

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт медицины, экологии и физической культуры
Экологический факультет
Кафедра биологии, экологии и природопользования

С.М. Слесарев, Ю.В. Саенко

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ

*Методические указания
по выполнению лабораторных работ и самостоятельной
работы
для бакалавров направления подготовки 06.03.01 Биология*

Ульяновск
2019

УДК 576
ББК 28.070
С47

*Печатается по решению Ученого совета ИМЭиФК
Ульяновского государственного университета*

Рецензент - кандидат биологических наук, зав. каф. биологии и химии ФГБОУ ВО
«УлГПУ им. И.Н. Ульянова» **О.Е. Беззубенкова**
кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии и химии
ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова» **В.А. Михеев**

С47 Лабораторные методы исследования в биологии: Методические указания по выполнению лабораторных работ и самостоятельной работы для бакалавров направления подготовки 06.03.01 Биология / С.М. Слесарев, Ю.В. Саенко. – Ульяновск: УлГУ, 2019. – 45 с.

Методические указания предназначены бакалаврам, выполняющим программу дисциплины «Лабораторные методы исследования в биологии». Методические указания включают в себя программу дисциплины, описание лабораторных работ, указания по выполнению индивидуальных заданий и самостоятельной работы, список литературных источников.

Методические указания предназначены для студентов, обучающихся по программе бакалавриата по направлению подготовки 06.03.01 Биология и преподавателей, осуществляющих ведение дисциплины «Лабораторные методы исследования в биологии».

УДК 576
ББК 28.070

© Слесарев С.М., Саенко Ю.В., 2019
© Ульяновский государственный университет, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| 1. Цели и задачи освоения дисциплины..... | 4 |
| 2. Требования к результатам освоения дисциплины | 4 |
| 3. Содержание дисциплины..... | 7 |
| 4. Вопросы для самостоятельной работы студентов в ходе подготовки к выполнению лабораторных работ..... | 10 |
| 5. Лабораторные работы..... | 14 |
| 5.1. Рекомендации перед началом работы..... | 14 |
| 5.2. Требования к рабочему месту и инструментам..... | 15 |
| 5.3. Положительный и отрицательный контроль..... | 15 |
| 5.4. Приготовление реакционных смесей..... | 15 |
| 5.5. <i>Лабораторная работа 1.</i> Выделение суммарной РНК; анализ суммарной рнк методом гель-электрофореза..... | 16 |
| 5.6. <i>Лабораторная работа 2.</i> Синтез первой цепи кДНК. Амплификация двухцепочечной кДНК..... | 18 |
| 5.7. <i>Лабораторная работа 3.</i> Амплификация 3'-концевого участка гена флуоресцентного белка из кораллового полипа <i>clavularia</i> (3'-gase)..... | 22 |
| 5.8. <i>Лабораторная работа 4.</i> Амплификация полной кодирующей последовательности гена флуоресцентного белка и его направленное клонирование в бактериальный экспрессионный вектор..... | 25 |
| 5.9. <i>Лабораторная работа 5.</i> Экспрессия гена флуоресцентного белка в бактериях <i>E.coli</i> ; визуализация и выделение рекомбинантного белка..... | 30 |
| 6. Перечень вопросов к зачету..... | 32 |
| 7. Тесты (тестовые задания) для текущего контроля и контроля самостоятельной работы обучающихся..... | 34 |
| 8. Учебно-методическое и информационное | 43 |
| обеспечение дисциплины | |

1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ:

Цели освоения дисциплины: обеспечить усвоение необходимого объема знаний, позволяющих студенту биологу получить глубокое представление об основных лабораторных методах исследования в биологии.

Задачи освоения дисциплины:

- изучение специфики лабораторных методов исследования в биологии;
- развитие способности правильного определения методов экспериментального исследования согласно поставленной цели и задачам;
- практическое освоение методов исследования фиксированных клеток и тканей, методов лабораторной диагностики гельминтозов.
- обобщение и систематизация ранее полученных знаний о методах исследования в биологии;
- выработка умения и навыков практического использования полученных знаний при постановке собственного экспериментального исследования.

2. ТРЕБОВАНИЯ К РЕЗУЛЬТАТАМ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ

| № п/п | Индекс компетенции | Содержание компетенции и (или ее части) | Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине, соотнесенных с индикаторами достижения компетенций | | |
|-------|--------------------|---|---|--|---|
| | | | знать | уметь | владеть |
| 1. | ОПК-6 | способность применять современные экспериментальные методы работы с биологическими объектами в полевых и лабораторных условиях, навыки работы с современной аппаратурой | Основные подходы к самоорганизации рабочего места биолога-исследователя. Устройство светового микроскопа, аналитических приборов для лабораторных и полевых исследований и правила работы с ними. Основные подходы к самообразованию при подготовке к исследовательской деятельности биолога. Значение лабораторных методов исследования в изучении | Самостоятельно организовывать проведение морфометрических, лабораторных, биохимических исследований и измерений. Самостоятельно прогнозировать результаты биологических процессов, протекающих в живых системах, опираясь на теоретические положения. Самостоятельно научно обосновывать наблюдаемые явления и взаимосвязи в организме, проявляя | Компьютерной техникой с целью самоорганизации и самообразования (работа с сайтами, компьютерными сетями, электронными пособиями); Навыками самостоятельно работы с учебной и справочной литературой, поиска необходимой информации, Навыками микроскопирования и описания |

| | | | | | |
|----|------|--|---|--|---|
| | | | биологических объектов. Методы исследования живых клеток и тканей. Методы исследования химического состава и метаболизма клеток и тканей. Количественные методы определения содержания различных веществ в клетках и тканях | способность к самообразованию (работа с сайтами, компьютерными сетями, электронными пособиями, литературными источниками). Осуществлять правильный выбор методов исследования согласно поставленным целям и задачам. Прогнозировать результаты биологических процессов, протекающих в живых системах, опираясь на теоретические положения. | биологических объектов. Навыками безопасной работы в биологической лаборатории, обращения со световыми микроскопами, химической посудой, реактивами и анализирующими электрическим и приборами. Методами анализа изображения клеточных и тканевых структур. |
| 2. | ПК-1 | способность эксплуатировать современную аппаратуру и оборудование для выполнения научно-исследовательских полевых и лабораторных биологических работ | Основные подходы к самоорганизации рабочего места в диагностической и научно-исследовательской лабораториях; устройство и принципы работы научно-исследовательского оборудования. | Организовать самостоятельную работу с лабораторными приборами, микроскопом; представлять результаты экспериментов и анализа в виде схем, рисунков, описаний. | Компьютерной техникой с целью самоорганизации и самообразования (работа с сайтами, компьютерными сетями, электронными пособиями) |
| 3. | ПК-2 | способность применять на практике приемы составления научно-технических отчетов, | правила оформления отчетных документов, нормативные документы, регламентирующие работу структурного подразделения и | оформлять отчетную документацию согласно требованиям, последовательно и логично формулировать выводы, | навыками составления плана работы в соответствие с поставленными задачами, навыками поиска |

| | | | | | |
|----|------|--|---|--|---|
| | | <p>обзоров, аналитических карт и пояснительных записок, излагать и критически анализировать получаемую информацию и представлять результаты полевых и лабораторных биологических исследований</p> | <p>организации в целом (ГОСТ, международные стандарты, регламенты)</p> | <p>представлять результаты проведенной работы</p> | <p>необходимой литературы, оформления отчетной документации.</p> |
| 4. | ПК-5 | <p>готовность использовать нормативные документы, определяющие организацию и технику безопасности работ, способность оценивать биобезопасность продуктов биотехнологических и биомедицинских производств</p> | <p>Нормативные документы, определяющие организацию научно-исследовательских лабораторий, технику безопасности работ, стандарты клинических лабораторных методов исследования.</p> | <p>Соблюдать технику безопасности на рабочем месте. Основные правила работы с компьютерной техникой.</p> | <p>навыками работы с лабораторным и производственным оборудованием согласно требованиям техники безопасности; информационными технологиями, позволяющими оценить биобезопасность материалов, применяемых в ходе работы.</p> |
| 5. | ПК-8 | <p>способность использовать основные технические средства поиска научно-биологической</p> | <p>функциональные возможности прикладных программ; основные положения информационной безопасности; информационные технологии</p> | <p>работать с программными средствами (ПС) общего назначения, соответствующими современным требованиям мирового рынка ПС</p> | <p>навыками работы в локальных и глобальных компьютерных сетях, использовать в профессиональной</p> |

| | | | | |
|--|---|--|--|--|
| | информации , универсальные пакеты прикладных компьютерных программ, создавать базы экспериментальных биологических данных, работать с биологической информацией в глобальных компьютерных сетях | организации поиска информации в сети Интернет. | | деятельности сетевые средства поиска и обмена информацией. |
|--|---|--|--|--|

3. СОДЕРЖАНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Раздел 1. Лабораторный минимум

Тема 1.1: Лабораторная посуда. Автоклав

Техника безопасности на рабочем месте. Устройство диагностических и научно-исследовательских лабораторий. Средства индивидуальной защиты. Работа с фенолом, хлороформом, щелочами, кислотами, эфирами, спиртом, этидиумом бромидом, акриламидом, горючими веществами и газами. Правила асептики и антисептики, стерильные условия.

