университет, пробуют себя в качестве преподавателей в своей собственной группе	Образовательные экскурсии, опрос, тематические выступления

Кадровое обеспечение программы:

- **Шумилов Дмитрий Сергеевич**, к.б.н., старший научный сотрудник отдела медико-биологических проблем НИИ Комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», **автор программы**;
- **Тугуз Аминат Рамазановна**, д.б.н., профессор кафедры ботаники Адыгейского государственного университета, преподаватель;
- **Татаркова Елена Анатольевна**, к.б.н., старший научный сотрудник отдела медико-биологических проблем НИИ Комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», преподаватель.

Анализ воспитательного процесса

Анализ воспитательного процесса происходит по следующим направлениям:

- оценка уровня достижения предполагаемых результатов, исходя из динамики (начальный, промежуточный и итоговый замер с помощью включенного наблюдения);
- оценка уровня удовлетворенности обучающегося участием в программе (с помощью анонимного онлайн опроса), где обучающийся может обозначить сильные и слабые стороны содержания программы, взаимодействие со сверстниками и педагогом.

Итоги самоанализа оформляются в аналитической справке и обсуждаются на итоговом педагогическом совещании образовательного центра «Полярис-Адыгея».

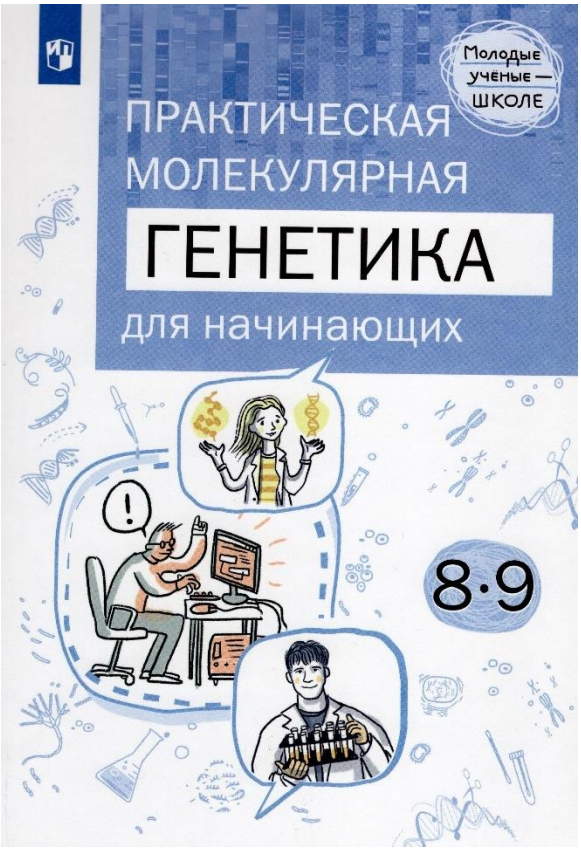
Приложение № 3

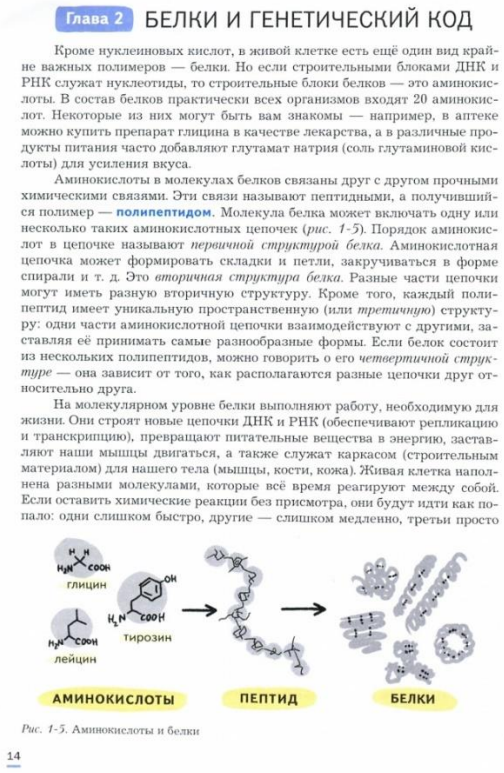
Методические материалы
дополнительной общеобразовательной программы
«Иммуногенетика и биомедицина»

В качестве методической литературы были использованы как учебные материалы, так и методические пособия для проведения экспериментов.

Учебные материалы:

1. Аульченко Ю. С. и др. Естественно-научные предметы. Практическая молекулярная генетика для начинающих: 8–9-е классы. – 2021.





Глава 2 БЕЛКИ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

Кроме нуклеиновых кислот, в живой клетке есть ещё один вид крайне важных полимеров — белки. Но если строительными блоками ДНК и РНК служат нуклеотиды, то строительные блоки белков — это аминокислоты. В состав белков практически всех организмов входят 20 аминокислот. Некоторые из них могут быть вам знакомы — например, в аптеке можно купить препарат глицина в качестве лекарства, а в различные продукты питания часто добавляют глутамат натрия (соль глутаминовой кислоты) для усиления вкуса.

Аминокислоты в молекулах белков связаны друг с другом прочными химическими связями. Эти связи называют пептидными, а получившийся полимер — **полипептидом**. Молекула белка может включать одну или несколько таких аминокислотных цепочек (*рис. 1-5*). Порядок аминокислот в цепочке называют *первичной структурой белка*. Аминокислотная цепочка может формировать складки и петли, закручиваться в форме спирали и т. д. Это *вторичная структура белка*. Разные части цепочки могут иметь разную вторичную структуру. Кроме того, каждый полипептид имеет уникальную пространственную (или *третичную*) структуру: одни части аминокислотной цепочки взаимодействуют с другими, заставляя её принимать самые разнообразные формы. Если белок состоит из нескольких полипептидов, можно говорить о его *четвертичной структуре* — она зависит от того, как располагаются разные цепочки друг относительно друга.

На молекулярном уровне белки выполняют работу, необходимую для жизни. Они строят новые цепочки ДНК и РНК (обеспечивают репликацию и транскрипцию), превращают питательные вещества в энергию, заставляют наши мышцы двигаться, а также служат каркасом (строительным материалом) для нашего тела (мышцы, кости, кожа). Живая клетка наполнена разными молекулами, которые всё время реагируют между собой. Если оставить химические реакции без присмотра, они будут идти как попало: одни слишком быстро, другие — слишком медленно, третьи просто

Рис. 1-5. Аминокислоты и белки

14

Одна из самых лучших книг по генетике написанная на понятном для школьников языке.

2. Кребс Д., Голдшейн Э., Килпатрик С. Гены по Льюину //М.: Лаборатория знаний. – 2020.

Классический учебник по генетике

цепей дуплекса в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи.

Вирусы, несущие одноцепочечные геномы, для синтеза комплементарной цепи используют свою единственную цепь в качестве матрицы. А уже новая, комплементарная исходному геному цепь, в свою очередь, используется для синтеза молекул, идентичных оригинальной матрице. В процессе вирусной репликации на некоторых стадиях могут формироваться стабильные или временные двухцепочечные нуклеиновые кислоты.

Ограничение, касающееся однонаправленности переноса информации от ДНК к РНК, не является абсолютным. Оно нарушается **ретровирусами**, чьи геномы состоят из одноцепочечных молекул РНК. В процессе жизненного цикла РНК ретровирусов переводится в ДНК по механизму **обратной транскрипции** с участием фермента *обратной транскриптазы* (РНК-зависимой ДНК-полимеразы). В свою очередь, одноцепочечная ДНК переходит в двухцепочечную форму. Двухцепочечная ДНК становится частью генома клетки-хозяина и наследуется так же, как другие гены. Таким образом, обратная транскрипция позволяет РНК переносить генетическую информацию и предоставлять ее клетке в виде ДНК.

Существование механизмов обратной транскрипции и репликации РНК устанавливает важный принцип: *информация, содержащаяся в нуклеиновых кислотах любого типа, может быть переведена из одной формы в другую*. Чаще всего клетка использует процессы репликации ДНК, транскрипции и трансляции. Однако в редких случаях (вероятно, опосредованных РНК-содержащими вирусами) информация клеточной РНК переводится в ДНК и встраивается обратно в геном.

Несмотря на то что обратная транскрипция не играет значительной роли во внутриклеточных процессах, она приобретает значимость при рассмотрении вопроса эволюции генома.

Те же принципы сохранения генетической информации справедливы и для больших геномов растений и амфибий, и для сравнительно небольшого генома микоплазмы, и для еще меньших по размеру геномов ДНК- и РНК-содержащих вирусов. На РИС. 1.21 представлены примеры разнообразия типов и размеров различных геномов. Причины столь значительных различий в величине геномов и в количестве генов обсуждаются в гл. 5 и 6.

Во всем разнообразии организмов, содержащих варьирующие в сотни тысяч раз по размеру геномы, принцип остается общим: ДНК кодирует все белки, которые должны синтезировать клетки организма. Белки прямо или опосредованно выполняют функции, необходимые для выживания организма. Положий принцип описывает суть генетической информации и у вирусов (вне зависимости от того, содержат они ДНК или РНК): нуклеиновые кислоты кодируют белки, необходимые для упаковки генома и для выполнения любых других дополнительных (к выполняемым белками клетки-хозяина) функций, служащих цели репродукции вируса. Некоторые вирусы (например, сателлитный вирус некроза табака STNV) не могут реплицироваться без помощи других вирусов. Так, сателлитному вирусу некроза табака необходимо одновременное присутствие в клетке вспомогательного вируса — вируса некроза табака TNV, который сам по себе является полноценным инфекционным вирусом.

Геном	Число генов	Число нуклеотидов
Организмы		
Растения	<50 000	$<10^{11}$
Млекопитающие	30 000	$\sim 3 \times 10^9$
Черви	14 000	$\sim 10^8$
Мухи	12 000	$1,6 \times 10^8$
Грибы	6000	$1,3 \times 10^7$
Бактерии	2000–4000	$<10^7$
Микоплазмы	500	$<10^6$
Вирусы, содержащие двухцепочечную ДНК		
Коровья оспа	<300	187 000
Папоовавирус (SV40)	~6	5226
Фаг T4	~200	165 000
Вирусы, содержащие одноцепочечную ДНК		
Парвовирус	5	5000
Фаг φX174	11	5387
Вирусы, содержащие двухцепочечную РНК		
Реовирус	22	23 000
Вирусы, содержащие одноцепочечную РНК		
Коронавирус	7	20 000
Вирус гриппа	12	13 500
Вирус табачной мозаики (TMV)	4	6400
Фаг MS2	4	3569
Сателлитный вирус некроза табака (STNV)	1	1300
Вироиды		
Вироид веретеновидности клубней картофеля (PSTV)	0	359

РИС. 1.21 Размер составляющих геном нуклеиновых кислот варьирует в широком диапазоне

1.10 Нуклеиновые кислоты гибридизуются в соответствии с принципом комплементарности

