

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
и образовательным инновациям



О.Н.Здрок

2020 г.

Регистрационный № УД-8431/уч.

Флуоресцентный и люминесцентный биоимиджинг

**Учебная программа учреждения высшего образования
по учебной дисциплине для специальности:**

1-31 80 01 Биология

профилизация Функциональная биология

2020 г.

Учебная программа составлена на основе ОСВО 1-31 80 01-2019 и учебного плана УВО № G 31-030/уч., утвержденного 11.04.2019 г.

СОСТАВИТЕЛИ:

В.В. Демидчик, декан биологического факультета Белорусского государственного университета, доктор биологических наук

В.С. Мацкевич, старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений

М.А. Войтехович, старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений

С.Н. Звонарев, старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Н.Л. Пшибытко, заведующая учебной лабораторией организации и нормативно-методического сопровождения научно-инновационной деятельности в области биологии биологического факультета

Л.Ф. Кабашникова, заведующая лабораторией прикладной биофизики и биохимии Института биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси

РЕКОМЕНДОВАНА К УТВЕРЖДЕНИЮ:

Кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений
(протокол № 21 от 02 июня 2020);

Научно-методическим Советом БГУ
(протокол № 5 от 17 июня 2020 г.)

Зав. кафедрой клеточной биологии
и биоинженерии растений, к.б.н., доцент



И.И. Смолич

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Цели и задачи учебной дисциплины

Цель учебной дисциплины – сформировать у студентов целостную систему знаний о биоимиджинге, современных подходах для визуализации живых систем *in vitro* и *in vivo*, основанных на явлениях флуоресценции и биолюминесценции.

Задачи учебной дисциплины:

- 1) ознакомление с фундаментальными понятиями биоимиджинга и общими принципами, лежащими в основе визуализации биологических систем и процессов;
- 2) формирование представления о современных методах получения и анализа изображений в биологических экспериментах;
- 3) изучение теоретических основ флуоресцентного биоимиджинга, детальное рассмотрение особенностей применения флуоресцентных зондов в биологии;
- 4) овладение знаниями и практическими навыками использования биолюминесцентных зондов в биологии: люциферина, экворина и др. систем.

Место учебной дисциплины в системе подготовки магистра

Учебная дисциплина относится к компоненту учреждения высшего образования учебного плана и входит в учебный модуль «Феномный анализ и биоимиджинг».

Связи с другими учебными дисциплинами, включая учебные дисциплины компонента учреждения высшего образования, дисциплины специализации и др.

Изучение учебной дисциплины «Флуоресцентный и люминесцентный биоимиджинг» базируется на знаниях, полученных студентами по учебным дисциплинам «Клеточная биология» и др. Учебная программа составлена с учетом межпредметных связей с учебными дисциплинами «Клеточная биология», «Феномика».

Требования к компетенциям

Освоение учебной дисциплины «Флуоресцентный и люминесцентный биоимиджинг» совместно с учебной дисциплиной «Феномика» должно обеспечить формирование следующей **специализированной** компетенции: СК-8. Быть способным использовать современные методы фенотипирования, флуоресцентной микроскопии и хемилюминесценции для решения фундаментальных и прикладных проблем биологии и биоинженерии.

В результате освоения учебной дисциплины студент должен:

– **знать:**

- общие принципы, лежащие в основе визуализации биологических систем и процессов;
- теоретические основы флуоресцентного биоимиджинга и особенности применения флуоресцентных зондов в биологии;
- важнейшие примеры использования биолюминесцентных зондов в биологии: люциферин, экворин и др. системы.
- **уметь:**
 - применять на практике знания об основных экспериментальных подходах биоимиджинга;
 - использовать знания о физико-химических основах флуоресценции и биолюминесценции при подборе зондов для биологических исследований;
 - анализировать полученные изображения и грамотно представлять результаты.
- **владеть:**
 - практическими навыками использования флуоресцентных зондов на активные формы кислорода (DHE, DCF);
 - методикой Ca^{2+} -эквириновой люминометрии;
 - техникой ДНК-комет для определения повреждений ДНК в клетках эукариот.