Лабораторная стеклянная посуда: пипетки, стаканы, колбы, цилиндры и т.д. Лабораторный пластик: эппендорфы, пробирки, наконечники, флаконы, бутылки, планшеты и т.д. Штативы. Мытье и стерилизация посуды: обработка моющим средством, вымачивание в дистиллированной воде, автоклавирование.

Автоклавирование стеклянной и пластиковой посуды. Давление и температура при автоклавировании. Загрузка автоклава, установка необходимой температуры и времени автоклавирования, подача воды, стерилизация, сушка.

Тема 1.2: Автоматическая пипетка. Ферменты.

Виды автоматических пипеток: одноканальная, многоканальная. Работа с автоматической пипеткой. Пипетирование. Правила отбора и сброса жидкости. Правила набора вязких жидкостей. Влияние температуры на жидкость при наборе автоматической пипеткой. Чистка автоматической пипетки. Хранение автоматических пипеток.

Краткая характеристика ферментов. Единицы активности. Правила работы с ферментами. Хранение ферментов. Стоковые пробирки с ферментами, аликвоты ферментов. Ферментативная активность. Классы ферментов. Ферментативный катализ. Некаталитическая реакция, ферментативная реакция.

Тема 1.3: Потенциометрия, оборудование для перемешивания и подогрева исследуемых веществ.

Потенциометрия, водородный показатель. Щелочной и кислотный рН. Правила работы с рН-метром, виды рН-метров. Хранение электрода. Калибровка рН-метра.

Вортекс – прибор для быстрого перемешивания растворов. Правила работы с прибором. Меры предосторожности в работе на Вортексе. Термошейкер – прибор для одновременного перемешивания и прогрева растворов. Правила работы с прибором.

Тема 1.4: Центрифугирование.

Разделение веществ с помощью центрифугирования. Скорость седиментации. Центробежное ускорение, относительное центробежное ускорение, время, необходимое для осаждения сферических частиц, вязкость среды, плавучая плотность частиц. Препаративное центрифугирование. Дифференциальное центрифугирование. Дифференциальное центрифугирование суспензии частиц в центробежном поле. Зонально-скоростное центрифугирование. Изопикническое центрифугирование. Равновесное центрифугирование в градиенте плотности. Градиенты. Аналитическое центрифугирование. Ультрацентрифугирование. Классификация центрифуг.

Тема 1.5.: Микроскопия. Взвешивание.

Виды микроскопов. Современные технологии микроскопии. Работа с микроскопом. Световой микроскоп. Инвертированный микроскоп.

Аналитические весы. Пределы измерения. Правила работы с аналитическими весами. Калибровка весов. Взвешивание реактивов.

Тема 1.6: Ламинарный бокс, инкубатор CO₂.

Ламинарный шкаф. Виды ламинарных потоков. Правила работы в ламинарном шкафу, техника безопасности. Поддержание стерильности в ламинарном боксе. Обработка спиртом поверхностей ламинарного бокса, ультрафиолетовое облучение.

Устройство инкубатора. Сферы использования инкубаторов CO₂. Поддержание постоянных температуры и газового состава. Содержание инкубатора.

Тема 1.7: Реактивы. Расчет и приготовление растворов. Буферные растворы.

Правила работы с общими реактивами. Приготовление растворов. Расчет растворов. Моль, молярный вес, процентное содержание, молекулярный вес. Способы дополнительной очистки растворов: фильтрация, очистка углем, деионизация, автоклавирование, очистка спирта. Три сорта воды: водопроводная, дистиллированная, деионизированная.

Работа с токсичными летучими веществами под тягой.

Буферные растворы. Приготовление буферных растворов. Влияние pH и температуры на свойства буферного раствора.

Раздел 2. Культивирование клеточных культур.

Тема 2.1: Клетка как объект научного исследования.

Виды клеточных культур. Методики и подходы. Культивирование клеток *in vitro*. Типы культивирования клеток. Системы культивирования клеток. Среды для культивирования клеточных культур. Использование культуры клеток.

Тема 2.2: Ведение клеточных культур.

Смена среды в монослойной культуре. Методы асептики. Смена среды во флаконах. Посуда, субстраты, среды для культивирования. Приготовление спиртовых растворов. Контаминация. Контроль контаминации. Подсчет клеток на камере Горяева. Криоконсервация клеток. Разморозка клеточных культур. Контроль клеточной культуры после размораживания. Смена среды.

Раздел 3. Флуоресцентная микроскопия.

Тема 3.1: Микроскопия, флуоресцентный микроскоп.

История развития микроскопии в биологии. Виды микроскопии. Сущность флуоресцентной микроскопии: физические основы, характеристика поглощения и эмиссии. Преимущества и ограничения флуоресцентной микроскопии. Функциональные особенности устройства флуоресцентного микроскопа.

Тема 3.2: Фиксаторы и биологические красители.

Методы фиксации биологических образцов. Фиксаторы. Общая характеристика и классификация биологических красителей. Способы детекции сигнала при флуоресцентной микроскопии: флюорофоры, флюоресцентные метки и зонды. Характеристика и область использования флуоресцентных красителей: DCFH-DA, TMRE, монохлоробиман, бромистый этидий, йодистый пропидий, Yo-Pro1, акридиновый оранжевый, SybrGreen.

Раздел 4. Работа с нуклеиновыми кислотами.

Тема 4.1: Выделение ДНК и РНК из клеток.

Подготовка клеточной культуры к выделению нуклеиновых кислот. Методы выделения нуклеиновых кислот. Выделение ДНК на сорбенте, на магнитном штативе. Выделение РНК тризолом, колоночным способом.

Тема 4.2: Электрофорез нуклеиновых кислот.

Техника проведения электрофореза нуклеиновых кислот: подготовка камеры для электрофореза, приготовление геля, приготовление буферов, нанесение образцов в лунки. Горизонтальный и вертикальный электрофорез. Электрофорез в агарозном геле. Электрофорез в полиакриламидном геле. Работа с флуоресцентными красителями. Техника безопасности при работе с трансиллюминатором. Интерпретация данных, полученных в результате электрофореза.

Тема 4.3: Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Общая характеристика метода полимеразной цепной реакции. Виды амплификаторов. Виды ДНК-полимераз. dNTP. Праймеры для ПЦР. Буферный раствор. Приготовление реакционной смеси.

Тема 4.4: Флуориметрия.

Флуоресцентный анализ. Виды флуориметров. Работа с прибором Qubit. Измерение концентрации ДНК и РНК в растворах.

Тема 4.5: Синтез ДНК и РНК.

Автоматический синтезатор ДНК и РНК. Синтез олигонуклеотидов: подготовка колонок, ввод протокола синтеза, ввод синтезируемых последовательностей, запуск и управление процессом синтеза, удаление олигонуклеотида с полимера. Применение синтезированных ДНК и РНК.

Раздел 5. Постгеномные технологии.

Тема 5.1: Секвенирование.