Основные положения

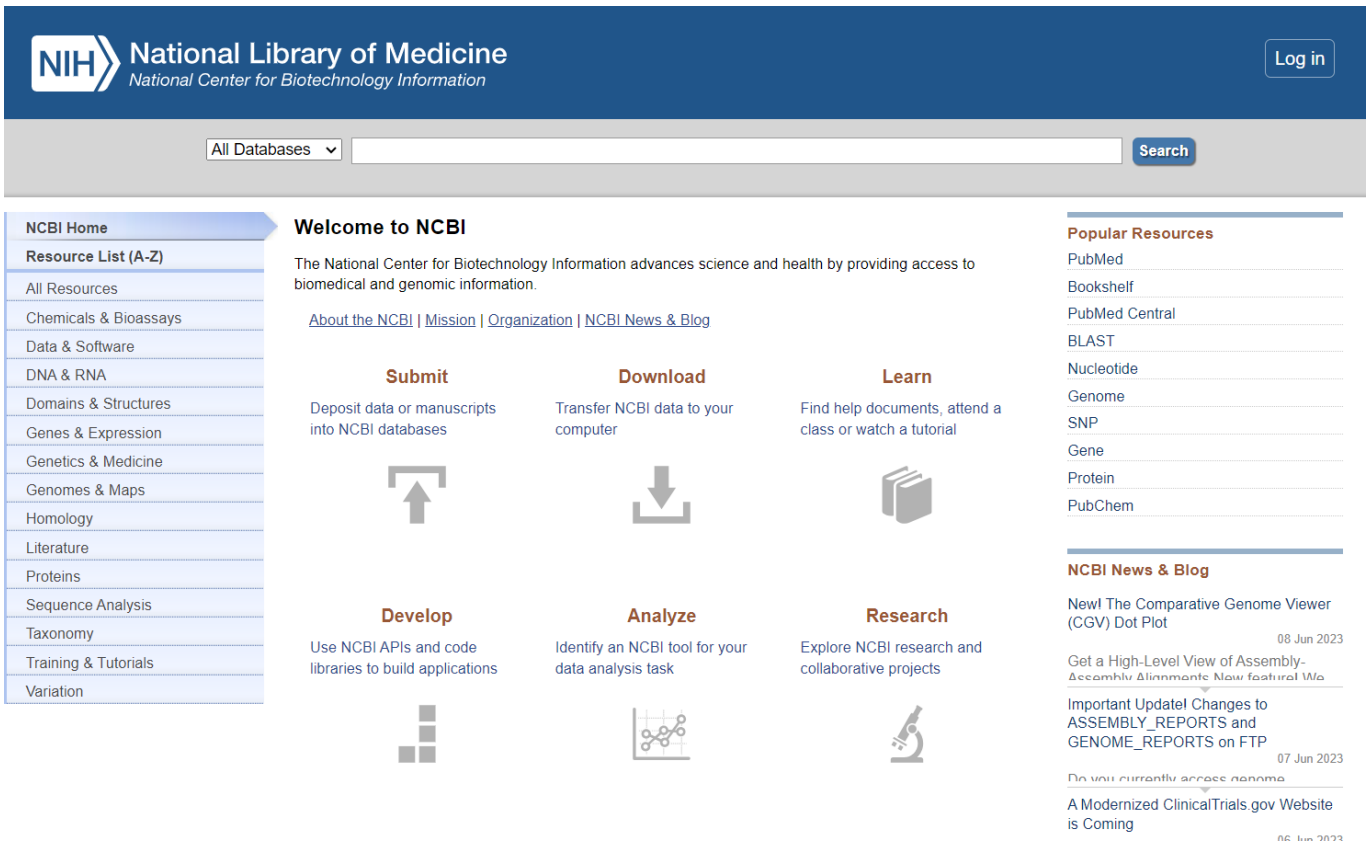
- Нагревание приводит к разделению цепей ДНК-дуплекса.
- Температура плавления T_m — это температура разделения цепей дуплекса.
- Комплементарные одноцепочечные молекулы ДНК при понижении температуры могут ренатурировать (с образованием дуплекса).
- Процессы денатурации (плавления) и ренатурации (гибридизации) могут происходить как между однотипными молекулами, так и между молекулами разного типа. При этом могут формироваться дуплексы ДНК–ДНК, РНК–ДНК и РНК–РНК.
- Способность двух одноцепочечных нуклеиновых кислот гибридизоваться зависит от степени их комплементарности.

Способность разделяться на две цепи без разрушения ковалентных связей является важным свойством двойной спирали. Эта способность позволяет цепям разъ-

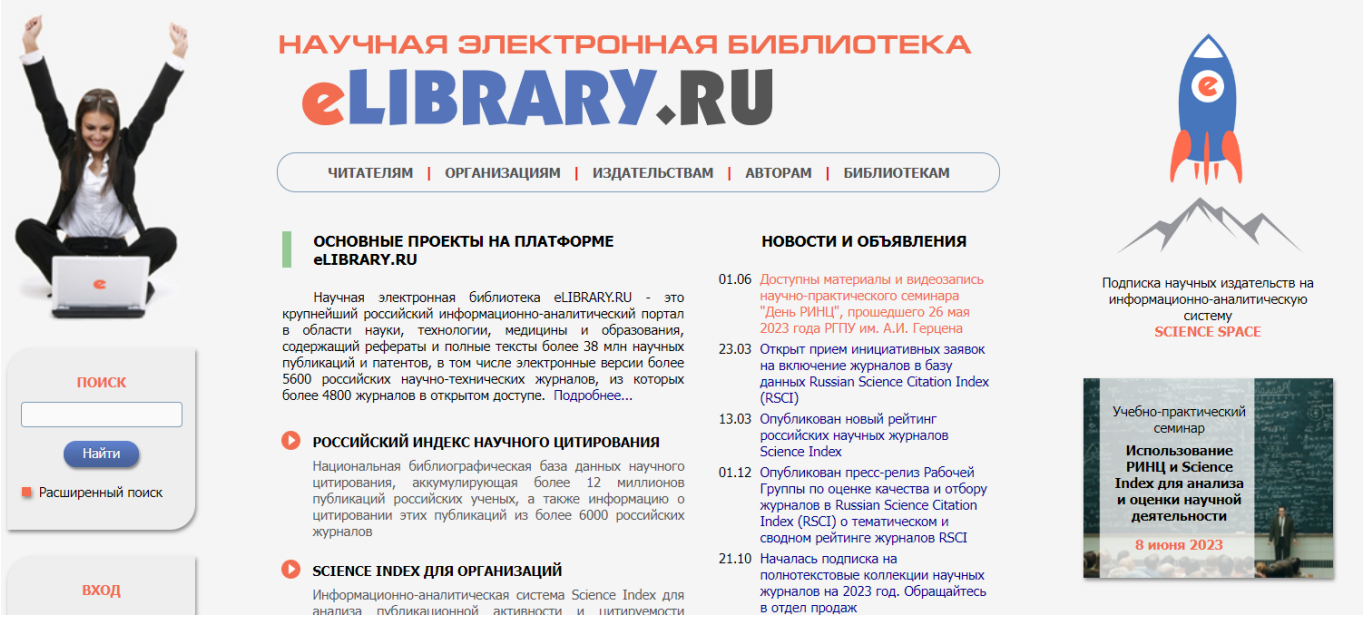
28 ГЛАВА 1 Гены — это ДНК

3. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

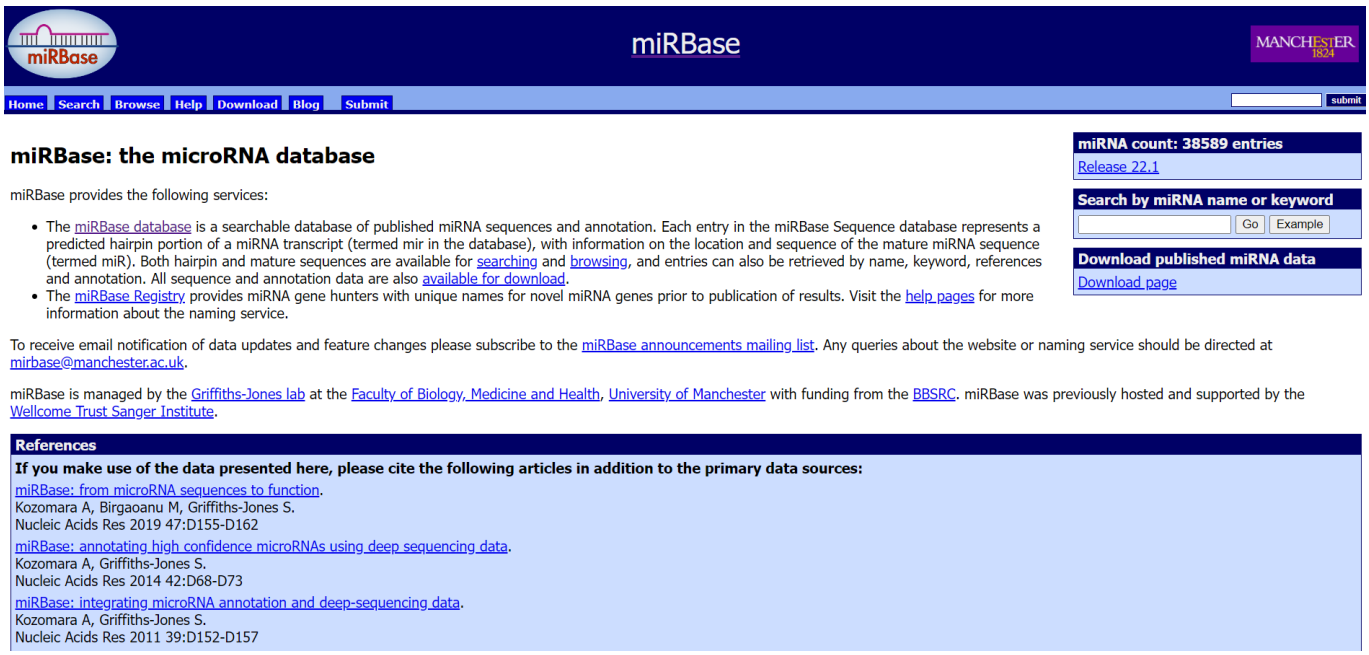
Международная база данных содержащая по мимо статей множество информации, включая генетические последовательности множества генов человека и различных животных



4. https://elibrary.ru/defaultx.asp?
Отечественная база данных для поиска научных статей