Структура учебной дисциплины

Дисциплина изучается в 3 семестре. Всего на изучение учебной дисциплины «Флуоресцентный и люминесцентный биоимиджинг» отведено:

– для очной формы получения высшего образования – 90 часов, в том числе 36 аудиторных часов, из них: лекции – 10 часов, практические занятия – 8 часов, управляемая самостоятельная работа – 18 часов (в том числе контроль управляемой самостоятельной работы (ДО) – 8 часов, внеаудиторный контроль – 10 часов).

Трудоемкость учебной дисциплины составляет 3 зачетные единицы.

Форма текущей аттестации – зачет.

СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА

Раздел 1. Введение

Тема 1.1 Введение в биоимиджинг. Понятие «биоимиджинга», общие принципы и задачи. История вопроса получения и анализа изображений в биологии. Высокоинформативный биоимиджинг в исследованиях клеточных процессов и внутриклеточных взаимодействий. Современные подходы для визуализации живых систем *in vitro* и *in vivo*. Общие принципы визуализации субклеточных и надклеточных структур. Характеризация функциональных особенностей биологических систем и анализ динамики их изменений при помощи подходов биоимиджинга. Общие определения и понятия фенотипирования и феномного анализа.

Раздел 2. Флуоресцентный биоимиджинг

Тема 2.1 Флуоресцентные зонды и их использование в биологии. Физико-химические основы флуоресценции. Флуоресцентные белки, синтетические флуорофоры, техника биоконъюгации. Флуоресцентные зонды, используемые для биовизуализации. Зеленые флуоресцентные белки (GFP) и другие виды генетически-кодируемых внутриклеточных зондов (YFP, RFP).

Современные флуоресцентные микроскопы, их устройство, особенности работы и обслуживания. Эпифлуоресцентные микроскопические системы. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия и ее применение в биологических исследованиях. Анализ получаемых изображений, программные обеспечения, представление результатов.

Использование флуоресцентных зондов для генетического и биохимического анализа. Ридеры, цитометры, секвенаторы, ПЦР-РВ. Пассивные референсные и репортерные красители, используемые для проведения количественной ПЦР в реальном времени.

Тема 2.2 Методы анализа на основе флуоресцентной микроскопии.

Методы определения свободных радикалов, зонды на активные формы кислорода (DHE, DCF). Определение уровня кальция в живых клетках (Fura-2, Indo-1, Cameleon). Анализ генных экспрессий при помощи флуоресцентной микроскопии. Метод ДНК-комет: принцип метода, применение в биологии и медицине, особенности детекции различных повреждений ДНК, протоколы для обнаружения одно- и двухцепочечных разрывов.

Раздел 3. Биolumинометрия

Тема 3.1 Люминометрия в биологии. Понятие о люминесценции, ее разновидности: фото-, хеми-, кристалло- электро-, механо-, радио-, термолюминесценция. Биохемилюминесценция как одна из форм

люминесценции. История изучения явления биолюминесценции, ключевые научные открытия. Устройство и принцип работы люминометров.

Тема 3.2 Важнейшие примеры использования биолюминесцентных зондов в биологии: люциферин, экворин и др. системы. Люциферины: строение и типы. Работа люциферин-люциферазной системы и ее использование в биологии. Применение хемиллюминетрических зондов для обнаружения АФК в живых системах (супероксидного-анионного радикала, перекиси водорода, гидроксильного радикала). Применение люминола и люцигенина для тестирования генерации АФК. Методика Ca^{2+} -эквириновой люминетрии. История открытия белка эквирин и его структура. Ca^{2+} -зависимая генерация люминесценции эквиринотом.

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ КАРТА УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЫ

Дневная форма получения образования с применением дистанционных образовательных технологий