Геномика. Протеомика. Метагеномика. Биоинформатика. Классические методы секвенирования: секвенирование с помощью капиллярного электрофореза и пиросеквенирование. Новые методы секвенирования (NGS – Next Generation Sequencing): высокопроизводительное пиросеквенирование, циклическое лигазное и полупроводниковое секвенирование, секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников. Новейшие методы секвенирования (Next- Next Generation Sequencing): технология секвенирования одной молекулы, секвенирование единичных молекул в реальном времени, секвенирование через нанопоры.

4. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ В ХОДЕ ПОДГОТОВКИ К ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Раздел 1. Лабораторный минимум

Тема 1.1: Лабораторная посуда. Автоклав

Вопросы к теме:

1. Техника безопасности на рабочем месте.
2. Устройство диагностических и научно-исследовательских лабораторий.
3. Средства индивидуальной защиты. Правила асептики и антисептики, стерильные условия.
4. Работа с фенолом, хлороформом, щелочами, кислотами, эфирами, спиртом, этидиумом бромидом, акриламидом, горючими веществами и газами.
5. Лабораторная стеклянная посуда: пипетки, стаканы, колбы, цилиндры и т.д. Лабораторный пластик: эппендорфы, пробирки, наконечники, флаконы, бутылки, планшеты и т.д. Штативы.
6. Мытье и стерилизация посуды: обработка моющим средством, вымачивание в дистиллированной воде, автоклавирование.
7. Автоклавирование стеклянной и пластиковой посуды. Давление и температура при автоклавировании. Загрузка автоклава, установка

необходимой температуры и времени автоклавирования, подача воды, стерилизация, сушка.

Тема 1.2: Автоматическая пипетка. Ферменты.

Вопросы к теме:

1. Виды автоматических пипеток: одноканальная, многоканальная. Работа с автоматической пипеткой. Пипетирование. Правила отбора и сброса жидкости.
2. Правила набора вязких жидкостей. Влияние температуры на жидкость при наборе автоматической пипеткой. Чистка автоматической пипетки.
3. Хранение автоматических пипеток.
4. Краткая характеристика ферментов. Единицы активности. Правила работы с ферментами. Хранение ферментов. Стоковые пробирки с ферментами, аликвоты ферментов.
5. Ферментативная активность. Классы ферментов. Ферментативный катализ. Некаталитическая реакция, ферментативная реакция.

Тема 1.3: Потенциометрия, оборудование для перемешивания и подогрева исследуемых веществ.

Вопросы к теме:

1. Потенциометрия, водородный показатель. Щелочной и кислотный рН. Правила работы с рН-метром, виды рН-метров. Хранение электрода. Калибровка рН-метра.
2. Вортекс – прибор для быстрого перемешивания растворов. Правила работы с прибором. Меры предосторожности в работе на Вортексе.
3. Термошейкер – прибор для одновременного перемешивания и прогрева растворов. Правила работы с прибором.

Тема 1.4: Центрифугирование.

Вопросы к теме:

1. Разделение веществ с помощью центрифугирования. Скорость седиментации. Центробежное ускорение, относительное центробежное ускорение, время, необходимое для осаждения сферических частиц, вязкость среды, плавучая плотность частиц.
2. Препаративное центрифугирование.
3. Дифференциальное центрифугирование.
4. Дифференциальное центрифугирование суспензии частиц в центробежном поле.
5. Зонально-скоростное центрифугирование.
6. Изопикническое центрифугирование.
7. Равновесное центрифугирование в градиенте плотности. Градиенты.
8. Аналитическое центрифугирование.
9. Ультрацентрифугирование.
10. Классификация центрифуг.

Тема 1.5: Микроскопия. Взвешивание.

Вопросы к теме:

1. Виды микроскопов. Современные технологии микроскопии.

2. Работа с микроскопом.
3. Световой микроскоп.
4. Инвертированный микроскоп.
5. Аналитические весы. Пределы измерения. Правила работы с аналитическими весами. Калибровка весов.
6. Взвешивание реактивов.

Тема 1.6: Ламинарный бокс, инкубатор CO₂.

Вопросы к теме:

1. Ламинарный шкаф. Виды ламинарных потоков. Правила работы в ламинарном шкафу, техника безопасности.
2. Поддержание стерильности в ламинарном боксе. Обработка спиртом поверхностей ламинарного бокса, ультрафиолетовое облучение.
3. Устройство инкубатора. Сферы использования инкубаторов CO₂.
4. Поддержание постоянных температуры и газового состава. Содержание инкубатора.

Тема 1.7: Реактивы. Расчет и приготовление растворов. Буферные растворы.

Вопросы к теме:

1. Правила работы с общими реактивами. Приготовление растворов.
2. Расчет растворов. Моль, молярный вес, процентное содержание, молекулярный вес.
3. Способы дополнительной очистки растворов: фильтрация, очистка углем, деионизация, автоклавирование, очистка спирта.
4. Три сорта воды: водопроводная, дистиллированная, деионизированная.
5. Работа с токсичными летучими веществами под тягой.
6. Буферные растворы. Приготовление буферных растворов. Влияние pH и температуры на свойства буферного раствора.

Раздел 2. Культивирование клеточных культур.

Тема 2.1: Клетка как объект научного исследования.

Вопросы к теме:

1. Виды клеточных культур.
2. Методики и подходы. Культивирование клеток in vitro.
3. Типы культивирования клеток. Системы культивирования клеток.
4. Среды для культивирования клеточных культур.
5. Использование культуры клеток.

Тема 2.2: Ведение клеточных культур.

Вопросы к теме:

1. Смена среды в монослойной культуре.
2. Методы асептики.
3. Смена среды во флаконах.
4. Посуда, субстраты, среды для культивирования. Приготовление спиртовых растворов.

5. Контаминация. Контроль контаминации.
6. Подсчет клеток на камере Горяева.
7. Криоконсервация клеток.
8. Разморозка клеточных культур.
9. Контроль клеточной культуры после размораживания. Смена среды.

Раздел 3. Флуоресцентная микроскопия.

Тема 3.1: Микроскопия, флуоресцентный микроскоп.

Вопросы к теме:

1. История развития микроскопии в биологии.
2. Виды микроскопии.
3. Сущность флуоресцентной микроскопии: физические основы, характеристика поглощения и эмиссии. Преимущества и ограничения флуоресцентной микроскопии.
4. Функциональные особенности устройства флуоресцентного микроскопа.

Тема 3.2: Фиксаторы и биологические красители.

Вопросы к теме:

1. Методы фиксации биологических образцов.
2. Фиксаторы. Общая характеристика и классификация биологических красителей.
3. Способы детекции сигнала при флуоресцентной микроскопии: флюорофоры, флюоресцентные метки и зонды.
4. Характеристика и область использования флуоресцентных красителей: DCFH-DA, TMRE, монохлоробиман, бромистый этидий, йодистый пропидий, Yo-Pro1, акридиновый оранжевый, SybrGreen.

Раздел 4. Работа с нуклеиновыми кислотами.

Тема 4.1: Выделение ДНК и РНК из клеток.

Вопросы к теме:

1. Подготовка клеточной культуры к выделению нуклеиновых кислот.
2. Методы выделения нуклеиновых кислот.
3. Выделение ДНК на сорбенте, на магнитном штативе.
4. Выделение РНК тризолом, колоночным способом.

Тема 4.2: Электрофорез нуклеиновых кислот.

Вопросы к теме:

1. Техника проведения электрофореза нуклеиновых кислот: подготовка камеры для электрофореза, приготовление геля, приготовление буферов, нанесение образцов в лунки.
2. Горизонтальный и вертикальный электрофорез.
3. Электрофорез в агарозном геле. Электрофорез в полиакриламидном геле.
4. Работа с флуоресцентными красителями. Техника безопасности при работе с трансиллюминатором.

5. Интерпретация данных, полученных в результате электрофореза.

Тема 4.3: Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Вопросы к теме:

1. Общая характеристика метода полимеразной цепной реакции.
2. Виды амплификаторов. Виды ДНК-полимераз. dNTP. Праймеры для ПЦР.
3. Буферный раствор. Приготовление реакционной смеси.

Тема 4.4: Флуориметрия.

Вопросы к теме:

1. Флуоресцентный анализ. Виды флуориметров.
2. Работа с прибором Qubit.
3. Измерение концентрации ДНК и РНК в растворах.