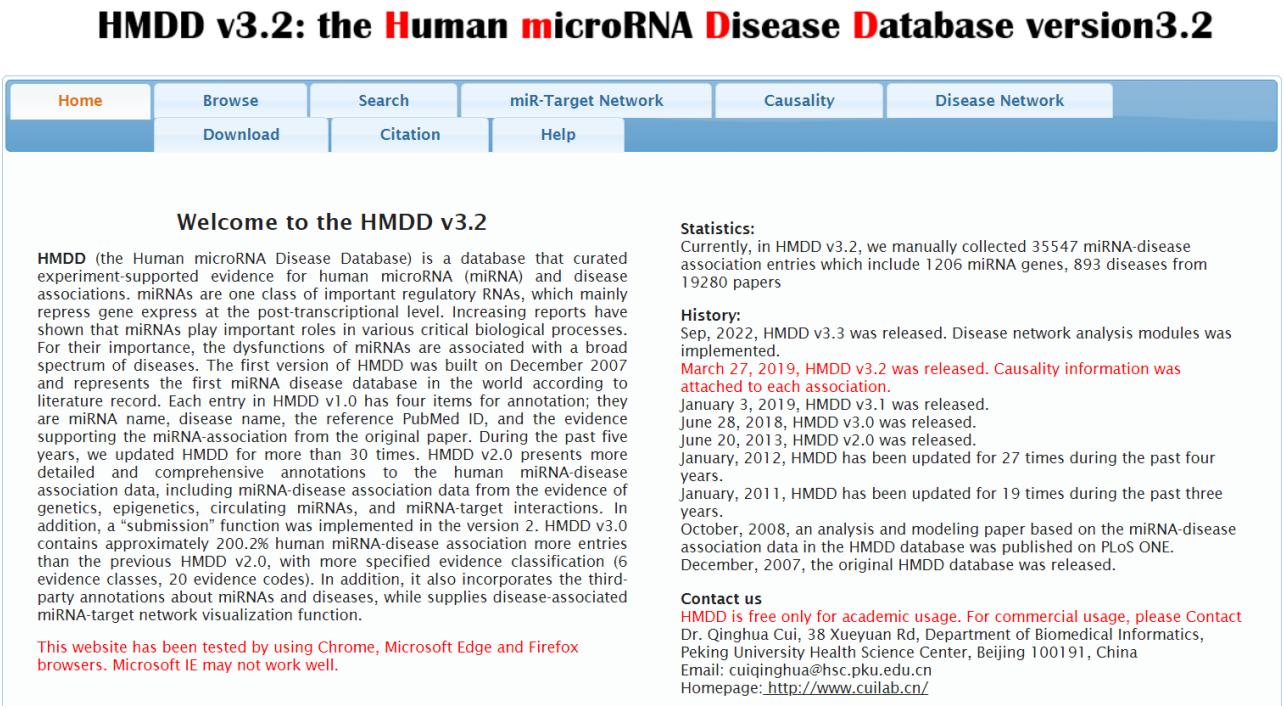


5. https://www.mirbase.org/
Международная база для поиска микро-РНК



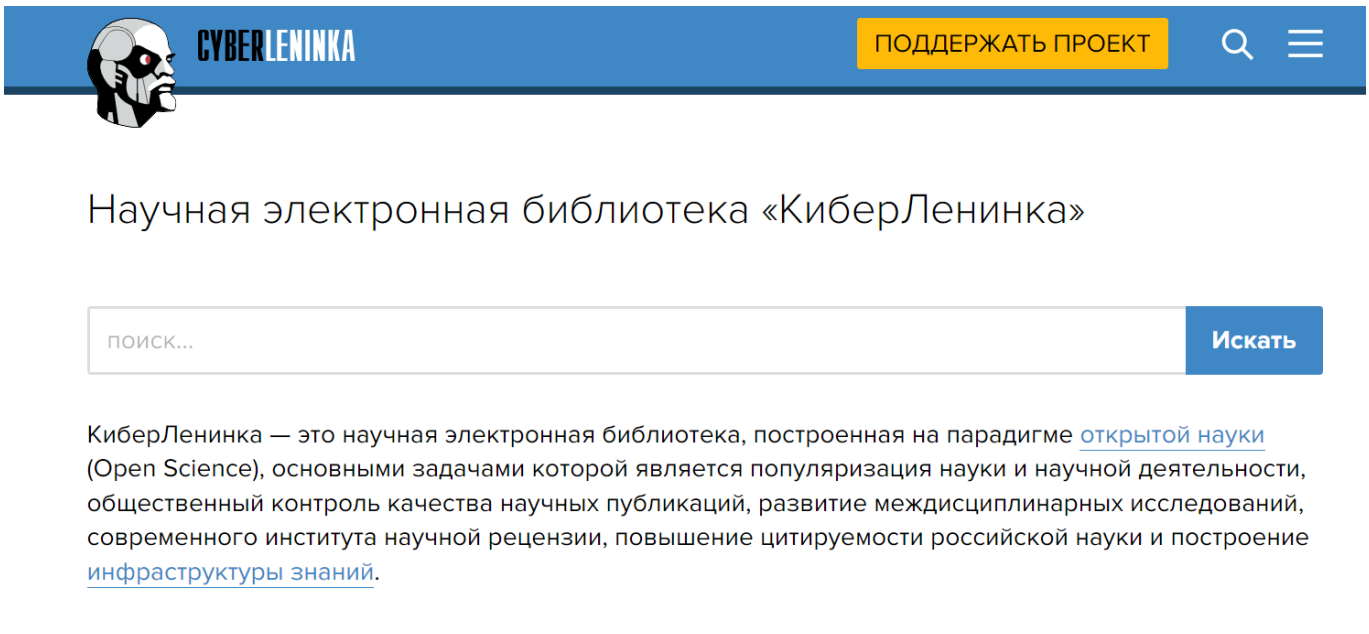
6. https://www.cuilab.cn/hmdd

Боза данных для поиска связей между различными микро-РНК и заболеваниями человека

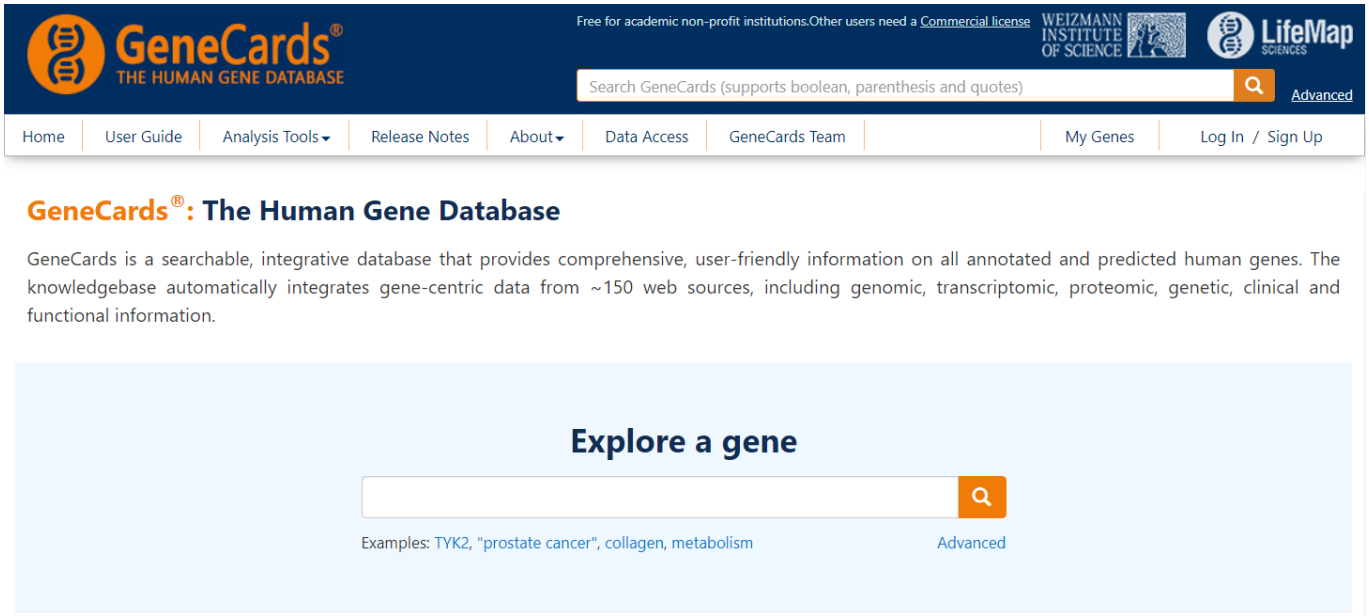


7. https://cyberleninka.ru/

Отечественная база данных для поиска литературы

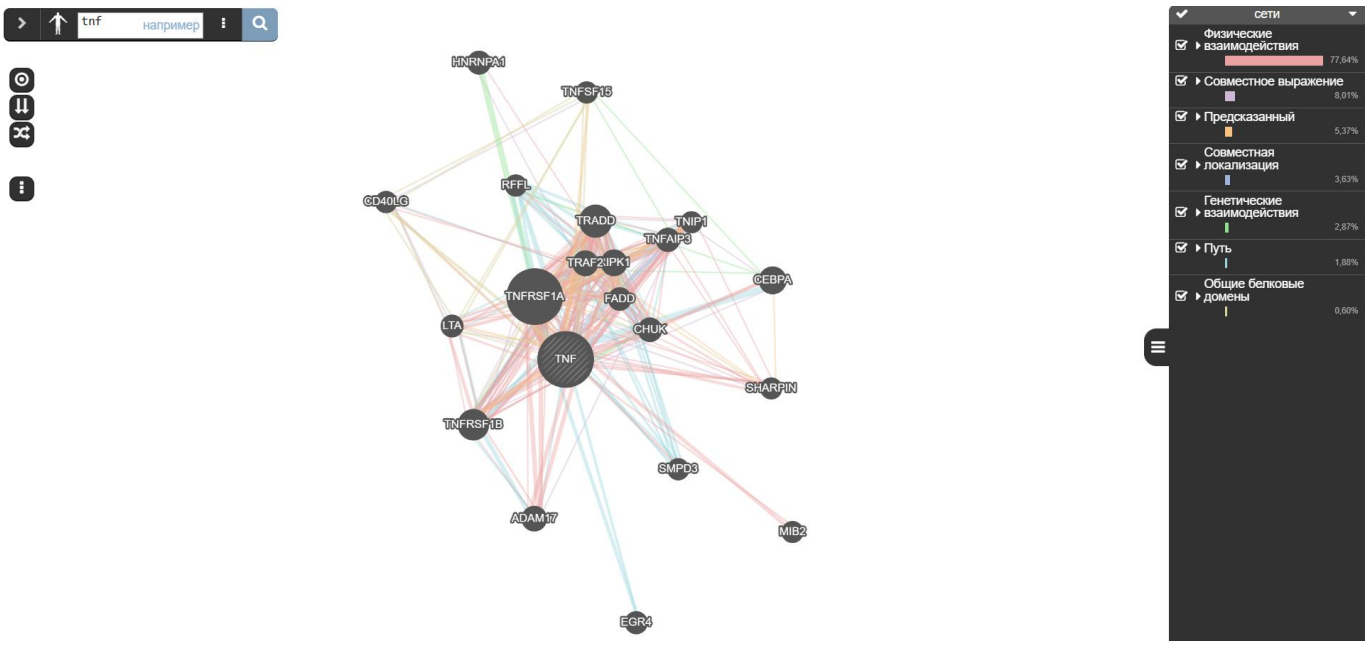


8. https://www.genecards.org/
Международная база данных для поиска генетической информации



9. https://genemania.org/search/homo-sapiens/tnf/

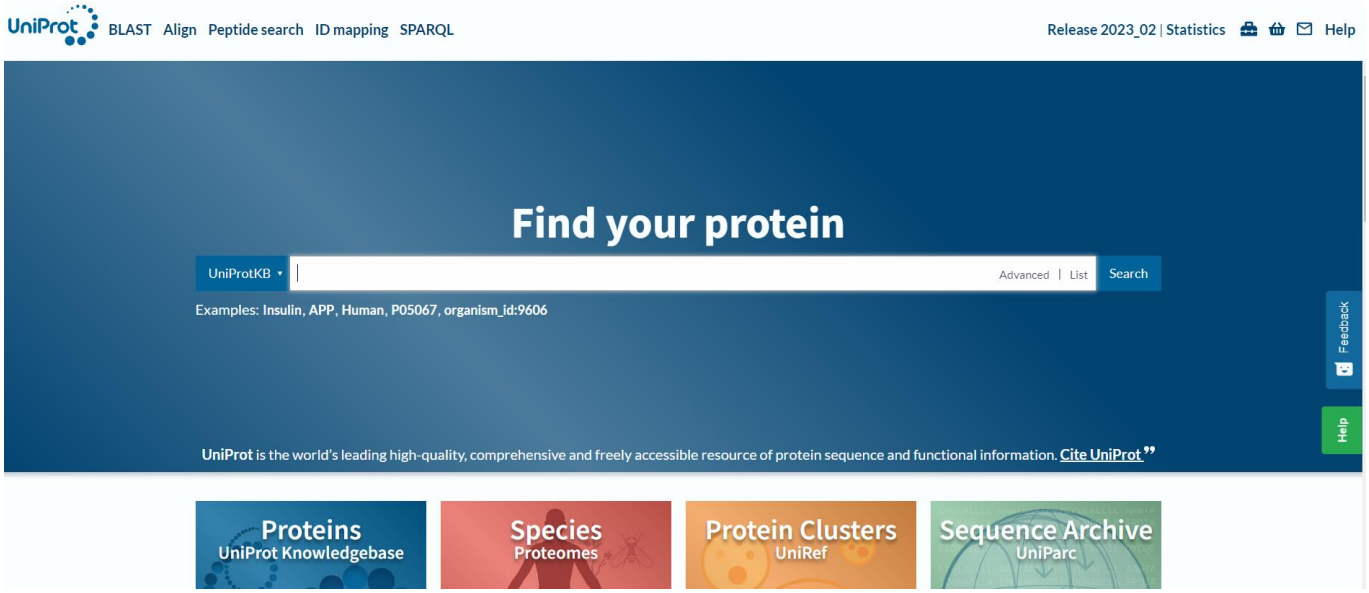
Сайт для построения карты взаимодействия между генами



