

**АВТОНОМНАЯ НЕКОММЕРЧЕСКАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ «СИРИУС»
(АНОО ВО «УНИВЕРСИТЕТ «СИРИУС»)**

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ (МОДУЛЯ)

«Практикум по клеточным технологиям»

Уровень образования: высшее образование – программа специалитета
Специальность: 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика
Направленность (профиль): Биоинженерия

1. Трудоемкость дисциплины (модуля): 5 з.е.

2. Место дисциплины в учебном плане: дисциплина «Практикум по клеточным технологиям» входит в Блок 1. «Дисциплины (модули)», обязательную часть, раздел «Профессиональная подготовка» и изучается в 13-16 модулях (7-8 семестры).

3. Цель дисциплины (модуля): формирование современных представлений об основных направлениях и возможностях культивирования клеток эукариот вне организма, практических навыков работы *in vitro*, включая современные методы 2D- и 3D-культивирования, а также их применение в биомедицинских исследованиях.

4. Задачи дисциплины (модуля):

– Освоение базовых и продвинутых методов культивирования. Работа с клетками иммортализованных и первичных культур. Техники поддержания, пассирования и криоконсервации клеток. Отработка навыков работы в условиях биобезопасности (стерильность, биоэтика).

– Изучение методов оценки пролиферации, апоптоза и миграции клеток, анализа ключевых сигнальных путей, методов микроскопии, проточной цитометрии и молекулярного анализа.

5. Перечень разделов (тем) дисциплины и их краткое содержание:

Наименование раздела (темы) дисциплины (модуля)	Краткое содержание
Основы работы с клеточными культурами. Субкультивирование. Микроскопия. Методы окрашивания культур клеток. Тесте на застание царапины (scratch-wound assay). Иммуноцитохимия. Проточная цитометрия. Анализ субпопуляций	Ознакомление с устройством и работой ламинарного шкафа: порядок запуска и выключения, правила работы (стерильность, безопасность), приготовление и уборка рабочего места. Разморозка адгезивной и суспензионной культуры клеток. Оценка жизнеспособности культуры клеток (окрашивание трипановым синим). Подсчет количества клеток. Посев адгезивной или суспензионной культуры клеток. Оценка морфологии клеток и ее соответствие паспорту. Пересев адгезивной и суспензионной культуры клеток. Трипсинизация. Определение жизнеспособности и количества клеток. Субкультивирование. Построение кривой роста клеток по результатам оценки количества клеток в разные дни и открытым базам данных. Замораживание культуры клеток. Формирование биобанка. Прижизненная и препаратная окраска клеток для анализа морфологии клеток. Морфологические признаки основных видов гибели клеток. Анализ миграционной активности клеток. ЛБ 8-9. Иммунофлюоресцентное окрашивание образцов для микроскопии (фиксация клеток, окрашивание клеток с использованием антител). Пробоподготовка образцов к анализу. Принципы метода и устройства для проточной цитометрии. Анализ субпопуляций.

<p>Цитотоксичность. Скрининг противоопухолевых агентов. Индукция и детекция апоптоза в культуре клеток. Вестерн - блот анализ. Культивирование клеток в 3D. Гетеротипическая сфероидная модель. Методы сбора, обработки и анализа данных культивирования 2D и 3D клеточных моделей Биоинформатическое моделирование для разработки новых терапевтических подходов. Методы анализа транскриптомных и протеомных данных.</p>	<p>Клоногенный тест. Оценка цитотоксичности методом МТТ и на основе резазурина. Расчет индекса цитотоксичности. Обработка культуры клеток апоптоз-индуцирующим агентом. Окрашивание клеток annexin-V-FITC и йодидом пропидия. Проведение проточной цитометрии. Подготовка образцов для Вестерн - блота (лизис клеток, определение концентрации белка). Проведение электрофореза и трансфер белков на мембрану. Блокирование мембраны и инкубация с антителами. Бессывороточные среды. Замена сыворотки. Микроокружение опухоли. Со-культивирование разных типов клеток в 3D-модели, подбор соотношения клеток. Анализ стадий формирования. Исследование зависимости диаметров и объемов сфероидов от первоначальной концентрации клеток и дня культивирования. Оценка жизнеспособности клеток в составе модели. Анализ инвазивной и миграционной активности клеток. Анализ белков внеклеточного матрикса. Обработка изображений клеток в ImageJ. Анализ данных проточной цитометрии в FlowJo. Статистический анализ цитотоксичности в GraphPad Prism. Обработка данных RNA-seq в Scanpy и Seurat. Визуализация и интерпретация результатов. Обработка протеомных данных. Построение сигнальных путей. Моделирование in silico.</p>
--	--