Тема 4.5: Синтез ДНК и РНК.

Вопросы к теме:

1. Автоматический синтезатор ДНК и РНК.
2. Синтез олигонуклеотидов: подготовка колонок, ввод протокола синтеза, ввод синтезируемых последовательностей, запуск и управление процессом синтеза, удаление олигонуклеотида с полимера.
3. Применение синтезированных ДНК и РНК.

Раздел 5. Постгеномные технологии.

Тема 5.1: Секвенирование.

Вопросы к теме:

1. Геномика. Протеомика. Метагеномика. Биоинформатика.
2. Классические методы секвенирования: секвенирование с помощью капиллярного электрофореза и пиросеквенирование.
3. Новые методы секвенирования (NGS – Next Generation Sequencing): высокопроизводительное пиросеквенирование, циклическое лигазное и полупроводниковое секвенирование, секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников.
4. Новейшие методы секвенирования (Next- Next Generation Sequencing): технология секвенирования одной молекулы, секвенирование единичных молекул в реальном времени, секвенирование через нанопоры.

5. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

5.1. Рекомендации перед началом работы

Как избежать контаминации и деградации РНК и ДНК

Даже небольшие количества посторонней ДНК или РНК-матрицы могут привести к образованию неспецифического продукта в ходе синтеза кДНК. Что еще важнее, малейшее загрязнение препаратов нуклеазами приводят к

быстрой деградации ДНК и РНК. Рекомендуется:

- по возможности смешивать реагенты для синтеза кДНК в зоне, отделенной от мест выделения ДНК и РНК и анализа продуктов ПЦР;
- использовать для работы наконечники для автоматических пипеток, имеющие гидрофобный фильтр;
- для мониторинга уровня контаминации включать отрицательный контроль (в реакцию вместо ДНК или РНК-матрицы добавлять стерильную воду) в каждый эксперимент;
- осуществлять работы с РНК в стерильных условиях, в перчатках, не чихать и не разговаривать над открытой пробиркой, использовать свободную от РНК-активности бидистиллированную деионизованную воду.

5.2. Требования к рабочему месту и инструментам

Все нижеперечисленные меры безопасности объясняются возможностью загрязнения препаратов чужеродной ДНК и опасностью разрушения РНК рибонуклеазами из внешней среды, но не опасностью для человека при работе с РНК. Профессиональный подход к манипуляциям с РНК требует выделения для этих работ отдельного помещения или рабочего стола. В идеале, для работы с РНК необходимы отдельный набор пипеток, реактивов и чистый халат. В условиях обучения можно ограничиться выделением отдельной зоны на столе, где нужно расстелить листы чистой фильтровальной бумаги и оставить только необходимые для данной работы реактивы и оборудование. На столе, где ведется работа с РНК, желательно исключить проведение работ с использованием РНКазы (выделение плазмид) и ДНКаз (выделение белков и пр.). Возможно временное разделение работы, например, в день, когда происходят манипуляции с РНК, никакие другие работы с ДНК в учебной комнате не проводятся. При работе следует использовать одноразовую пластиковую посуду (носики, пробирки и т.д.) и небольшие одноразовые фасовки реактивов.

Работа с РНК не требует ламинара или горелки. Большая часть низкой стабильности РНК связана с плохим качеством реактивов, с недостаточной аккуратностью исследователей или с работой за одним столом с препаратами РНК и растворами РНКаз.

5.3. Положительный и отрицательный контроль

Положительный контроль необходим для проверки работы всех компонентов реакции. Отрицательные контроли необходимы для контроля неспецифической амплификации, контаминации реагентов и экспериментальных образцов посторонними РНК и ДНК.

5.4. Приготовление реакционных смесей

При одновременном проведении нескольких реакций рекомендуется приготовление общих реакционных смесей, содержащих общие для всех реакций компоненты. Те компоненты, которые варьируют от реакции к реакции, добавляют после разнесения аликвот реакционной смеси по пробиркам для проведения реакции. Использование общей реакционной смеси позволяет уменьшить вариации в количестве различных компонентов от пробирки к пробирке. Для компенсации погрешности пипетирования

реальный объем общей реакционной смеси должен примерно на 5-10% превышать расчетный. Перед распределением аликвот реакционной смеси по пробиркам необходимо перемешать ее содержимое, например, с помощью пипетирования. После перемешивания необходимо сбросить оставшиеся на стенках пробирки капли с помощью быстрого центрифугирования.

При смешивании малых объемов реагентов (например, при их добавлении непосредственно в пробирку для ПЦР) необходимо обратить внимание, чтобы на внешней стороне носика не оставалось дополнительных капель. После добавления реагента в пробирку следует аккуратно перемешать содержимое пипетированием. Ферменты следует добавлять в реакционную смесь в последнюю очередь и перемешивать аккуратным пипетированием, избегая вспенивания смеси.

5.5. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1. ВЫДЕЛЕНИЕ СУММАРНОЙ РНК; АНАЛИЗ СУММАРНОЙ РНК МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА.

Материалы и оборудование для выполнения лабораторной работы 1.

- Набор для практикума *Clavularia* FP cloning set (Евроген, MB001)
- Реагент ExtractRNA (Евроген, BC032)
- Хлороформ
- Изопропиловый спирт (изопропанол)
- 80% этиловый спирт (разводят из 96% этилового спирта деионизованной водой)
- Реактивы и оборудование для гель-электрофореза (Приложение 1)
- Гомогенизатор Даунса на 2-3 мл (желательно)

I Гомогенизатор можно заменить маленькой фарфоровой ступкой или пластиковым пестиком для микропробирок.

- Настольная центрифуга (желательно с охлаждением до +4°C)
- Настольный термостат
- Вортекс (желательно)
- Ледяная баня
- Стерильные пробирки (1,5 мл)
- Штатив для пробирок
- Стерильные наконечники для пипеток
- Автоматические пипетки на 10-20, 200 и 1000 мкл
- Перчатки

Ход работы

1) Небольшой кусок коралла поместите в 300 мкл реагента ExtractRNA. I Можно одновременно выделить РНК из любого другого живого объекта (насекомые, черви, моллюски, растения). На каждые 50-100 мг ткани требуется добавлять 1 мл ExtractRNA.

2) Тщательно гомогенизируйте образец с помощью пестика или стеклянного гомогенизатора Даунса и оставьте на 10-15 мин на столе для полного разрушения нуклеопротеидных комплексов. Для того, чтобы избежать деградации РНК, ткань следует гомогенизировать как можно быстрее и

тщательнее.

- 3) Клеточный дебрис осадите центрифугированием в течение 10 мин при максимальной скорости на настольной центрифуге (желательно, при температуре +4°C).
- 4) Аккуратно отберите надосадочную жидкость и перенесите ее 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.
- 5) К полученному раствору добавьте 60 мкл хлороформа (из расчета 0,2 мл на 1 мл реагента ExtractRNA). Перемешайте содержимое пробирки резким встряхиванием в течение 15 сек. Не используйте вортекс.
- 6) Инкубируйте смесь в течение 3-5 мин. при комнатной температуре, периодически встряхивая образец.
- 7) Центрифугируйте пробирки в течение 10-15 мин при максимальной скорости на настольной центрифуге при температуре +4°C.
- 8) Осторожно отберите водную фазу (сверху), стараясь не задеть интерфазу (лучше потерять часть объема, чем захватить лишнее) и перенесите в новую пробирку. В процессе центрифугирования формируется три фазы: нижняя органическая содержит фенол и хлороформ, интерфаза содержит денатурированный белок и верхняя водная фаза – РНК и ДНК. Если интерфаза большая, рекомендуется после отбора водной фазы повторить экстракцию хлороформом (п.п. 5-8).
- 9) Добавьте к образцу 150 мкл изопропанола (1/2 от объема реагента ExtractRNA). Хорошо перемешайте встряхиванием или с помощью вортекса. Образец РНК с изопропанолом можно хранить при -20°C в течение нескольких месяцев.
- 10) Центрифугируйте образцы на микроцентрифуге в течение 10 мин с максимальной скоростью (не менее 13000 об/мин) при комнатной температуре. Во время центрифугирования на стенке пробирки формируется осадок РНК. Осадок может быть почти невидим. Позиционируйте пробирки в центрифуге таким образом, чтобы знать, на какой стенке должен формироваться осадок.
- 11) Осторожно и полностью отберите и выбросьте супернатант, сохраняя осадок. Преципитат не всегда формирует аккуратный осадок, а может быть распределен по задней стенке пробирки.
- 12) Добавьте к осадку 0,5 мл 80% этанола. Центрифугируйте пробирку 10 мин при максимальной скорости на настольной центрифуге при комнатной температуре. Позиционируйте пробирки в роторе так же, как при предыдущем центрифугировании (п. 10).
- 13) Отберите надосадочную жидкость. Оставшиеся капли стряхните на центрифуге и аккуратно отберите, не задевая осадка.
- 14) Оставьте пробирки с осадком на столе в вертикальном положении до полного высыхания (на 5-15 мин).
- 15) Растворите осадок в 15-20 мкл стерильной воды. При растворении образец рекомендуется прогреть 2-3 мин при +65°C. Поставьте пробирки с

выделенной РНК в лёд.