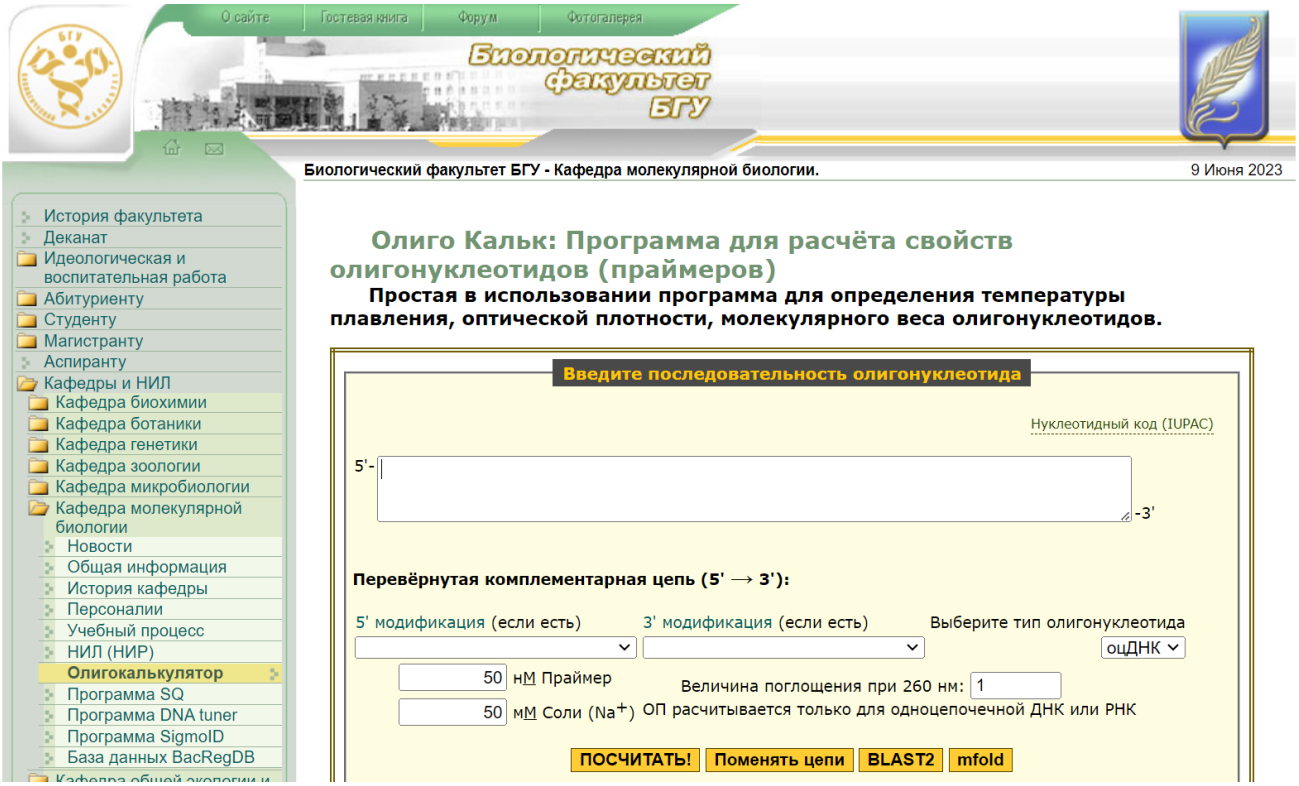
10. https://www.rcsb.org/

Сайт для поиска и моделирования структуры белков

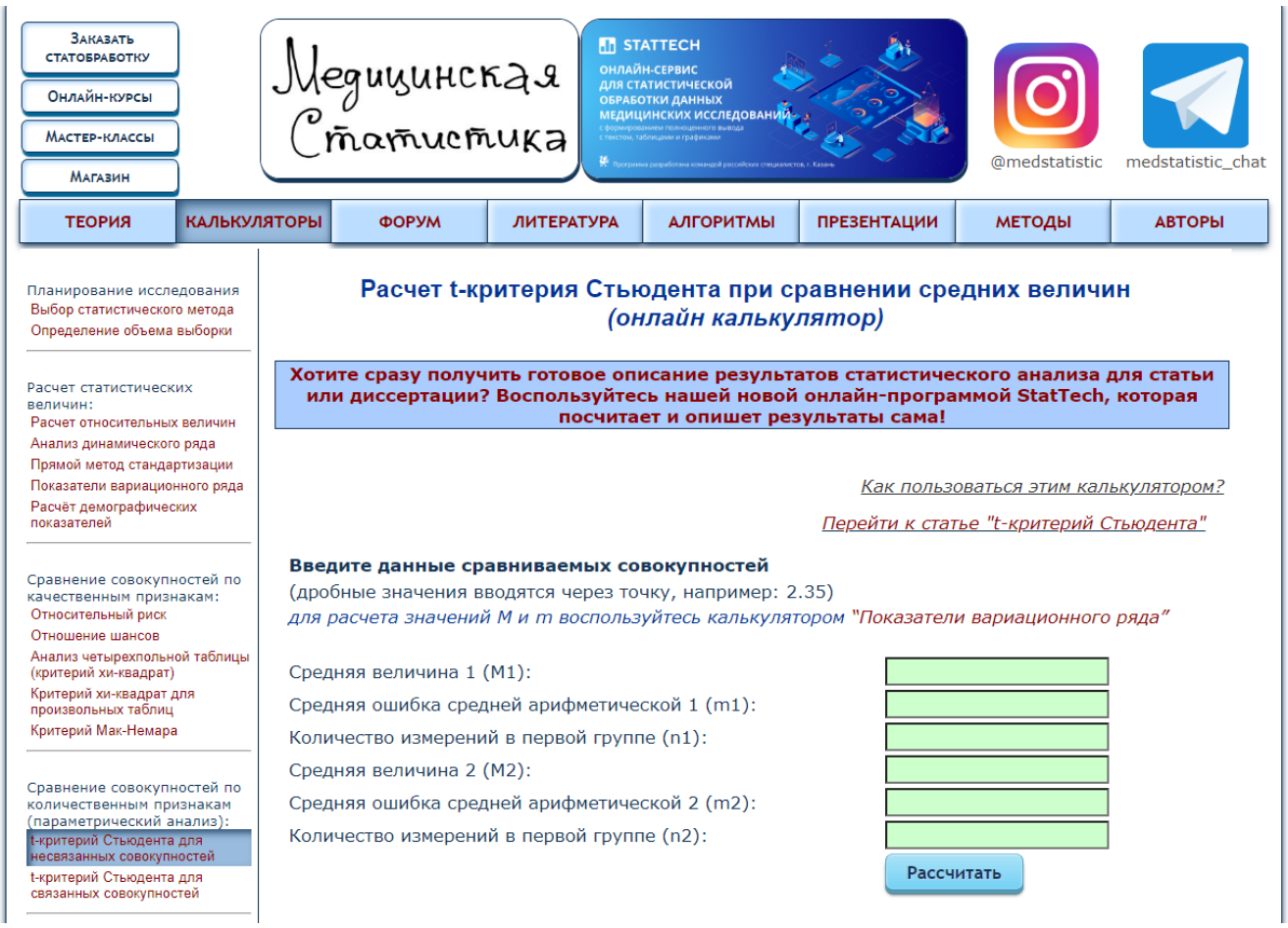
11. https://www.uniprot.org/
Сайт для поиска белков



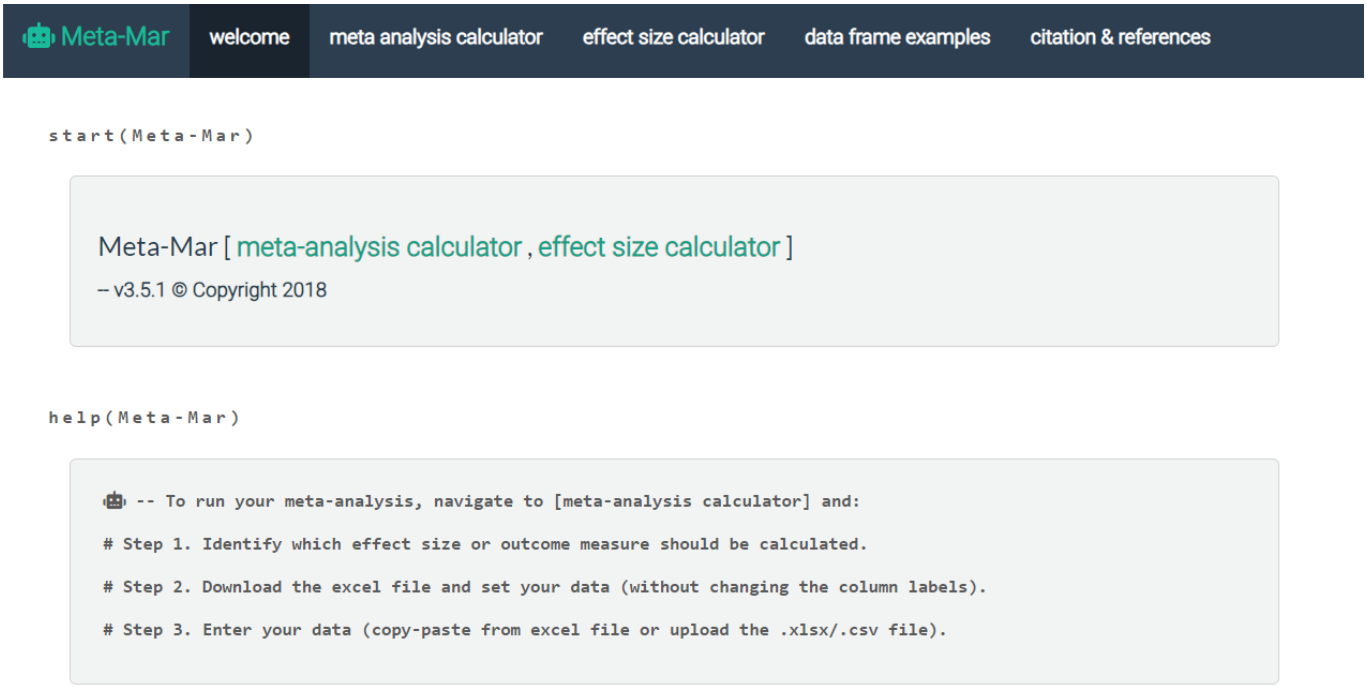
12. http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html
Сайт для расчета температуры плавления праймеров и оценки возможности образования шпилек



13. https://medstatistic.ru/calculators/averagestudent.html
Сайт для статистической обработки данных



14. https://meta-mar.shinyapps.io/meta-analysis-calculator/
Сайт для расчета метаанализа



Методические рекомендации для проведения исследований

Выделение РНК https://evrogen.ru/products/isolation/extract-rna

ЕВРОГЕН

ExtractRNA
РеагентдлявыделениясуммарнойРНК избиологическихобразцов
НомерпокаталогуBC032
Инструкция по применению
Реагент ExtractRNA предназначен только для исследовательских работ, выполняемых профессионально подготовленными пользователями.
Содержание

I. Состав и условия хранения 39
II. Меры предосторожности и утилизация 40
III. Необходимые материалы 40
IV. Протокол выделения суммарной РНК41
IV.1. Гомогенизация пробы 41
IV.2. Разделение фаз 41
IV.3. Выделение РНК 42
IV.4. Рекомендации по выделению РНК 43
V. Решение проблем **Ошибка! Закладка не определена.**

вер. 30 января 2023 г.
I Состав и условия хранения
Состав и условия хранения

Продукт	Кат. #	Объем	Кол-во процедур
Реагент ExtractRNA	BC032	100 мл	100 выделений из 100 мг ткани

Транспортировка: при комнатной температуре.
Хранение: при 2-8°C в темном месте.
Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки – 1 год.
ExtractRNA – монофазный водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата, предназначенный для быстрого выделения суммарной РНК высокого качества из