Номер раздела, темы	Название раздела, темы	Количество аудиторных часов					Количество часов УСР	Форма контроля знаний
		Лекции	Практические занятия	Семинарские занятия	Лабораторные занятия	Иное		
1	Введение							
1.1	Введение в биоимиджинг	2						Тестовый эвристический опрос на лекции
2	Флуоресцентный биоимиджинг							
2.1	Флуоресцентные зонды и их использование в биологии	2	2				2 2 (ДО)	Тестовый эвристический опрос на лекции, презентация результатов анализа научных статей на кейс-семинаре, тестирование (эвристические тесты) на образовательном портале LMS Moodle
2.2	Методы анализа на основе флуоресцентной микроскопии	2	4				4 2 (ДО)	Защита отчета о выполнении практической работы, тестирование (эвристические тесты) на образовательном портале LMS Moodle
3	Биолюминометрия							
3.1	Люминометрия в биологии	2						Тестовый эвристический опрос на лекции
3.2	Важнейшие примеры использования биолюминесцентных зондов в биологии: люциферин, экворин и др. системы	2	2				4 4 (ДО)	Защита отчета о выполнении практической работы, тестирование (эвристические тесты) на образовательном портале LMS Moodle
	Итого:	10	8				10+8 (ДО)	

ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Перечень основной литературы

1. Fluorescence microscopy: from principles to biological applications, 2 Edition. / Ed. U. Kubitscheck. – Wiley-VCH, 2013 – 495 p.
2. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и хемилюминисценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина // Успехи биологической химии, факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 2009. – Т. 49, С. 341–388.
3. Молекулярная биология клетки / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. – Москва: Бином, 2017. – 256 с.
4. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений, 2-е изд. / под ред. Вл. В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – 498 с.
5. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Альбертс и др. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.

Перечень дополнительной литературы

1. A computational image analysis glossary for biologists / H.K. Adrienne [et al.] // Development. – 2012. – V.139. – P. 3071–3080.
2. Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay) / S. Nandhakumar [et al.] // J Pharmacol Pharmacother. – 2011. – V. 2. – P. 107–111.
3. Fluorescence and luminescence techniques to probe ion activities in living plant cells / M.D. Fricker [et al.] // Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. – Elsevier, 1999. – P. 569–596.
4. Halliwell, B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. – Oxford, UK Oxford University Press, 2015. – 905 p.
5. Markova, S.V. Coelenterazine-dependent luciferases / S.V. Markova, E. S. Vysotski // Biochemistry. – 2015. – Vol. 80, № 6. – P. 714–732.
6. Molecular Cell Biology 8th edition / H. Lodish, et al. – New York: W.H. Freeman and Company, 2016. – 1150 p.
7. Novel roles of ascorbate in plants: induction of cytosolic Ca^{2+} signals and efflux from cells via anion channels / M. Makavitskaya [et al.] // J. Exp. Bot. – 2018. – Vol. 69, № 14 – P. 3477–3489.
8. Salt stress triggers generation of oxygen free radicals and DNA breaks in *Physcomitrella patens* protonema / S. Zvanarou [et al.] // Environmental and Experimental. – 2020. – P. 104236.
9. Vysotski, E.S. Bioluminescence: basic and applied research.: introduction to the special issue on bioluminescence / E.S. Vysotski // Photochemistry and Photobiology. – 2017. – Vol. 93, № 2. – P. 387–388.
10. Лазерная конфокальная микроскопия: метод. указания / П.Е. Тимченко и др. – Самара: Изд-во Самар. гос. аэрокосм. ун-та, 2014. – 76 с.

Перечень рекомендуемых средств диагностики и методика формирования итоговой оценки

Формой текущей аттестации по дисциплине «Флуоресцентный и люминесцентный биоимиджинг» учебным планом предусмотрен зачет.

Для оценки профессиональных компетенций студентов используется следующий диагностический инструментарий:

- тестовый эвристический опрос на лекциях, контроль посещения аудиторных занятий и выполнения аудиторного графика;
- защита подготовленного студентом анализа научных статей с предоставлением аннотации в системе LMS Moodle;
- защита отчета о выполнении практической работы;
- выполнение эвристических тестов в системе LMS Moodle.

Оценка за ответы на лекциях (опрос) и практических занятиях может включать в себя полноту ответа, наличие аргументов, примеров из практики и т.д.

При оценивании доклада обращается внимание на: содержание и полноту раскрытия темы, структуру и последовательность изложения, источники и их интерпретацию, корректность оформления и т.д.

При формировании итоговой оценки используется рейтинговая оценка знаний студента, дающая возможность проследить и оценить динамику процесса достижения целей обучения.