16) Проверьте качество РНК методом гель-электрофореза:

а) Приготовьте 1,2% агарозный гель на 1x ТАЕ-буфере с бромистым этидием (0,3 мг/л) (далее, ТАЕ-буфер).

б) Заполните камеру для электрофореза свежим ТАЕ-буфером. Для анализа РНК камеру следует промыть, использовать свежее приготовленный гель и чистый буфер, так как примеси РНКаз могут привести к деградации РНК во время электрофореза.

в) Отберите 0,5 и 2 мкл алиquotы раствора РНК и смешайте с 2-3 объемами буфера для нанесения образцов. В соседнюю лунку добавьте маркер длин ДНК 1kbDNA ladder, 50нг на дорожку.

г) Проведите электрофорез, используя рабочее напряжение не более 10 V/см (10 V на каждый см длины между электродами).

17) При хорошем качестве выделенной РНК соотношение интенсивности полос 18S и 28S должно быть примерно 1:1. Изменение соотношения интенсивности полос в пользу 18S и появление слабого шмера от полос рРНК в сторону фронта является первым признаком деградации РНК. Тем не менее, РНК с такой степенью деградации может быть использована для синтеза кДНК. Однако если шмер от низкомолекулярной фракции РНК столь интенсивен, что полоса рРНК не имеет выраженной нижней границы, то такая РНК не пригодна для синтеза к ДНК. В случае значительной примеси геномной ДНК в образце (на геле выглядит как яркое пятно высомолекулярной фракции) переосадите РНК с помощью LiCl).

18) Поместите образцы РНК на хранение при -20°C.

Итоги выполнения лабораторной работы 1

Получен препарат суммарной клеточной РНК из коралла и проанализирован на гель-электрофорезе. Пробирки подписаны и помещены на хранение при -20°C. Проведено сравнение препаратов РНК, выделенных разными исследователями. Ход и результаты работы запротоколированы в лабораторном журнале.

5.6. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2.. СИНТЕЗ ПЕРВОЙ ЦЕПИ КДНК. АМПЛИФИКАЦИЯ ДВУХЦЕПОЧНОЙ КДНК.

Материалы и оборудование для выполнения лабораторной работы 2.

- Набор для практикума Clavularia FP cloning set (Евроген, MB001)
- Набор для синтеза кДНК Mint (Евроген, SK001)
- Минеральное масло для молекулярно-биологических работ или аптечное вазелиновое масло (если амплификатор не имеет нагревающейся крышки)
- Реактивы и оборудование для гель-электрофореза
- Амплификатор
- Настольная центрифуга
- Вортекс (желательно)
- Ледяная баня

- Пробирки для ПЦР (0,5 или 0,2 мл)
- Штатив для пробирок
- Стерильные наконечники для пипеток
- Автоматические пипетки на 10-20, 200 и 1000 мкл
- Перчатки

Ход работы

Синтез первой цепи кДНК. В качестве стартового материала может быть использована РНК из *Clavularia*, полученная при выполнении работы¹, или контрольная РНК из набора *Clavularia FP cloning set* (2 мкл на одну реакцию синтеза). В качестве положительного контроля используйте 2 мкл контрольной РНК из набора *Clavularia FP cloning set* и/или контрольную РНК из набора для синтеза кДНК *Mint*.

1) Прогрейте образцы РНК при +65°C в течение 1-2 мин и перемешайте встряхиванием для дезагрегации РНК. Сбросьте капли со стенок пробирки на настольной центрифуге.

2) Для каждого образца РНК приготовьте первую часть реакционной смеси для синтеза первой цепи кДНК в пробирке для ПЦР:

1-3мкл Раствор РНК (1-2 мкг РНК)

1 мкл Адаптер CDS-1 (CDS-1 adapter, 10 мкМ)

1 мкл PlugOligo адаптер (15 мкМ)

X мкл Стерильная вода

5 мкл Суммарный объем

Рекомендуется использовать 1-2 мкг суммарной РНК на одну реакцию. Если количество выделенной РНК небольшое, добавьте в реакцию максимально допустимый объем раствора РНК – 3 мкл.

3) Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси пипетированием, сбросьте капли со стенок пробирки на настольной центрифуге.

4) Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку для предотвращения испарения реакционной смеси. Закройте пробирки и поместите их в амплификатор.

5) Инкубируйте пробирки 2 мин при +70°C, после этого, не вынимая пробирки из амплификатора, снизьте температуру инкубации до +42°C. Используйте режим с нагреванием крышки, если это возможно. Продолжайте инкубацию при +42°C не менее 1, но не более 5 мин. В это время приготовьте вторую часть реакционной смеси для синтеза первой цепи кДНК (п. 6). Вторую часть реакционной смеси добавляют после достижения реакционной смесью температуры +42°C. При более высокой температуре может произойти инактивация обратной транскриптазы.

6) Во время инкубации, описанной в пункте 5, приготовьте вторую часть реакционной смеси, содержащую обратную транскриптазу. Строго соблюдайте порядок смешивания реагентов.

2 мкл 5XбуфердлясинтезапервойцепикДНК(first-strandbuffer)

1 мкл DTT (20 мМ)

1 мкл Смесь dNTP (10 мМ)

1 мкл Обратная транскриптаза Mint (200 ед./мкл)

5 мкл Суммарный объем (на одну реакцию синтеза)

При одновременной постановке нескольких реакций, приготовьте общую реакционную смесь, пересчитав объемы добавляемых компонентов.

7) Аккуратно перемешайте компоненты смеси пипетированием, сбросьте капли со стенок пробирки на настольной центрифуге.

8) Добавьте по 5 мкл второй части реакционной смеси в каждую пробирку со стадии 5. Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси пипетированием, сбросьте капли со стенок пробирки на настольной центрифуге.

9) Инкубируйте пробирки при +42°C в течение 30 мин.

10) Добавьте к каждой реакционной смеси по 5 мкл раствора «IP-solution» для инициации включения PlugOligo. Аккуратно перемешайте компоненты реакции пипетированием, сбросьте капли со стенок пробирки на настольной центрифуге. Продолжайте инкубацию при +42°C в течение 1 ч 30 мин.

11) Поместите пробирки в лед для остановки реакции.

Первая цепь кДНК может быть использована немедленно для приготовления двухцепочечной кДНК или храниться при –20°C в течение 3 месяцев. При хранении пробирок на –20°C на дне может сформироваться бурый осадок. Он не влияет на качество кДНК.

Аmplification двухцепочечной кДНК

кДНК может стать источником контаминации. Попадание даже небольшого ее количества в реактивы для ПЦР вызывает неспецифическую амплификацию. Будьте аккуратны при выполнении работы и сопровождайте эксперименты контрольными реакциями (ПЦР без добавления ДНК-матрицы) для контроля контаминации.