широкого круга объектов: животные и растительные ткани, культуры клеток млекопитающих, бактерии, дрожжи.
Добавленный к образцу реагент моментально лизирует клетки, при этом целостность РНК сохраняется за счет высокоэффективного ингибирования активности РНКаз. Раствор после добавления хлороформа и центрифугирования разделяется на водную фазу, интерфазу и органическую фазу, при этом РНК, ДНК и белки оказываются в разных фазах.
Общая РНК, выделенная с помощью реагента ExtractRNA, может быть использована для синтеза кДНК, ОТ-ПЦР, Нозерн блота, *in vitro* трансляции, выделения поли (A)+ фракции и других приложений.
Меры предосторожности и утилизация
Реагент ExtractRNA содержит фенол (токсичное и раздражающее вещество) и гуанидин-изотиоцианат (раздражающее вещество), при попадании на кожу вызывает ожоги.
I *Не допускайте попадания реагента на кожу или слизистые оболочки, а также вдыхания его паров!*
При работе с реагентом следует надевать защитные латексные или п/э перчатки, очки и халат, проводить все операции в вытяжном шкафу. При попадании на кожу рук или слизистые оболочки, немедленно
III Необходимые материалы
обработайте место слабым раствором соды и промойте большим количеством проточной воды не менее 15 минут. При необходимости, обратитесь за медицинской помощью.
При разливе реагента, нарушении герметичности тары, а также при утилизации остатков, смешать утилизируемую жидкость в соотношении не менее чем 1:1 с раствором слабой щелочи (0.1М гидроксид натрия/калия (NaOH/KOH) или раствор пищевой соды $NaHCO_3$). В случае отсутствия вышеназванных реагентов можно воспользоваться раствором обычного хозяйственного мыла в воде. Нейтрализовать не менее 10 минут.
Небольшие количества нейтрализованного раствора (до 1мл) можно слить в канализацию, разбавив большим количеством воды. Тряпки или губки поместить в п/э пакет и выбросить, место пролива промыть мыльной водой. Проветрить помещение не менее 3 часов. Утилизация реагента должна проводится в соответствии с правилами утилизации химических отходов.
Необходимые материалы

- Хлороформ
- Изопропиловый спирт
- 80% этиловый спирт
- Вода, свободная от РНКаз

I *Не рекомендуется использовать диэтилпирокарбонат (DEPC) для обработки воды и других компонентов.*

- Центрифуга с охлаждением, обеспечивающая ускорение не менее 12 000 g
- Настольный термостат (55-60°C)

- Стерильные микроцентрифужные пробирки (1.5-2 мл)
- Устройство для разрушения и гомогенизации тканей:

Для замороженных тканей – жидкий азот, ступка с пестиком.
Для свежих или зафиксированных в консервирующих растворах
(например, в фиксаторе IntactRNA, Евроген, кат. #BC031) тканей рекомендуется использовать гомогенизатор Даунса, шариковый
IV Протокол выделения суммарной РНК
гомогенизатор (бисерная мельница). Также можно измельчить ткани скальпелем.
Протокол выделения суммарной РНК
Гомогенизация пробы

1) Гомогенизируйте образец в растворе ExtractRNA в соответствии с рекомендациями для вашего типа пробы (см. IV.4.Рекомендации по выделению РНК).
2) Инкубируйте лизат при комнатной температуре в течение 10-15 мин, чтобы произошла полная диссоциация нуклеопротеидных комплексов.
3) Центрифугируйте лизат при 12 000-15 000 g в течение 10 минут для удаления нерастворенных фрагментов. Супернатант перелейте в новую пробирку.

На поверхности лизата богатых жиром образцов может образоваться жировая пленка. При отборе супернатанта следует избегать попадания верхнего жирового слоя в новую пробирку.
I *Лизаты могут храниться при комнатной температуре в течение нескольких часов, при -70°С в течение одного месяца.*
I *Замороженные лизаты следует размораживать при комнатной температуре. При необходимости, прогрейте образец при 37°С на водяной бане в течение 5-10 мин до полного растворения солей. Избегайте длительного прогрева лизатов, это может вызвать деградацию РНК.*
Разделение фаз

1) Добавьте 0.2 мл хлороформа на каждый 1 мл реагента ExtractRNA, добавленного на этапе гомогенизации (см. IV.1.Гомогенизация пробы).
2) Закройте пробирку, активно перемешайте содержимое пробирки с помощью встряхивания (вручную) в течение 15 секунд. Не используйте вортекс.
3) Инкубируйте смесь в течение 3-5 минут при комнатной температуре, периодически встряхивая образец.

IV Протокол выделения суммарной РНК
4) Центрифугируйте образец при 12000 g в течение 15 минут при
4°С.
I *В ходе центрифугирования произойдет разделение смеси на три фазы: нижнюю – органическую фенол-хлороформную фазу желтоватого оттенка, интерфазу белого цвета и верхнюю бесцветную водную фазу. РНК находится в водной фазе, составляющей 45-50% от общего объема смеси.*

5) Держа пробирку наклонно (под углом 45°), аккуратно отберите водную фазу, избегая касания интерфазы или органической фазы. Для получения образцов РНК хорошего качества важно избежать отбора интерфазы.

6) Переместите водную фазу в новую пробирку.

I *При выделении РНК из небольшого количества образца (менее 10^6 клеток или 10 мг ткани) в водную фазу рекомендуется добавить соосадитель нуклеиновых кислот.*

Выделение РНК

На этом этапе нужно соблюдать соответствующие меры предосторожности, чтобы избежать загрязнения препарата РНКазами.

1) Добавьте в водную фазу 0.5мл 100% изопропанола на каждый 1мл реагента, использованного для гомогенизации (см. IV.1. Гомогенизация пробы).

2) Инкубируйте смесь при комнатной температуре в течение 10 мин.

3) Центрифугируйте образец при 12 000 g в течение 10 мин при комнатной температуре.

I *Понижение температуры может привести к выпадению солей в осадок.*

4) Тщательно отберите супернатант, оставив осадок РНК на дне пробирки.

I *Осадок РНК может быть невидим.*

5) Аккуратно, по стенке пробирки, добавьте 2 мл 75% этанола на каждый 1 мл изопропанола, использованного в п.1.

IV Протокол выделения суммарной РНК

I *Образцы в этаноле могут храниться при -20°C и ниже в течение нескольких лет.*

6) Образец центрифугируйте на максимальной скорости в течение 5мин при комнатной температуре.

7) Удалите этанол.

I *Внимательно следите, чтобы в процессе отмывки осадок не был смыт со дна пробирки и утерян.*

8) Высушите осадок на воздухе в пробирке с открытой крышкой в течении 5-7 мин. Не оставляйте высохший образец на воздухе слишком долго: пересохший осадок РНК плохо растворяется в воде. Не используйте для сушки подогрев или вакуумное центрифугирование (Speed Vac).

9) Растворите РНК в необходимом объеме свободной от РНКаз воды. Перемешайте раствор пипетированием для лучшего расторения осадка. Встряхните раствор на вортексе, сбросьте капли центрифугированием.

I *Для улучшения растворения образец рекомендуется прогреть при 55-60°C в течение 3-5 минут.*

10) Заморозьте образец.

Выделенная РНК может сразу же быть использована для любых приложений. Все дальнейшие работы с препаратом следует вести на льду. Перед длительным хранением препарат РНК рекомендуется распределить на аликвоты и заморозить. Замороженная РНК хранится при температуре -20°C и ниже в течение 1 года. Избегайте избыточных циклов замораживания-размораживания образца.

При использовании пробы для любых ПЦР-анализов следует учитывать, что фракция РНК всегда содержит примесь геномной ДНК. В ряде случаев образец РНК следует дополнительно обработать ДНКазой, свободной от РНКазной активности.
Ожидаемый выход РНК.
Из 1 мг ткани млекопитающих можно получить от 1 до 10 мкг РНК.
Стандартная процедура выделения с применением ExtractRNA рассчитана на небольшое количество стартового материала (до 50 мл
IV Протокол выделения суммарной РНК
суспензии клеток или 5 мг ткани), однако, в случае необходимости, операции могут быть масштабированы для обработки большого количества исходного материала.
Рекомендации по выделению РНК

- Общие рекомендации

Гомогенизацию в растворе ExtractRNA следует проводить при комнатной температуре. Объем используемого реагента ExtractRNA должен превышать объем образца не менее, чем в 10 раз. Недостаточное количество реагента может привести к загрязнению образца РНК геномной ДНК.
Постарайтесь выполнить процедуру выделения РНК максимально быстро (не более 1 часа), от скорости выполнения будет зависеть качество РНК.

- Свежие и зафиксированные ткани

Пинцетом поместите образец в емкость для гомогенизации с предварительнодобавленнымреагентомExtractRNA.Необходимо использовать 1 мл ExtractRNA на каждые 50-100 мг ткани. Гомогенизируйте ткани в реагенте.
I *Мягкие ткани можно гомогенизировать пипетированием.*
Для разрушения тканей, содержащих нерастворимые частицы (например, минеральный скелет или хитин), требуется стеклянный гомогенизатор Даунса или полипропиленовый пестик для пробирок. Чтобы избежать деградации РНК, ткань, особенно свежую, следует гомогенизировать как можно быстрее и тщательнее.

- Замороженные ткани
  (a) Измельчите замороженную ткань в мелкий порошок пестиком в ступке под жидким азотом. Следует периодически добавлять жидкий азот во избежание оттаивания образца.
  (b) Быстро перенесите 50-100 мг измельченной ткани в пробирку, содержащую 1 мл реагента ExtractRNA.

I *Образец можно не перетирать, если ткань перед заморозкой была рассечена на небольшие фрагменты (толщиной не более*
0.3-0.5 см).
V Решение проблем

- Выращенные в монослое клетки

Клетки, выращенные в монослое, следует лизировать непосредственно в культуральной чашке.
(a) Отберите культуральную среду.
I *Не следует промывать клетки во избежание деградации РНК.*
(b) Сразу добавьте реагент ExtractRNA из расчета 1 мл на 10 см^2 поверхности чашки.

(c) Перемешайте суспензию пипетированием.

I *На чашку диаметром 35 мм требуется 1 мл реагента ExtractRNA, на чашку диаметром 60 мм – 3 мл реагента, на чашку диаметром 100 мм – 8 мл реагента.*

- Суспензия клеток (млекопитающих, растений, бактерий или дрожжей)

(a) Осадите клетки центрифугированием при 3000-5000 g в течение 2 минут.

(b) Отберите культуральную жидкость.

I *Не следует промывать клетки во избежание деградации РНК.*

(c) К осадку сразу добавьте реагент ExtractRNA из расчета 1 мл на 1x 10^6 – 10^7 клеток.

(d) Перемешайте суспензию пипетированием.

I *Для повышения эффективности лизиса суспензию бактерий и дрожжей в ExtractRNA можно инкубировать при 50-55°C в течение 10 мин. Для гомогенизации таких клеток можно использовать бисерную мельницу.*

Выделение ДНК

https://lytech.ru/upload/iblock/e61/%D0%98%D0%9D%D0%A1%D0%A2%D0%A0%D0%A3%D0%9A%D0%A6%D0%98%D0%AF%20%D0%94%D0%9D%D0%9A-%D0%AD%D0%9A%D0%A1%D0%9F%D0%A0%D0%95%D0%A1%D0%A1-%D0%9A%D0%A0%D0%9E%D0%92%D0%AC.pdf

ДНК-ЭКСПРЕСС-КРОВЬ

РЕАГЕНТ для выделения ДНК из лейкоцитов цельной крови с целью последующего анализа

МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ.

(*Инструкция по применению*) 2014 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС-КРОВЬ предназначен для выделения геномной ДНК из биологического материала – лейкоцитов цельной крови для последующего анализа выделенной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).
Реагент предназначен для применения только *in vitro*.
Реагент рассчитан на выделение ДНК из 100 анализируемых образцов.

2. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

2.1. Все компоненты реагента в используемых концентрациях являются нетоксичными.
2.2. Меры предосторожности - соблюдение "Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР" (Москва, 1981 г.), " Методических рекомендаций по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод ПЦР. Основные положения" (ГКСЭН РФ, 1995г);

3. СОСТАВ НАБОРА

Реагент для выделения ДНК «ДНК-ЭКСПРЕСС-КРОВЬ»
(на 100 образцов): *Хранить при температуре +2..+8°С*

1) Реактив "ДНК-ЭКСПРЕСС-КРОВЬ".....60 мл (1 флакон)

4. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

- Твердотельный термостат, поддерживающий температуру до +99 °С;
- Микроцентрифуга на 8-12000об/мин для пробирок объемом 1,5 мл;
- Микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок (типа "Вортекс");
- Морозильник на - 20°С;
- Микропипетки полуавтоматические с объемом дозирования 40-200 мкл;
- Стерильные наконечники 1-200 мкл;
-Пробирки и аксессуары для взятия крови;
-Перчатки резиновые или пластиковые одноразовые;

5. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК из образца

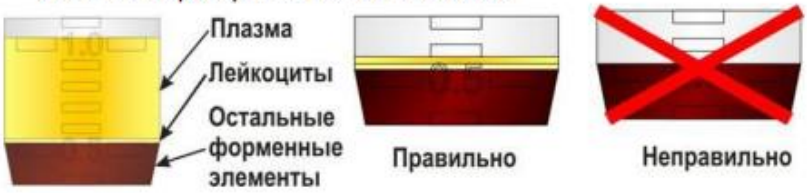
5.1. Подготовка, хранение и доставка клинического материала

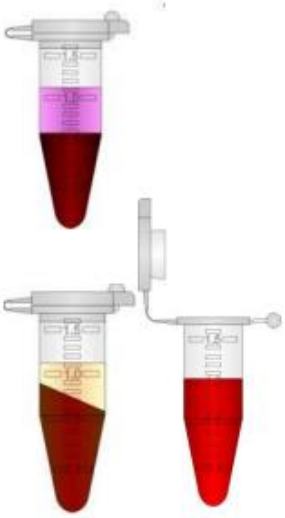
Венозную кровь в объеме не менее 1 мл собрать в одноразовую пластиковую пробирку с раствором антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия в соотношении 500 мкл крови на 50 мкл антикоагулянта). *Гепарин использовать не рекомендуется.* Материал доставляется в лабораторию течение 2-х часов, допускается хранение при +2...+8°С не более 4-5 часов.

5.3 Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь»

1. В пробирку типа «Эппендорф» с замком внести 1000 мкл цельной крови. Если кровь расслоилась в процессе хранения, то перед внесением ее необходимо перемешать до однородности.
2. Закрыть пробирку и центрифугировать со скоростью 3000 об/мин. при комнатной температуре в течение 5 мин. После центрифугирования кровь разделится на плазму и форменные элементы. На поверхности осадка форменных элементов расположен тонкий слой лейкоцитов (см. рисунок внизу).
3. Аккуратно удалить пипеткой плазму, не захватив при этом лейкоциты.

<u>ВНИМАНИЕ!</u> Полное удаление плазмы без захвата лейкоцитов практически невозможно. Поэтому следует оставить в пробирке тонкий слой плазмы.





4. Закрыть пробирку и выдержать ее при –20 °С (в морозилке) до полного замораживания форменных элементов (в течение 1 ч.).
5. Полностью разморозить содержимое пробирки при комнатной температуре.
6. Внести в пробирку реактив «ДНК-экспресс-кровь». Его объем должен быть равен объему оставшихся в пробирке форменных элементов и плазмы (в примере объем остатка равен »550 мкл, суммарный объем остатка и реактива составил, таким образом, 1100 мкл). Закрыть пробирку, защелкнуть замочек.
7. Содержимое пробирки в течение 10 сек. тщательно перемешать на встряхивателе (вортексе).
8. Установить пробирку в предварительно прогретый до 99 °С термостат и выдерживать в течение 25 минут.

Установить пробирку в высокоскоростную микроцентрифугу замком в сторону оси. Центрифугировать со скоростью 8000-14000 об/мин. при комнатной температуре в течение 15 сек.

Полученный таким образом супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ РЕАГЕНТА

6.1. Реагент "ДНК-ЭКСПРЕСС-КРОВЬ" должен храниться при температуре +2..+8°С в течение всего срока годности набора.
6.2. Допускается хранение и транспортировка реагента "ДНК-ЭКСПРЕСС-КРОВЬ" при температуре +20..+25°С в течение 2-3 суток.
6.4. Срок годности реагента - 6 мес.
6.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

По вопросам, касающимся качества реагента ДНК-ЭКСПРЕСС-КРОВЬ,
следует обращаться в НПФ "Литех" по адресу:
119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д.1, стр.3
телефон/факс: (495) 589-14-03; e-mail: info@lytech.ru

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и тест-системы

Рабочая культуральная среда. мононуклеарные клетки иммунной системы культивированы в полной питательной среде RPMI (Capricorn Scientific, Германия), с добавлением 10% инактивированной FBS (эмбриональная телячья сыворотка) (Capricorn Scientific, Германия), 0,01 М HEPES (Capricorn Scientific, Германия), 300 мкг/мл L-глютамина, 0.1 мг/мл гентамицина (Capricorn Scientific, Германия).

Клетки-мишени для анализа *in vitro* натуральной киллерной активности МНК доноров и больных в качестве клеток-мишеней (КМ) в цитотоксическом тесте, использованы суспензионные линии человеческого эритромиелоидного лейкоза К-562 на второй-третий день после пересева с 98% содержанием живых клеток.

Реактивы и среды для выделения и культивирования (МНК)

Среда RPMI-1640 с глутамином, стерильная (Capricorn Scientific, Германия) содержащая смесь неорганических солей, аминокислот, витаминов, глюкозу и фенолового красного, использована для культивирования МНК *in vitro* при исследовании спонтанной и стимулированной продукции медиаторов иммунной системы (цитокинов), NK-активности МНК.

Эмбриональная телячья сыворотка (FBS) (Capricorn Scientific, Германия) тестирована на отсутствие микоплазм и вирусов: PI-3, BVDAB, BVD-V, BVD-I.

Фитогемагглютинин (ФГА) (Capricorn Scientific, Германия) – стерильный лиофилизат, содержит белок фитогемагглютинин-П, полученный путём солевого фракционирования кислого экстракта бобов фасоли Phaseolusvulgaris. Растворен до рабочей концентрации (100 мкг/мл) в дистиллированной воде. Для стимулирования МНК использовали конечную концентрацию ФГА 5мкг/мл.

Среда для разделения лимфоцитов (плотность 1,077 г/см3) (Capricorn Scientific, Германия) – использована для отделения МНК от цельной крови.

Раствор гентамицина (сульфата гентамицина), 10 мг/мл (Capricorn Scientific, Германия) – антибиотик, эффективен против контаминации

грамположительными и грамотрицательными бактериями. Использовался в конечной концентрации 0,1 мг/мл.

HEPES натриевая соль, 1М стер. Раствор, pH 7,2 (Capricorn Scientific, Германия) – 4-(2-гидроксиэтил) -1-пиперазинэтансульфоновая кислота и ее Na^+ соль (C8H17N2O4S Na, M=260,29) – биологический буфер, использован в питательной среде для поддержания необходимых для культивировани МНК значений pH

L-глютамин (Capricorn Scientific, Германия) стерильный лиофиллизированный порошок, разведен дистиллированной водой и добавлен в питательную среду до конечной концентрации 300 мкг/мл.

MTT («ПанЭко», г. Москва), использовали для приготовления раствора MTT (5 мг/мл) на основе солевого раствора Хенкса.

DMSO («ПанЭко», г. Москва). Диметилсульфоксид (C2H6OS) добавляли в лунки по 150-200 мкл для растворения внутриклеточных кристаллов.

dNTP (Евроген, Россия) – Набор дезоксинуклеотидов (dNTP) состоит из четырех высокоочищенных 2’-дезоксинуклеозид-5’-трифосфатов (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Поставляется в сверхчистой воде в виде натриевой соли.Чистота не менее 97% (по данным ВЭЖХ). Не содержит нуклеаз и геномную ДНК человека. dNTP предназначены для использования в ПЦР, в реакциях обратной транскрипции и любых приложениях, требующих синтеза ДНК. Совместимы со всеми ДНК-полимеразами в различных областях применения.

Taq-полимераза (Евроген, Россия) – Рекомбинантный фермент Taq ДНК-полимераза для амплификации ДНК. Полимераза комплектуется стандартным 10X Taq буфером.

S
Y
B
R
G
r
e
E
n
L

Poly(A) полимераза E. coli (New England Biolabs, Великобритания) - Поли(A)полимераза катализирует независимое от матрицы присоединение АМФ из АТФ к 3'-концу РНК. Выделено из рекомбинантного источника. Применения включают 3'-маркирование РНК АТФ, радиоактивно меченного по фосфору-32 (Евроген, Россия) и инициирующий радиоактивно меченный АТФ (γ-32) для ДНК. Реакция оптимизирована для применения в ПЦР с использованием РНК, полученной в результате обратной транскрипции. Усиливает ПЦР с использованием РНК, полученной в результате обратной транскрипции (ПЦР-РВ). Красителя рекомендуется использовать в качестве 50X раствор, при оптимизации можно использовать как 25X до 100X.

Смеси праймеров (Евроген, Россия) — Набор содержит смесь случайных праймеров в концентрации 100% DMSO. Праймеры в каждой пробирке можно добавлять вплоть до конечного объема 5%.

Trizol (Евроген, Россия) — монофазный водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата, предназначенный для быстрого выделения суммарной РНК высокого качества из широкого круга объектов: животные и растительные ткани, культуры клеток млекопитающих, бактерий, дрожжей. Добавленный к образцу реагент моментально лизирует клетки, при этом целостность РНК сохраняется за счет высокоэффективного ингибирования активности РНКаз. Суммарная РНК, выделенная с помощью реагента

ExtractRNA, может быть использована для синтеза кДНК, ОТ-ПЦР, Нозерн блота, *in*

Уровни спонтанной и стимулированной *in vitro* продукции цитокинов определены ИФА-методом с помощью коммерческих тест – систем: IL-17, TNF-α, IL-10, IL-1β, IL-1Ra, IL-2, IL-6, IL-4 и IL-8 – ООО «Цитокин», Санкт-Петербург.

Культуральные работы

Подготовка сыворотки.

Для получения сыворотки отбор крови осуществлялся в пробирки Serum Clot Activator («VACCUETTE», Австрия) с активатором свертывания крови. После забора крови пробирки отцентрифугированы в режиме 3000 об/мин в течении 15 мин.

Выделение МНК. Мононуклеарные клетки периферической крови выделены из стабилизированной гепарином (25ед/мл) периферической крови на одноступенчатом градиенте фиколла («Histopaque», плотность 1.077, «ПанЭко», г. Москва), центрифугированием при 4ºС и 400g в течение 30 минут. Лимфоидные клетки, образовавшие интерфазное кольцо, собраны пипеткой и трехкратно отмыты средой RPMI-1640 («Gibco», США). После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды, клетки осаждены центрифугированием при 1000 об/мин и 4ºС. Ресуспендированные в 1 мл среды, МНК разведены рабочей культуральной средой (фосфатным солевым буфером) до концентрации 2-5·106 клеток/мл. Подсчет МНК произведен на автоматическом счетчике клеток Countess 3 FL (Thermo Scientific, США).

Постановка спонтанной и стимулированной продукции цитокинов. Выделенные МНК доводили полной культуральной средой до концентрации $2\text{-}5\cdot10^6$ кл/мл, затем 2 мл суспензии клеток переносили в 25ти луночные планшеты. Планшеты помещали в CO_2 – инкубатор («Sanyo», Япония) при 37°С, 5% CO_2 и относительной влажностью 80% на 18 часов.

Окрашивание клеток витальным красителем МТТ

Принцип МТТ–теста состоит в превращении растворимого желтого бромида 3-(4,5диметилтиазол-2-ил)-2,5-тертазолия (МТТ) в нерастворимые пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формазана (МТТ-ф) только в живых клетках, мертвые клетки такой способностью не обладают. Оптический сигнал (ОП), измеренный в диапазоне длин волн поглощения МТТ-формазана (540-570 нм), после его растворения, прямо пропорционален количеству жизнеспособных клеток.

МТТ-тест. Раствор МТТ приготовлен в концентрации 5 мг/мл на основе солевого раствора Хенкса (хранение при 4º С в течении месяца в защищенном от света месте). МТТ добавляется в объёме 20 мкл и инкубируется 4 часа при 37º С. Образовавшиеся внутриклеточные кристаллы растворены в DMSO (150-200 мкл/лунку). Оптический сигнал измерен при 540 нм.

Цитотоксический тест.

1. В 96-луночные плоскодонные планшеты внесли по 100 мкл суспензии МНК и клеток–мишеней (К-562) в соотношениях 20:1; 10:1; 5:1; 2,5:1; 1:1. В контрольных лунках были или только МНК или только КМ.