Формирование оценки за текущую успеваемость:

- тест-опросы на лекциях – 25 %;
- защита отчетов о выполнении практической работы – 25%;
- выполнение эвристических тестов на образовательном портале LMS Moodle – 50 %;

Рейтинговая оценка по дисциплине рассчитывается на основе оценки текущей успеваемости и экзаменационной оценки с учетом их весовых коэффициентов Вес оценка по текущей успеваемости составляет 40 %, экзаменационная оценка – 60 %.

Примерный перечень заданий для управляемой самостоятельной работы студентов

Управляемая самостоятельная работа (консультационно-методическая поддержка и контроль) осуществляется преимущественно в дистанционной форме и обеспечивается средствами образовательного портала БГУ LMS Moodle. Объем часов на составление и размещение заданий, консультации и контроль, осуществляемые с использованием технологий дистанционного обучения, планируется в пределах учебных часов, отведенных на УСР.

Тема 2.1 Флуоресцентные зонды и их использование в биологии (2 ч/ДО; внеаудиторный контроль – 2 ч)

Физико-химические основы флуоресценции. Флуоресцентные белки, синтетические флуорофоров, техника биоконъюгации. Флуоресцентные зонды,

используемые для биовизуализации. Зеленые флуоресцентные белки (GFP) и другие виды генетически-кодируемых внутриклеточных зондов (YFP, RFP). Современные флуоресцентные микроскопы, их устройство, особенности работы и обслуживания. Эпифлуоресцентные микроскопические системы. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия и ее применение в биологических исследованиях. Анализ получаемых изображений, программные обеспечения, представление результатов. Использование флуоресцентных зондов для генетического и биохимического анализа. Ридеры, цитометры, секвенаторы, ПЦР-РВ. Пассивные референсные и репортерные красители, используемые для проведения количественной ПЦР в реальном времени.

Форма контроля – тестирование (эвристические тесты) на образовательном портале LMS Moodle.

Тема 2.2 Методы анализа на основе флуоресцентной микроскопии (2 ч/ДО; внеаудиторный контроль – 4 ч)

Методы определения свободных радикалов, зонды на активные формы кислорода (DHE, DCF). Определение уровня кальция в живых клетках (Fura-2, Indo-1, Cameleon). Анализ генных экспрессий при помощи флуоресцентной микроскопии. Метод ДНК-комет: принцип метода, применение в биологии и медицине, особенности детекции различных повреждений ДНК, протоколы для обнаружения одно- и двухцепочечных разрывов.

Форма контроля – тестирование (эвристические тесты) на образовательном портале LMS Moodle.

Тема 3.2 Важнейшие примеры использования биолуминесцентных зондов в биологии: люциферин, экворин и др. системы (4 ч/ДО; внеаудиторный контроль – 4 ч)

Люциферины: строение и типы. Работа люциферин-люциферазной системы и ее использование в биологии. Применение хемилюминометрических зондов для обнаружения АФК в живых системах (супероксидного-анионного радикала, перекиси водорода, гидроксильного радикала). Применение люминола и люцигенина для тестирования генерации АФК. Методика Ca^{2+} -эквириновой люминометрии. История открытия белка эквориона и его структура. Ca^{2+} -зависимая генерация люминесценции экворином.

Форма контроля – тестирование (эвристические тесты) на образовательном портале LMS Moodle.

Примерная тематика практических занятий

Практическое занятие № 1. Проблемно-ориентированный эвристический кейс-семинар по системе пруф/диспруф (prove/disprove) на тему использования флуоресцентной микроскопии и КЛСМ в биологических

исследованиях; подбор флуоресцентных зондов (преимущества и недостатки PI, FDA, Evans Blue и SYTOX).

Практическое занятие № 2. Анализ образования одно- и двуцепочечных разрывов ДНК в клетках модельных растительных объектов в ответ на действие стрессоров.

Практическое занятие № 3. Протестировать влияние различных стресс-факторов на уровень Ca^{2+} в цитоплазме с использованием растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., экспрессирующих экворин.

Описание инновационных подходов и методов к преподаванию учебной дисциплины («кейс-стадис», эвристический, проективный, практико-ориентированный)

Дистанционные методы обучения. В курсе используется система LMS Moodle для организации самостоятельной работы студентов и выполнения УСР. Кроме того, в данной системе размещены инструкции для проведения анализа научных статей и подготовки рецензий при выполнении открытых эвристических заданий когнитивного типа.