12) Для каждого образца первой цепи кДНК приготовьте реакционную смесь для ПЦР, смешивая реагенты в указанном порядке:

80 мкл Стерильная вода

10 мкл 10X Буфер для ПЦР (Encyclo PCR buffer)

2 мкл 50X Смесь dNTP (10 mM каждой)

4 мкл Праймер для ПЦР M1 (PCR primer M1, 10 мкМ)

2 мкл 50X Полимераза Encyclo

2 мкл Первая цепь кДНК (со стадии 11)

100мкл Суммарный объем

Если первая цепь кДНК хранилась перед этим при –20°C, разморозьте ее и прогрейте 1 мин при +65°C для дезагрегации ДНК. Перемешайте содержимое пробирки перед отбором аликвоты. Неиспользованная первая цепь кДНК может быть повторно заморожена.

13) Аккуратно перемешайте компоненты реакционной смеси, сбросьте капли со стенок пробирки на настольной центрифуге.

14) Распределите по 25 мкл реакционной смеси в 4 пробирки для ПЦР.

15) Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в каждую ПЦР-пробирку. Закройте пробирки, поместите их в амплификатор.

16) Осуществите ПЦР амплификацию кДНК, используя следующую программу:

Предварительная денатурация: 95°C 1 мин Циклы ПЦР 15 циклов 95°C 15 сек 66°C 20 сек 72°C 3 мин

17) После окончания программы достаньте из амплификатора одну пробирку, остальные подвергните еще 3 циклам ПЦР.

18) После 18 циклов достаньте из амплификатора еще одну пробирку, остальные подвергните еще 3 циклам ПЦР.

19) После 21 циклов достаньте из амплификатора еще одну пробирку, а последнюю пробирку подвергните еще 3 циклам ПЦР.

20) Проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза (1.2% агароза, 4 мкл продукта ПЦР на дорожку) параллельно с маркером длин ДНК (1 kb DNA ladder, 50 нг на дорожку).

21) Сравните результат гель-электрофореза приведенным на рис. Определите оптимальное количество циклов ПЦР для каждого экспериментального образца, исходя из следующих рекомендаций: Избыточное число циклов ПЦР приводит к возникновению неспецифических продуктов, что крайне нежелательно для выполнения дальнейших процедур.

- Отсутствие изменений в концентрации продукта ПЦР при добавлении циклов указывает на то, что реакция «вышла на плато». Оптимальное для амплификации образца число циклов должно быть на 1-2 цикла меньше, чем то, которое необходимо для выхода реакции на плато.

- При оптимальном количестве циклов ПЦР, продукт реакции при визуализации на агарозном геле обычно имеет следующие характеристики:

а) Виден шмер умеренной интенсивности в области 0,25-3 т.п.о. с максимумом плотности 0,5-2 т.п.о. Интенсивность шмера (относительно интенсивности маркера) должна примерно соответствовать той, которую имеет образец кДНК, нанесенный на дорожку 2.

Г Если интенсивность шмера не меняется с увеличением количества циклов ПЦР и смещена к лунке, значит, образец кДНК подвергся избыточной амплификации. Если интенсивность шмера существенно ниже, значит, количество циклов ПЦР было недостаточным для амплификации образца.

б) наличие нескольких ярких полос, соответствующих высокопредставленным транскриптам. «Размывание» таких полос свидетельствует об избыточном количестве циклов ПЦР.

22) Сохраните продукт ПЦР с оптимальным числом циклов. Продукт ПЦР можно хранить при -20°C в течение, по меньшей мере, шести месяцев.

Итоги выполнения лабораторной работы 2

Методом синтеза кДНК со сменой матрицы приготовлена первая цепь опытного образца и одного или двух контрольных. Выполнена амплификация образцов двухцепочечной кДНК, подобрано необходимое количество циклов для каждого образца. Пробирки подписаны и помещены на хранение при -20°C. Образцы амплифицированной кДНК проанализированы методом гельэлектрофореза. Проведено сравнение

качества препаратов, полученных разными исследователями или из разных образцов РНК. Результаты запротоколированы в лабораторном журнале.

5.7. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3.. АМПЛИФИКАЦИЯ 3'-КОНЦЕВОГО УЧАСТКА ГЕНА ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА ИЗ КОРАЛЛОВОГО ПОЛИПА CLAVULARIA (3'-RACE).

Материалы и оборудование для выполнения лабораторной работы 3.

- Набор для практикума Clavularia FP cloning set (Евроген, MB001)
- Набор для ПЦР Encyclo Plus PCR kit (Евроген, PK101)
- Набор праймеров Mint RACE primer set (Евроген, SK004)
- Минеральное масло для молекулярно-биологических работ или аптечное вазелиновое масло (если амплификатор не имеет нагревающейся крышки)
- Реактивы и оборудование для гель-электрофореза (Приложение 1)
- Амплификатор
- Настольная центрифуга
- Пробирки для ПЦР (0,5 или 0,2 мл)
- Штатив для пробирок
- Стерильные наконечники для пипеток
- Автоматические пипетки на 10-20, 200 и 1000 мкл
- Перчатки

Ход работы

В первом раунде используют праймеры Dir1-NGH и Step-out mix 1.

1) Разведите в 10 раз амплифицированную кДНК, полученную в работе 2 (п. 22), стерильной водой. Для этого в чистой пробирке смешайте 4 мкл образца кДНК и 36 мкл стерильной воды. Раствор перемешайте встряхиванием, сбросьте капли со стенок пробирки центрифугированием. Если образец кДНК хранился перед этим при -20°C , разморозьте его и прогрейте 2 мин при $+65^{\circ}\text{C}$ для дезагрегации ДНК. Перемешайте содержимое пробирки перед отбором аликвоты.

2) Подготовьте реакционную смесь для амплификации, смешав компоненты реакции в следующем порядке:

38 мкл Стерильная вода

5 мкл 10X Буфер для ПЦР (Encyclo PCR buffer)

1 мкл 50X Смесь dNTP (10 mM каждой)

1 мкл Праймер для ПЦР Dir1-NGH (10 мкМ)

2 мкл 25X Смесь праймеров Step-out mix 1

1 мкл 50X Полимераза Encyclo

48 мкл Суммарный объем

3) Разделите реакционную смесь на две пробирки (по 24 мкл). Одну пометьте как экспериментальную, вторую как контрольную.

4) Добавьте в «экспериментальную пробирку» 1 мкл разбавленной в 10 раз кДНК. Разведенную кДНК сохраните при -20°C ; она потребуется при проведении задачи по амплификации полноразмерной кДНК (работа 4).

5) Добавьте в «контрольную пробирку» 1мкл стерильной воды для ПЦР. Контрольная амплификация без кДНК матрицы позволяет оценить уровень контаминации реактивов посторонней ДНК матрицей и избежать в дальнейшем клонирования неспецифических продуктов. В случае реального эксперимента рекомендуется также постановка дополнительных контрольных реакций для проверки специфичности праймеров. Эти реакции позволяют отличить специфический продукт ПЦР от продуктов фоновой амплификации с одного из праймеров. Однако в рамках практикума постановка всех контрольных реакций необязательна.

6) Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку. Закройте пробирки, поместите их в амплификатор.

7) Осуществите амплификацию, используя следующую программу для ПЦР: Предварительная денатурация 95°C 1 мин Циклы ПЦР 24-26 циклов 95°C 15 сек 60°C* 20 сек 72°C 1 мин

* Температура соответствует температуре отжига ген-специфического праймера. Для приблизительного подсчета температуры отжига праймера можно воспользоваться формулой $T=4(G+C)+2(A+T)+5$.

8) По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза в 1.5% агарозе (4 мкл продукта ПЦР на дорожку параллельно с 50 нг маркера длин ДНК).

9) Сравните результат ПЦР с тем, что показано на рис.10. Длина специфического фрагмента должна быть около 850 п.о., однако он может быть неразличим на фоне неспецифического продукта (шмера). Если по данным электрофореза продукты ПЦР имеют низкую концентрацию в «экспериментальной пробирке», верните пробирки в амплификатор и добавьте 2-4 цикла ПЦР. При полном отсутствии продуктов реакции добавьте 6 циклов ПЦР.

10) Пробирку с продуктом ПЦР подпишите и сохраните на -20°C.

11) Разведите в 10 раз стерильной водой аликвоту амплифицированной кДНК, полученную на предыдущей стадии (см п.10). Как приготовить разведение описано в п. 1 данного протокола.