2. Планшеты помещали в CO_2 инкубатор на 18 часов

3. После 18 часов во все лунки планшета добавляли по 20 мкл рабочего раствора МТТ в концентрации 5 мг/мл. Инкубировали в CO_2 инкубаторе 4 часа

4. После четырехчасовой инкубации в CO_2-инкубаторе, удаляли супернатант и в каждую лунку добавляли по 150 мкл DMSO (диметилсульфоксид, «ПанЭко»).

5. Через 30 мин инкубации при комнатной температуре с DMSO, измеряли оптическую плотность (ОП) содержимого лунок на спектрофотометре CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия) при длине волны 540 нм.

Цитотоксичность рассчитана по формуле:

$$\textbf{ЦИ (\%)} = [1 - (ОП_{э+м} - ОП_{э})/ ОП_{м}]\cdot 100$$

Где:

ЦИ – цитотоксический индекс

$ОП_{э+м}$ – значение ОП в МНК+КЭФ;

$ОП_{э}$ - значение ОП в лунках с КЭФ;

$ОП_{м}$ - значение ОП в лунках с КМ.

ELISA – твердофазный иммуноферментный анализ.

Для определения уровня цитокинов использован твердофазный сэндвич-ИФА. Учет результатов произведен на 96-плашечном спектрофотометре CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия) при длине волны 450 нм. Образцы сыворотки протестированы в триплетах, в расчетах использованы средние значения оптической плотности.

Проточная цитометрия. Иммунофенотипирование субпопуляций NK-клеток проводили с использованием проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США) с моноклональными антителами к CD3, CD16, CD56 (Beckman Coulter, США). Субпопуляции NK-клеток разделяли по следующим кластерам дифференцировки $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$ - с гиперпродукцией цитокинов и $CD3^{-}CD56^{-}CD16^{+}$ - с высокой киллерной активностью. Культивирование клеток производили в 24 луночных планшетах 18 часов в CO2 инкубаторе (Sanyo, Япония). Для стимуляции использовали ФГА (5мг/мл), IL17A (50пг/мл), IL4 (10 пг/мл), IL10 (12,5 пг/мл), ConA (10мг/мл) и IL8 (10 пг/мл). Соотношение субпопуляций $CD56^{+}CD16^{-}/CD56^{-}CD16^{+}$ оценивали до культивации и после 18 часов в интактных и стимулированных МНК.

Экстракция РНК

Экстракцию тотальной РНК проводили фенольным методом с помощью ExtractRNA (Евроген, Россия). Количество РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, США). OD260/280 образцов РНК колебалось от 1,80 до 2,00.

Полиаденилирование РНК

Полиаденилирование тотальной РНК проводили при помощи poly(A) полимеразы E.coli (New England Biolabs, Великобритания) при 37°C 1 час в объеме 10 мкл. Состав смеси: 1 мкл тотальной РНК (100 нг/10 мкл), 1 мкл poly(A) буфера, 1 мкл АТФ, 0,2 мкл poly(A) полимеразы и 6,8 мкл H2O.

Дизайн праймеров для проведения реакции обратной транскрипции

1. 5’ конец праймера состоит из следующих нуклеотидов: CAGGTCCAG и 15 T.

2. Последние два нуклеотида праймера подбираются по принципу комплиментарности к последним двум на 3’ конце исходной последовательности микро-РНК, причем предпоследний может быть A, C или G, а последний A, C, G или T.

Таким образом, последовательность RT-праймера следующая: 5’-CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTVN, где V это A, C или G и N это A, C, G или T. В таблице 1 представлены подобранные праймеры для проведения реакции обратной транскрипции.

Таблица 1 – Праймеры для проведения реакции обратной транскрипции

Микро-РНК	RT-праймер
hsa-miR-942-5p	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCA
hsa-miR-146a-5p	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAA
hsa-miR-150-5p	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCA
hsa-miR-181a-5p	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAC

Обратная транскрипция

Тотальную РНК с poly(A) хвостом подвергали обратной транскрипции в кДНК, доводя общий объем смеси до 25 мкл, добавляя в каждый образец по 1 мкл RT-праймера, 1 мкл обратной транскриптазы, 10 мкл (2,5X) буфера, 3 мкл H2O. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием реагентов фирмы Евроген (Россия), при 45°C в течение 50 минут, после чего при 92°C в течение 8 минут.

Дизайн прямых и обратных праймеров для проведения ПЦР-РВ осуществлялся при помощи программы miRprimer.

В таблице 2 представлены подобранные праймеры для проведения ПЦР в реальном времени.

Таблица 2 – Праймеры для проведения реакции ПЦР-РВ

Микро-РНК	Прямой праймер	Обратный праймер
hsa-miR-942-5p	GTCTTCTCTGTTTTGGCCAT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCAC
hsa-miR-146a-5p	AGTGAGAACTGAATTCCATGG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAACC
hsa-miR-34a-5p	GCAGTGGCAGTGTCTTAG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTACAAC
hsa-miR-150-5p	CTCCCAACCCTTGTACCA	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCACT
hsa-miR-26a-5p	GCAGTTCAAGTAATCCAGGAT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAGC
hsa-miR-181a-5p	CATTCAACGCTGTCGGT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTACTCA
hsa-miR-130a-5p	GGCTCTTTTCACATTGTGC	AGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAGTAG

ПЦР-РВ

Реакция ПЦР-РВ была проведена на амплификаторе фирмы QuantStudio 5 Real-мкл. Состав смеси: 2,5 мкл dNTP, 2,5 мкл (10X) буфера, 2,5 мкл MgCl2, 1 мкл прямого праймера, 1 мкл обратного праймера, 0,25 мкл Taq-полимеразы, 12,25 мкл H2O, 3 мкл кДНК. Условия для проведения ПЦР: 95°C 300 с, 60°C 40 с, 95°C 15 с, 40 циклов. В качестве красителя был использован SYBR Green I (Евроген, Россия).

Референсный ген

В качестве референсного гена был использован ген hsa-miR-942-5p. Экспрессия hsa-miR-942-5p была обнаружена в как в лейкоцитах, так и в сыворотке крови, результаты стабильности экспрессии показали высокий консенсус между всеми программными приложениями: NormFinder предлагает miR-942 в качестве лучшего внутреннего контроля (Simon Hirschberger, 2019).

Контингент обследованных лиц

В исследование включено 190 жителей Республики Адыгея, (150 больных и 40 здоровых доноров). Больные ИБС – пациенты кардиологического отделения Адыгейской республиканской клинической больницы г. Майкоп. Диагнозы ИБС установлены с учетом характерных для данной категории лиц жалоб, анамнестических данных, биохимических и инструментальных методов обследования.

Основания исключения пациентов из исследования: острые воспалительные заболевания, обострение хронических воспалительных заболеваний, активные заболевания печени, почечная недостаточность, онкологические заболевания.

Факторы риска больных ИБС: артериальная гипертензия (АГ), сахарный диабет (СД) II типа. Общий холестерин (ОХС) повышен (5,93±0.4 ммоль/л) относительно целевого уровня (меньше 4 ммоль/л для пациентов с очень высоким сосудистым риском), остальные стандартные гематологические и биохимические показатели крови не превышали норму (табл. 3).

Таблица 3. Биохимические показатели больных

	Э	Л	Г	Х	ПТИ	Г	Б	ТГ	К
Больные	4,99±0.8	7,2±0.4	138,4±0.9	5,93±0.4	95,6±0.8	4,96±0.4	15,5±0.2	1,87±0.1	88,53±0.9
Норма*	3,9-5,5	3,9-8,5	120-170	3,6-5,2	95-105	3,5-5,5	3,4 – 17,1	1,7-2,26	74-110

Примечание: э – эритроциты ($n*10^{12}$ Кл/л), Л – лейкоциты ($n*10^{9}$ Кл/л), Г – гемоглобин (г/л), Х – холестерин (ммоль/л), ПТИ – протромбиновый индекс (%), Гл – глюкоза (ммоль/л), Б – билирубин (мкмоль/л), ТГ – триглицериды (ммоль/л), К – креатинин (мкмоль/л)

Группа контроля представлена неродственными здоровыми донорами (n=40) из двух этнических групп адыгов и русских, проживающих в Республике Адыгея, без наследственной отягощенности и клинических проявлений ССЗ, что подтверждено данными опроса (анкетирование), осмотра и обследования в условиях лечебно-профилактических учреждений Республики Адыгея.

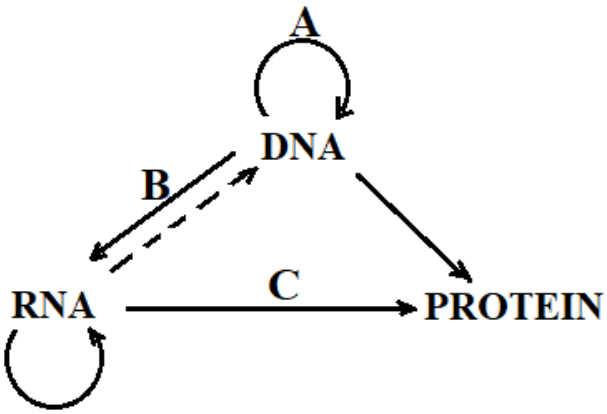
В соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000г. и «Правилами клинической практики в РФ», утвержденные Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003г. №266, все исследования проведены с информированного согласия больных и доноров или законных представителей.

Приложение № 4

ОЦЕНОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ
дополнительной общеобразовательной программы
«Иммуногенетика и биомедицина»

Задания отборочного этапа

Задание 1. (5 баллов). Сопоставьте (*соедините верные стрелками на бланке ответов*) названия трёх основных матричных процессов, происходящих в живых клетках, и их схематичные изображения на картинке.



1. Репликация	A
2. Трансляция	B
3. Транскрипция	C

Задание 2. (15 баллов). Давайте удостоверимся, что при планировании эксперимента в области генной инженерии нужно учитывать, что при встраивании фрагмента ДНК в неправильной ориентации результат может значительно отличаться от ожидаемого. Допустим, мы производим встраивание последовательности (назовем её вставка) **GGATCC**GATGCTACGTACGAT**GGATCC** в последовательность (назовем её мишень) ATGGTAC**GGATCC**GTGACTAA по сайту рестрикции **BamHI** (выделен).

В результате получится вот такая последовательность: ATG GTA **CGG ATC C**GA TGC TAC GTA CGA T**GG ATC C**GT GAC TAA. Если с нее считается мРНК, а с этой мРНК будет синтезирован белок, то получится вот такой полипептид - **MVRIRCYVRWIRD** (использованы стандартные однобуквенные сокращения названий аминокислот – смотри табл. ниже).

Вам предлагается посмотреть, что будет, если такую же последовательность вставить по тому же сайту рестрикции, но задом наперед. Для этого нужно:

1. Дописать цепь ДНК, комплементарную вставке, что указана выше

2. Записать её в направлении от 5' к 3'-концу (фактически, развернуть задом наперед то, что сделано в шаге 1)

3. Вставить эту последовательность в мишень по сайту рестрикции **BamHI** (по аналогии с приведенным примером)

4. Перевести получившуюся последовательность в белковую последовательность, воспользовавшись таблицей генетического кода

5. Записать в ответ получившийся пептид в виде строки из однобуквенных обозначений аминокислот без пробелов (тоже по аналогии с примером).