Эвристический подход и методы высокоэффективного обучения. При организации образовательного процесса используется эвристический подход, который предполагает индивидуализацию обучения через возможность самостоятельно ставить цели, осуществлять рефлекссию собственной образовательной деятельности, а также творческую самореализацию обучающихся в процессе создания образовательных продуктов. Методологическим принципом и инструментом эвристического обучения является диалог. Диалоговый компонент присутствует в лекциях – в начале каждой лекции задаются вопросы в тестовом режиме, что позволяет поставить научную проблему, решению которой будет посвящена лекция. Результаты текущего теста проверяются и отражаются в начале лекции.

«Кейс-стадис». Проблемно-ориентированные эвристические кейс-семинары направлены на активное вовлечение обучающихся в решение и обсуждение практических проблем биоимиджинга – использования флуоресцентной микроскопии и КЛСМ; подбор флуоресцентных зондов. Студенты разбиваются на 2 группы: первая группы должна собрать научно-обоснованные материалы и доказать правомерность, перспективность и безопасность использования этих технологий, вторая группа, соответственно, представить научные доказательства невозможности их внедрения и использования (т.е. группы – научные оппоненты).

Методические рекомендации по организации самостоятельной работы обучающихся

При изучении учебной дисциплины рекомендуется использовать следующие формы самостоятельной работы: – поиск (подбор) и обзор

литературы и электронных источников по индивидуально заданной проблеме курса; – работы, предусматривающие решение задач и выполнение упражнений, выдаваемых на практических занятиях; – изучение материала, вынесенного на самостоятельную проработку; – подготовка к практическим занятиям; – подготовка к зачету; – подготовка и написание докладов, эссе и презентаций на заданные темы; – подготовка к участию в конференциях и конкурсах.

Примерный перечень вопросов к зачету

1. Современные подходы для визуализации биологических объектов *in vivo*.
2. Физические и химические основы флуоресценции.
3. Флуоресцентные белки: GFP, YFP и RFP.
4. Дизайн синтетических флуорофоров, техника биоконъюгации.
5. Сравнительная характеристика флуоресцентной микроскопии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.
6. Пассивный референсные и репортерные красители, используемые для проведения количественной ПЦР в реальном времени.
7. Повреждения ДНК в клетках и их детекция.
8. Особенности использования метода ДНК-комет на растительных объектах.
9. Основные параметры ДНК-комет, их значение и расчет.
10. Использование метода ДНК-комет в медицине.
11. Понятие о люминесценции и ее разновидностях.
12. Работа люциферин-люциферазной системы на примере светлячков.
13. Хемилюминометрические зонды для обнаружения супероксидного-анионного радикала в живых системах.
14. Хемилюминометрические зонды для обнаружения перекиси водорода в живых системах.
15. Хемилюминометрические зонды для обнаружения гидроксильного радикала.
16. Применение люминола для тестирования генерации АФК.
17. Применение люцигенина для тестирования генерации АФК.
18. История открытия белка экворина и его структура.
19. Ca^{2+} -зависимая генерация люминесценции экворином.
20. Устройство и принцип работы люминометров.

ПРОТОКОЛ СОГЛАСОВАНИЯ УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЫ УВО

Название учебной дисциплины, с которой требуется согласование	Название кафедры	Предложения об изменениях в содержании учебной программы учреждения высшего образования по учебной дисциплине	Решение, принятое кафедрой, разработавшей учебную программу (с указанием даты и номера протокола)
Феномика	Клеточной биологии и биоинженерии растений	Отсутствуют	Утвердить согласование (протокол № 21 от 02 июня 2020 г.)

**ДОПОЛНЕНИЯ И ИЗМЕНЕНИЯ К УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЕ ПО
ИЗУЧАЕМОЙ УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ**

на ____ / ____ учебный год

№ п/п	Дополнения и изменения	Основание

Учебная программа пересмотрена и одобрена на заседании кафедры
_____ (протокол № ____ от _____ 20__ г.)

Заведующий кафедрой

УТВЕРЖДАЮ
Декан факультета