12) Подготовьте реакционную смесь для ПЦР:

38 мкл Стерильная вода

5 мкл 10X Буфер для ПЦР (Encyclo PCR buffer)

1 мкл 50X Смесь dNTP (10 mM каждой)

1 мкл Праймер для ПЦР Dir2-NFP (10 мкМ)

2 мкл 25X Смесь праймеров Step-out mix 2

2 мкл кДНК, разбавленная в 10 раз (со стадии 11)

1 мкл 50X Полимераза Encyclo

50 мкл Суммарный объем

1 Реакционную смесь с учетом контрольных реакций можно приготовить, как описано в Приложении 4.

13) Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в пробирки и поместите их в амплификатор.

14) Осуществите амплификацию, используя следующую программу для

ПЦР:

Предварительная денатурация 95°C 1 мин Циклы ПЦР 14-17 циклов 95°C 15 сек 60°C 20 сек 72°C 1 мин

15) По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза на 1,5% агарозе (4 мкл продукта ПЦР на дорожку параллельно с 50 нг маркера длин ДНК).

16) Сравните результат ПЦР с тем, что показан на рис. Специфический продукт выглядит как одна или две полосы на уровне 550-570 п.о. Возможна небольшая фоновая амплификация в виде неспецифичных полос или шмера. Если продукт ПЦР имеет низкую концентрацию, верните пробирку в амплификатор и добавьте 2-4 цикла ПЦР. Если продукт ПЦР не гомогенен (как на рис. 11), переходите к третьему раунду 3'-RACE. Если продукт ПЦР выглядит гомогенным, проводить третий раунд нет необходимости – переходите к выполнению п. 24 протокола.

17) Пробирку с продуктом ПЦР подпишите и сохраните на –20°C.

18) Разведите в 10 раз стерильной водой аликвоту амплифицированной кДНК, полученную на стадии 17. Как приготовить разведение описано в п. 1 данного протокола.

19) Подготовьте реакционную смесь для ПЦР:

38 мкл Стерильная вода

5 мкл 10X Буфер для ПЦР (Encyclo PCR buffer)

1 мкл 50X Смесь dNTP (10 mM каждой)

1 мкл Праймер для ПЦР Dir3-WEP (10 мкМ)

2 мкл 25X Смесь праймеров Step-out mix 3

2 мкл кДНК, разбавленная в 10 раз (со стадии 17)

1 мкл 50X Полимераза Encyclo

50 мкл Суммарный объем

20) Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в пробирки и поместите их в амплификатор.

21) Осуществите амплификацию, используя следующую программу для ПЦР:

Предварительная денатурация 95°C 1 мин Циклы ПЦР 16-18 циклов 95°C 15 сек 52°C 20 сек 72°C 1 мин

22) По окончании амплификации проведите анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза на 1,5% агарозе (4 мкл продукта ПЦР на дорожку параллельно с 50 нг маркера длин ДНК).

23) Сравните результат ПЦР с тем, что показан на рис. Специфический продукт выглядит как полоса на уровне 530 п.о. Фоновая амплификация отсутствует. Если по данным электрофореза продукт имеет низкую концентрацию, верните пробирку в амплификатор и добавьте 2-4 цикла ПЦР.

24) Проведите сравнительный анализ на гель-электрофорезе продуктов ПЦР после первого, второго и третьего раундов 3'-RACE для оценки степени обогащения специфическим продуктом и изменением его длины в ходе nested/step-out ПЦР. Для сравнения воспользуйтесь результатом электрофореза, показанным на рис.

25) Проведите обсуждение этапов работы, не включенных в лабораторную часть практикума, – клонирование и секвенирование продуктов 3'-RACE, анализ полученных последовательностей нуклеотидов, дизайн праймеров для 5'-RACE, собственно 5'-RACE и дизайн праймеров для амплификации полной кодирующей последовательности.

Итоги выполнения лабораторной работы 3

В процессе двух или трех раундов 3'-RACE получен электрофоретически гомогенный продукт ПЦР, соответствующий 3'-концу мРНК. Продукты всех раундов 3'-RACE проанализированы методом гель-электрофореза. Результаты запротоколированы в лабораторном журнале.

5.8. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4. АМПЛИФИКАЦИЯ ПОЛНОЙ КОДИРУЮЩЕЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА И ЕГО НАПРАВЛЕННОЕ КЛОНИРОВАНИЕ В БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ЭКСПРЕССИОННЫЙ ВЕКТОР.

Материалы и оборудование для выполнения лабораторной работы 4.

- Набор для практикума *Clavularia FP cloning set* (Евроген, MB001)
- Набор для ПЦР *Encyclo Plus PCR kit* (Евроген, PK101)
- Набор для очистки ДНК из геля и реакционных смесей (Евроген, BC022)
- Набор для клонирования *Quick-TA kit* (Евроген, TAK02)
- Набор для выделения плазмидной ДНК (Евроген, BC021)
- Минеральное масло для молекулярно-биологических работ или аптечное вазелиновое масло (если амплификатор не имеет нагреваемой крышки)
- Компетентные клетки для химической трансформации (*XL1-Blue, DH5 α* или другие *recA(-)* штаммы любого производителя, например, Евроген, CC001) Компетентные клетки могут быть приготовлены согласно стандартным протоколам (например, [1]).
- Ферменты рестрикции *BamHI* и *HindIII* с соответствующим реакционными растворами (например, 10X буфер *W* (*Sibenzime*) или 10X буфер *2* (*NEB*), 10X раствор *BCA* 1 мг/мл)
- Среда для культивирования бактерий *LB*, жидкая и агаризованная на чашках Петри
- Ампициллин
- Реактивы и оборудование для гель-электрофореза
- Реактивы и оборудование для ПЦР-скрининга
- Шпатель микробиологический (Дригальского)
- Амплификатор
- Вортекс (желательно)
- Настольная центрифуга
- Водяной термостат
- Ледяная баня
- Холодильник (+16°C)
- Термостат для чашек Петри (+37°C)

- Термостатическая качалка (+37°C)
 - Спиртовая или газовая горелка
 - Трансиллюминатор, длина волны 295-365 нм
- Дополнительно желательно иметь оборудование для детекции флуоресценции: флуоресцентный бинокляр или микроскоп с фильтром FITC.
- Пробирки для ПЦР (0,5 или 0,2 мл)
 - Штатив для пробирок
 - Стерильные наконечники для пипеток
 - Стерильные культуральные пробирки (10-15 мл), стеклянные или полипропиленовые
 - Автоматические пипетки на 10-20, 200 и 1000 мкл
 - Перчатки

Ход работы

В качестве стартового материала может быть использована кДНК из *Clavularia*, полученная при выполнении работы 2, или контрольная кДНК из набора *Clavularia FP cloning set*.

Аmplификация

1) Разморозьте разведенную кДНК, приготовленную во время выполнения работы 3 или разведите аликвоту контрольной кДНК из набора *Clavularia FP cloning set* в 10 раз стерильной водой. Процедура разведения кДНК описана в п. 1 (работа 3).

2) Подготовьте реакционную смесь для ПЦР:

39 мкл Стерильная вода

5 мкл 10X Буфер для ПЦР (*Encyclo PCR buffer*)

1 мкл 50X Смесь dNTP (10 mM каждой)

1 мкл Праймер 5'Dir-BamHI (10 мкМ)

1 мкл Праймер 3'Rev-HindIII (10 мкМ)

2 мкл кДНК, разбавленная в 10 раз (со стадии 1)

1 мкл 50X Полимераза *Encyclo*

50 мкл Суммарный объем

3) Если амплификатор не имеет нагревающейся крышки, добавьте каплю минерального масла в пробирки и поместите их в амплификатор.

4) Осуществите амплификацию, используя следующую программу:

Предварительная денатурация 95°C 1 мин Циклы ПЦР 25-27 циклов 95°C 15 сек 60°C 20 сек 72°C 1 мин

5) Проведите анализ продуктов ПЦР методом гель-электрофореза (4мкл продукта ПЦР на дорожку параллельно с 50нг маркера длин ДНК). Специфический продукт выглядит как полоса около 800 п.о.

Рестрикция

6) Продукт ПЦР. Элюируйте ДНК 40 мкл буфера для элюции (5мМТрис-HCl, pH8,0). Методом гель-электрофореза проанализируйте 2мкл элюата, чтобы убедиться, что не произошло существенной потери ДНК.