6. Образовательные результаты освоения дисциплины (модуля):

Код и наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения компетенции
<p>ОПК-3 Способен проводить экспериментальную работу с организмами и клетками, использовать физико-химические методы исследования макромолекул, математические методы обработки результатов биологических исследований</p>	<p>ИОПК-3.1 Применяет полученные знания об экспериментальной работе в области биотехнологии и адекватно выбирает алгоритмы для решения задач в области биоинженерии</p>
	<p>ИОПК-3.2 Выбирает оптимальные пути решения биотехнологических задач на основе современной методологии с использованием современного оборудования и экспериментальных методов</p>
	<p>ИОПК-3.3 Работает с современным лабораторным оборудованием общего назначения, а также специализированными приборами для молекулярно-генетических исследований (амплификаторы, приборы для электрофоретического разделения биомолекул и т.п.)</p>
<p>ОПК-4. Способен применять методы биоинженерии и биоинформатики для получения новых знаний и для получения биологических объектов с целенаправленно измененными свойствами, проводить анализ</p>	<p>ИОПК-4.1 Применяет методы биоинженерии и биоинформатики для получения биологических объектов с целенаправленно измененными свойствами</p>
	<p>ИОПК-4.2 Способен выбирать молекулярно-генетические и молекулярно-биологические</p>

результатов и методического опыта исследования, определять практическую значимость исследования	методы для решения задач профессиональной деятельности
	ИОПК-4.3 Оценивает и прогнозирует перспективность объектов своей профессиональной деятельности для биотехнологических производств
ПК-3. Способность выполнять работы по осуществлению процессов получения биотехнологической и биомедицинской продукции	ИПК-3.1 Способен проводить испытания образцов целевых продуктов биотехнологического и биомедицинского производства, исходного сырья и упаковочных материалов, промежуточной продукции и объектов производственной среды
	ИПК-3.2 Планирует и осуществляет биотехнологические процессы с использованием культур микроорганизмов, культур клеток, тканей растений и животных
	ИПК-3.3 Анализирует и выбирает методы контроля качества биотехнологического и биомедицинского производства

7. Оценочные и методические материалы

7.1. Оценочные материалы для организации текущего контроля

Лабораторные работы (ЛР 1-6)

Форма: устная, синхронная

Место и время проведения: во время контактной работы на лабораторных работах, согласно расписанию.

Примеры лабораторных работ:

Лабораторная работа 1.

План лабораторного помещения. Принципы зонирования. Техника безопасности. Ознакомление с устройством и работой ламинарного шкафа: порядок запуска и выключения, правила работы (стерильность, безопасность), приготовление и уборка рабочего места. Сухие и жидкие среды. Добавки. Приготовление сред. Стерильная фильтрация. Подготовка посуды для стерилизации. Автоклавирование. Утилизация отходов.

Лабораторная работа 2.

Разморозка адгезивной и суспензионной культуры клеток. Оценка жизнеспособности культуры клеток (окрашивание трипановым синим). Подсчет количества клеток. Посев адгезивной или суспензионной культуры клеток.

Лабораторная работа 3.

Оценка морфологии клеток и ее соответствие паспорту. Пересев адгезивной и суспензионной культуры клеток. Трипсинизация. Определение жизнеспособности и количества клеток. Субкультивирование. Цикл роста и индекс разведения.

Лабораторная работа 4.

Детекция микоплазменной контаминации методом ПЦР. Выявление микоплазмы методом флюоресценции.

Лабораторная работа 5.

Возраст культуры. Построение кривой роста клеток по результатам оценки количества клеток в разные дни и открытым базам данных. Замораживание культуры клеток. Формирование биобанка

Лабораторная работа 6-7.

Световая микроскопия. Прижизненная и препаратная окраска клеток для анализа морфологии клеток. Морфологические признаки основных видов гибели клеток. Анализ миграционной активности клеток.

Лабораторная работа 8-9.

Иммунофлуоресцентное окрашивание образцов для микроскопии (фиксация клеток, окрашивание клеток с использованием антител). Настройка микроскопа, выбор фильтров. Микроскопия. Анализ изображений, измерение интенсивности флуоресценции с использованием программ.

Лабораторная работа 10.

Пробоподготовка образцов к анализу. Принципы метода и устройства для проточной цитометрии. Анализ субпопуляций.

Лабораторная работа 11-12.