Подсказка: помните, что трансляция начинается со старт-кодона, а заканчивается на одном из стоп-кодонов: TAA, TAG, TGA

Аминокислота	**Сокращение**		
	русское	**английское**	**однобуквенный код**
Глицин	Гли	Gly	G
Аланин	Ала	Ala	A
Валин	Вал	Val	V
Лейцин	Лей	Leu	L
Изолейцин	Иле	Ile	I
Пролин	Про	Pro	P
Фенилаланин	Фен	Phe	F
Тирозин	Тир	Tyr	Y
Триптофан	Трп	Trp	W
Серин	Сер	Ser	S
Треонин	Тре	Thr	T
Аспарагиновая кислота	Асп	Asp	D
Глутаминовая кислота	Глу	Glu	E
Аспарагин	Асн	Asn	N
Глутамин	Глн	Gln	Q
Цистеин	Цис	Cys	C
Метионин	Мет	Met	M
Гистидин	Гис	His	H
Лизин	Лиз	Lys	K
Аргинин	Арг	Arg	R

TTT	F	TCT	S	TAT	Y	TGT	C
TTC	F	TCC	S	TAC	Y	TGC	C
TTA	L	TCA	S	TAA	*stop*	TGA	*stop*
TTG	L	TCG	S	TAG	*stop*	TGG	W
CTT	L	CCT	P	CAT	H	CGT	R
CTC	L	CCC	P	CAC	H	CGC	R
CTA	L	CCA	P	CAA	Q	CGA	R
CTG	L	CCG	P	CAG	Q	CGG	R
ATT	I	ACT	T	AAT	N	AGT	S
ATC	I	ACC	T	AAC	N	AGC	S
ATA	I	ACA	T	AAA	K	AGA	R
ATG	M/ *start*	ACG	T	AAG	K	AGG	R
GTT	V	GCT	A	GAT	D	GGT	G
GTC	V	GCC	A	GAC	D	GGC	G
GTA	V	GCA	A	GAA	E	GGA	G
GTG	V	GCG	A	GAG	E	GGG	G

Задание 3. (10 баллов). Фермент лизоцим состоит из 129 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 14300 дальтон. Кодирующий её участок ДНК содержит 40% Г-Ц пар и 60% А-Т пар. Средняя масса нуклеотида в ДНК равна 335 дальтон.

А. Что тяжелее: молекула лизоцима или кодирующая её последовательность ДНК и во сколько раз?

Б. Сколько водородных связей содержит кодирующая лизоцим последовательность ДНК?

Задание 4. (20 баллов) Одно из племён североамериканских индейцев живет в резервациях на юго-западе США. Численность этого племени около 300 000 человек. Из-за близкородственных браков у них чаще, чем в других популяциях, наблюдается наследственное заболевание – пигментный ретинит, вызванный дисфункцией палочек в сетчатке. У заболевшего с возрастом сужается поле зрения, глаза плохо адаптируются к темноте. Допустим, что признак доминантный и сцеплен с Х-хромосомой. Частота встречаемости заболевания среди мужчин-индейцев – 1 на 2000 человек.

А. Считая популяцию этой страны равновесной и панмиктической (свободно скрещиваются), оцените частоту встречаемости аллеля, определяющего пигментный ретинит.

Б. Оцените число женщин, страдающих от пигментного ретинита, среди всех индейцев резервации.

Подсказка: Задача решается легче, если знать уравнение Харди-Вайнберга

p2+2pq+q2=1, где p2 — доля гомозигот по одному из аллелей (АА); p — частота этого аллеля; q2 — доля гомозигот по альтернативному аллелю (аа); q – частота соответствующего аллеля; 2pq — доля гетерозигот (Аа).

Критерии оценки исследовательских проектов.

За основу взяты критерии оценки проектов Всероссийского научно-технологического конкурса проектов «Большие вызовы».

Исследовательский (научно-исследовательский) – проект, основной целью которого является проведение исследования, предполагающего получение в качестве результата научного или научно-прикладного продукта (статьи/публикации, отчета, аналитического обзора или записки, заявки на научный грант, методического пособия и т.п.).

Минимальный балл – 0. Максимальный балл – 13,5.

Критерий 1. Формулирование цели и задач.

0 баллов – цель работы не поставлена, задачи не сформулированы, проблема не обозначена.

1 балл – цель обозначена в общих чертах, задачи сформулированы не конкретно, проблема не обозначена.

2 балла – цель однозначна, задачи сформулированы не конкретно, актуальность проблемы не аргументирована.

3 балла – цель однозначна, задачи сформулированы конкретно, проблема обозначена, актуальна; актуальность проблемы аргументирована.

Критерий 2. Анализ области исследования.

0 баллов – Нет обзора литературы изучаемой области/ область исследования не представлена. Нет списка используемой литературы.

1 балл – Приведено описание области исследования, но нет ссылок на источники. Нет списка используемой литературы.

2 балла – Приведен краткий анализ области исследования с указанием на источники, ссылки оформлены в соответствии с требованиями. Приведен список используемой литературы. Цитируемые источники устарели, не отражают современное представление.

3 балла – Приведен развернутый анализ области исследования с указанием на источники, ссылки оформлены в соответствии с требованиями. Источники актуальны, отражают современное представление.

Критерий 3. Методы, используемы в работе.

0 баллов – Нет описания методов исследования. Нет выборки (если требуется).
1 балл – Дано перечисление методик без подробного описания, выборка отсутствует (если требуется).
2 балла – Методики описаны, но нет обоснования применения именного этого метода, выборка присутствует (если требуется)
3 балла – Методики описаны подробно, приведено обоснование применимости метода, указаны ссылки на публикации применения данной методики. Выборка (если требуется) соответствует критерию достаточности.

Критерий 4. Качество полученных результатов

0 баллов – Исследование не проведено, результаты не получены, не проведено сравнение с данными других исследований, выводы не обоснованы.
1 балл – Исследование проведено, получены результаты, но они не достоверны. Не проведено сравнение с данными других исследований. Выводы недостаточно обоснованы.
2 балла – Исследование проведено, получены достоверные результаты. Выводы обоснованы. Не показано значение полученного результата по отношению к результатам предшественников в области.
3 балла – Исследование проведено, получены результаты, они достоверны. Выводы обоснованы. Показано значение полученного результата по отношению к результатам предшественников в области.

Критерий 5. Самостоятельность, индивидуальный вклад в исследование

0,5 баллов – Есть понимание сути исследования, личный вклад не конкретен. Уровень осведомлённости в предметной области исследования не позволяет уверенно обсуждать положение дел по изучаемому вопросу.
1 балл – Есть понимание сути исследования, личный вклад и его значение в полученных результатах чётко обозначены. Уровень осведомлённости в предметной области исследования достаточен для обсуждения положения дел по изучаемому вопросу.
1,5 баллов – Есть понимание сути исследования, личный вклад и его значение в полученных результатах чётко обозначены. Свободно ориентируется в предметной области исследования. Определено дальнейшее направление развития исследования.

Карточка оценки проектных работ

№ п/п	ФИО обучающегося	1 критерий	2 критерий	3 критерий	4 критерий	5 критерий	Общий балл
1.							
2.							
3.							
4.							

5.							
6.							
7.							
8.							
9.							
10.							

Опрос удовлетворенности детей участием в программе

Добрый день, участник программы регионального центра выявления и поддержки одаренных детей «Полярис-Адыгея»!

Мы, педагоги Центра, заинтересованы, чтобы занятия в кружке были максимально интересными, полезными и комфортными.

Будем благодарны, если ты поделишься своим мнением о работе кружка, который ты посещаешь.

Смело делись своими впечатлениями, эта анкета совершенно анонимная.

1. Как ты можешь охарактеризовать свое отношение к кружку? Выбери один вариант или напиши свой
    - отлично
    - хорошо
    - безразлично
    - отрицательно
    - свой вариант

2. С какой целью ты посещаешь свой кружок? Можешь выбрать несколько вариантов или написать свой
    - для общения с друзьями
    - для общения с преподавателем
    - по просьбе родителей
    - для подготовки к будущей профессии
    - для получения новых знаний, умений и опыта
    - чтобы занять себя в свободное время
    - свой вариант

3. Что нравится тебе на занятиях кружка? Можешь выбрать несколько вариантов и написать свой
    - отношения между учащимися
    - отношения с педагогом
    - организация занятий
    - качество преподавания
    - новые знания и умения

- свой вариант

4. Что НЕ нравится тебе на занятиях кружка? Можешь выбрать несколько вариантов или/и напиши свой.
   - отношения между учащимися
   - отношения с педагогом
   - организация занятий
   - качество преподавания
   - новые знания и умения
   - затрудняюсь ответить
   - свой вариант

5. Как ты обычно себя ощущаешь после занятий? Выбери один вариант или напиши свой.
   - отлично
   - хорошо
   - нейтрально
   - плохо
   - свой вариант

6. Оцени работу кружка по шкале от 1 до 10, где 1 – очень плохо, 10 – отлично.

7. Твои пожелания по улучшению содержания/работы кружка:_____

Тестовые задания (примерные)

Начальный контроль

Задания с одним вариантом ответа:

1. Кем в первые было описано явление фагоцитоза.
   а. Д.И. Менделеевым
   б. Н.И. Вавиловым
   в. И.И. Мечниковым
   г. И.П. Павловым

2. При всех способах размножения (половом и бесполом) элементарными дискретными единицами наследственности являются:
   а. Одна цепь молекулы ДНК
   б. Одна пара нуклеотидов
   в. Один ген
   г. Один нуклеотид

3. В ходе медико-генетического консультирования семьи установлено, что один из родителей гомозиготен по доминантному гену полидактилии, а второй — здоров (гомозиготен по рецессивному гену). В этом случае у детей проявится закон:
   а. Единообразия гибридов первого поколения
   б. Независимого наследования
   в. Расщепления гибридов
   г. Чистоты гамет

4. Комплементарные пары нуклеотидов двойной цепочки ДНК удерживаются связями:
а. ковалентными;
б. фосфодиэфирными;
в. пептидными;
г. водородными.

5. ДНК содержится в:
а. рибосомах и ядре;
б. ядре, гиалоплазме и митохондриях;
в. гиалоплазме и хлоропластах;
г. ядре, митохондриях и хлоропластах.

Задания, требующие развернутого ответа:
Точечная мутация одного гена обусловливает развитие болезни Хартнепа. Симптомами болезни являются нарушение всасывания аминокислоты триптофана в кишечнике и реабсорбции ее в почечных канальцах, что приводит к одновременным расстройствам пищеварительной и мочевыделительной систем. Определите, какое генетическое явление обусловливает развитие симптомов болезни Хартнепа?

Промежуточный контроль

Задания с одним вариантом ответа:
1. Гомологические ряды в наследственной изменчивости открыл:
а. И. Мечников
б. Р. Нильсон
в. Ф. Крик
г. Н. Вавилов

2. Нарушения, причиной которых являются мутации отдельных генов - это:
а. Мультифакторные заболевания
б. Моногенные заболевания
в. Полигенные заболевания
г. Социально-значимые заболевания

3.Синдромы, сопровождающиеся аномальным количеством или нарушением структуры хромосом называются:
а. Моногенными
б. Хромосомными
в. Геномными
г. Генными

4.Особенностями клинических проявлений наследственной патологии являются:
а. Врожденный характер заболевания, семейный характер заболевания, клинический полиморфизм
б. Полное выздоровление, хроническое течение заболевания.
в. Симптомы артериальной гипертензии
г. Первичные и вторичные иммунодифициты

5. Геномные синдромы характеризуются
а. Изменением числа хромосом

б. Изменением числа генных участков
в. Транслокациями и трансдукциями
г. Единичным полиморфизмом гена

Задания, требующие развернутого ответа:
Какой тип деления клеток происходит в злокачественной опухоли без образования митотического аппарата деления, путем образования перетяжки ядра и при котором сохраняется ядерная оболочка и ядрышко? Как такой тип деления может повлиять на прогрессирование опухоли?

Итоговый контроль

Задания с одним вариантом ответа:

1. Taq-полимераза была впервые была применена для ПЦР метода:
   а. Р. Гилфордом
   б. А. Колединым
   в. Н. Новиковым
   г. Н. Степановым

2. Нетранслируемые участки генов эукариот называются
   а) домены
   в) гены
   б) интроны
   г) экзоны

3. Выпадение участка гена или хромосомы называется
   а) делеция
   б) дупликация
   в) транслокация
   г) инверсия

4.Пары близнецов, в которых наследуемый признак проявляется только у одного из пары, называются
   а) дискомфортными
   б) дискордантвыми
   в) конкурсными
   г) конкордантными

5.Субметацентрические хромосомы средних размеров составляют группу
   а) C (6-12) б) A (1,23) в) G (21,22) г) F (19,20)

Задания, требующие развернутого ответа:
В ходе эксперимента было продемонстрировано повышение активности β-галактозидазы после внесения лактозы в культуральную среду с E. coli. Какой участок лактозного оперона разблокируется от репрессора при этих условиях? Объясните свой ответ.