Клоногенный тест. Оценка цитотоксичности методом МТТ и на основе резазурина. Расчет индекса цитотоксичности.

Лабораторная работа 13-14.

Обработка культуры клеток апопроз-индуцирующим агентом. Окрашивание клеток annexin-V-FITC и йодидом пропидия. Проведение проточной цитометрии.

Лабораторная работа 15-16.

Подготовка образцов для Вестерн - блота (лизис клеток, определение концентрации белка). Проведение электрофореза и трансфер белков на мембрану. Блокирование мембраны и инкубация с антителами. Детекция сигнала. Обработка полученных данных, оценка интенсивности полос, нормализация к контролю.

Лабораторная работа 17.

Бессывороточные среды. Замена сыворотки. Микроокружение опухоли. Со-культивирование разных типов клеток в 3D-модели, подбор соотношения клеток. Требования и принципы формирования гетеротопической сфероидной модели. Отслеживание разных типов клеток в 3D-модели.

Лабораторная работа 18-20.

Анализ стадий формирования. Исследование зависимости диаметров и объемов сфероидов от первоначальной концентрации клеток и дня культивирования. Оценка жизнеспособности клеток в составе модели. Анализ инвазивной и миграционной активности клеток. Анализ белков внеклеточного матрикса.

Лабораторная работа 21-23.

Введение в методы анализа клеточных культур. Обзор подходов. Сбор данных. Обработка изображений клеток в ImageJ. Анализ данных проточной цитометрии в FlowJo. Статистический анализ цитотоксичности в GraphPad Prism.

Лабораторная работа 24-25.

Мета-анализ публикаций. Обработка данных RNA-seq в Scanpy и Seurat. Визуализация и интерпретация результатов. Обработка протеомных данных. Построение сигнальных путей. Моделирование in silico.

Критерии оценки:

1. Лабораторная работа выполнена (2).
2. Лабораторная работа не выполнена (0).

7.2. Оценочные материалы для организации промежуточной аттестации

Форма проведения: устная (синхронная), в очном формате в зависимости от расписания. Промежуточная аттестация включает в себя: консультацию (К1), которая проводится после изучения 1-го модуля; экзамен (Э1), который проводится после изучения 2-го модуля; консультацию (К2), которая проводится после изучения 3-го модуля; экзамен (Э2), который проводится после изучения 4-го модуля.

Место проведения: учебная аудитория.

Пример экзаменационного задания:

1. Дайте определение термину *in silico* моделирование. Каковы его основные преимущества перед *in vitro* и *in vivo* методами?
2. Опишите методы выделения (как минимум 3) и культивирования первичных культуры клеток. В каждом экзаменационном билете будет указано два вопроса из предложенного перечня вопросов для подготовки к экзаменам. Дополнительные вопросы будут также выбраны из предложенного перечня вопросов для подготовки к экзаменам. Максимальный балл на экзамене – 10 баллов с учётом дополнительных вопросов.

Критерии оценки:

1. Получен правильный ответ на первый вопрос (2).
2. Полнота правильного ответа (0-2).
3. Получен неправильный ответ на первый вопрос (0).
4. Получен правильный ответ на второй вопрос (2).
5. Полнота правильного ответа (0-2).
6. Получен неправильный ответ на второй вопрос (0).
7. Получены ответы на дополнительные вопросы (0-2).

7.3. Методические рекомендации

Обучение по дисциплине предполагает изучение курса на аудиторных занятиях (практические занятия) и в ходе самостоятельной работы студентов. Студентам необходимо ознакомиться с содержанием рабочей программы дисциплины, с целями и задачами дисциплины, ее связями с другими дисциплинами образовательной программы, методическими разработками по данной дисциплине.

Обучение по дисциплине проводится последовательно путем проведения практических занятий с углублением и закреплением полученных знаний в ходе самостоятельной работы с последующим переводом знаний в умения в ходе практических занятий. Получение углубленных знаний по изучаемой дисциплине достигается за счет дополнительных часов к аудиторной работе самостоятельной работы студентов. Выделяемые часы целесообразно использовать для знакомства с дополнительной научной литературой по проблематике дисциплины, анализа научных концепций и современных подходов к осмыслению рассматриваемых проблем. К самостоятельному виду работы студентов относится работа в библиотеках, в электронных поисковых системах и т.п. по сбору материалов, необходимых для проведения практических занятий или выполнения конкретных заданий преподавателя по изучаемым темам. Обучающиеся могут установить электронный диалог с преподавателем, выполнять посредством него контрольные задания.