7) Подготовьте реакционную смесь для рестрикции ПЦР-фрагмента, смешав

реагенты в указанном порядке:

28мкл Очищенный ПЦР-фрагмент (15-20нг/мкл)

(ДНК состава 6)

4мкл 10Xбуфердлярестрикции

(BufferW, СибэнзимилиBuffer2, NEB)

4мкл 10X раствор БСА (1мг/мл), до конечной концентрации 100мкг/мл

2мкл Эндонуклеаза рестрикции BamHI (Сибэнзимили NEB, соответственно)

2мкл Эндонуклеаза рестрикции HindIII (Сибэнзимили NEB, соответственно)

40мкл Суммарный объем

Если Вы используете рестриктазы других производителей, выберите буфер для одновременной рестрикции двумя рестриктазами согласно рекомендациям производителя.

8) Подготовьте реакционную смесь для рестрикции вектора для клонирования pQE-30 (из набора Clavularia FP cloning set). Для этого смешайте реагенты в указанном порядке:

18 мкл Стерильная вода

10 мкл Вектор pQE-30 (100 нг/мкл)

4 мкл 10X буфер для рестрикции (BufferW,

Сибэнзим или Buffer2, NEB)

4 мкл 10X раствор БСА (1 мг/мл), до конечной концентрации 100 мкг/мл

2 мкл Эндонуклеаза рестрикции BamHI (Сибэнзим или NEB, соответственно)

2 мкл Эндонуклеаза рестрикции HindIII (Сибэнзим или NEB, соответственно)

40 мкл Суммарный объем

Если Вы используете рестриктазы других производителей, выберите буфер для одновременной рестрикции двумя рестриктазами согласно рекомендациям производителя.

9) Инкубируйте смеси при +37°C. Для рестрикции ПЦР-фрагмента время инкубации – 1 час. Время инкубации вектора можно увеличить до 1,5-2 часов.

10) Через 1 час инкубации очистите ПЦР-фрагмент на колонке согласно инструкции производителя набора для очистки. Для элюции с колонки используйте 20 мкл буфера для элюции (5мМТрис-НСl, рН 8,0). Пробирку с очищенным ДНК-фрагментом поместите в лед.

Для элюции фрагментов ДНК после рестрикции нельзя использовать воду, так как в ней может произойти частичная денатурация концов молекул ДНК.

11) Приготовьте 1,2% агарозный гель, желательно с широкими (7-10 мм) лунками (для нанесения проб по 10-15 мкл) для очистки вектора от продуктов неполной рестрикции.

Очистка вектора на геле позволяет существенно снизить количество колоний, лишенных вставки, при трансформации.

12) Нанесите в несколько соседних лунок (в 3 или 4) весь объем реакции рестрикции вектора. Для сравнения электрофоретической подвижности линейаризованного и цельного вектора нанесите рядом 2 мкл исходной плазмиды.

13) Проведите электрофорез, используя следующие параметры: не более 8-10 V на см пробега (от электрода до электрода), стабилизация по напряжению.

14) Поместите гель в трансиллюминатор, не снимая с подложки. Аккуратно и быстро чистым скальпелем (или тонким носиком для пипетки) отметьте под УФ-лампой фрагмент геля, содержащий наиболее интенсивно окрашенную полосу, представляющую собой линейризованную плазмидную ДНК (рис. 15).

В трансиллюминаторе лучше использовать «мягкий» режим излучения – при 365 нм. Время экспозиции должно быть сокращено до минимума (5-10 сек), так как под воздействием УФ света происходит апуринизация ДНК, что снижает эффективность клонирования.

15) Выньте гель из трансиллюминатора, вырежьте отмеченный фрагмент скальпелем и перенесите в чистую пробирку. Определите вес вырезанного фрагмента (взвесив пустую пробирку и пробирку с гелем).

16) После вырезания полосы рассмотрите гель под трансиллюминатором, чтобы убедиться, что большая часть линейризованной плазмиды была вырезана.

17) Очистите вектор на колонке для очистки фрагментов ДНК из агарозного геля, следуя инструкции производителя. Для элюции с колонки используйте 20 мкл буфера для элюции (5мМ Трис-НСl, рН 8,0).

18) Проанализируйте полученные препараты ДНК с помощью гельэлектрофореза в 1.2% агарозе. Нанесите рядом по 1 и 2мкл очищенной ДНК вектора и вставки. По интенсивности полос оцените их концентрацию. Для этого нанесите параллельно с опытными образцами маркер длин ДНК (25, 50 и 100 нг суммарного препарата) и визуально сравните интенсивность полос сразу после вхождения образцов в гель (разгон пробы не более 0,3-0,5 см, пока фрагменты маркера длин не успели разделиться).

Лигирование

19) Исходя из оценки концентрации ДНК вектора и вставки, рассчитайте объемы добавляемых компонентов в реакцию лигирования.

Количество добавляемых ДНК вектора и вставки в данной задаче должно быть в пределах 15-25 нг на реакцию.

Приготовьте смесь для лигирования:

X мкл Стерильная вода

1 мкл 10X буфер для лигазы

Y мкл Линейризованная плазида (вектор) (20-25 нг)

Z мкл ДНК вставки (20-25 нг, допустимо до 50 нг)

1 мкл Quick-TA T4 ДНК лигаза

10 мкл Суммарный объем

20) Инкубируйте смесь при +16°C в течение ночи. Для хранения реакционную смесь следует заморозить, инактивация ферментов не требуется.

Трансформация

21) Разморозьте во льду фасовку компетентных клеток и аккуратно перемешайте встряхиванием.

22) Приготовьте две аликвоты свежеразмороженных компетентных клеток (по 70-100 мкл) и добавьте в одну 5 мкл (1/2 объема) реакционной лигазной смеси (опытная трансформация), в другую – 1 мкл контрольной плазмиды с геном флуоресцентного белка из набора Clavularia FP cloning set (10 нг/мкл). Перемешайте содержимое пробирок осторожным встряхиванием.

23) Инкубируйте пробирки 30 мин во льду, после этого поместите их на 1 мин в водяной термостат с температурой +42°C (хит-шок, heat-shock).

Сухим термостатом для хит-шока пользоваться нельзя из-за низкой теплопроводности воздуха.

24) Перенесите пробирки в лед на 5-10 мин.

25) Добавьте по 300 мкл теплой среды LB без антибиотика, инкубируйте 45 мин в сухом термостате при +37°C для подрачивания бактерий (можно с покачиванием).

26) Рассейте клетки на чашки Петри с 1,5% LB-агаром с ампициллином (100 мкг/мл). Равномерно распределите культуру по поверхности агара и тщательно разотрите микробиологическим шпателем. Открытые чашки Петри подсушите 5-10 мин рядом с пламенем горелки, после чего поставьте на 18-20 ч (на ночь) в термостат на +37°C. В термостате чашки Петри следует размещать дном кверху, чтобы конденсат не капал на поверхность агара и не размывал колонии.

Отбор клонов

27) Для выявления рекомбинантных колоний осуществите скрининг колоний методом ПЦР.

28) Поместите чашки в холодильник на +4°C (разместив вверх дном) и оставьте на 2-3 дня. Через 18-20 ч после трансформации флуоресцентный белок в рекомбинантных клонах визуально не детектируется, так как его полное созревание требует длительного времени (2-3 суток при +4°C).

29) Через 2-3 суток проведите отбор клонов по фенотипу. Для этого сравните флуоресценцию колоний на контрольной и опытной чашках. Найдите на опытной чашке колонии, экспрессирующие флуоресцентный белок. Флуоресценцию можно детектировать под флуоресцентным микроскопом или бинокляром с использованием фильтра FITC, с помощью УФ-трансиллюминатора (длина волны 295-3675 нм) или любой УФ-лампы. Если отбор клонов производится на трансиллюминаторе, то следует минимизировать время экспозиции под ультрафиолетом. Все колонии имеют желтоватую автофлуоресценцию, и только рекомбинантные клоны отличаются характерным зеленым оттенком, свойственным GFP-подобным белкам.

30) Сравните результаты ПЦР-скрининга с результатами, полученными при отборе клонов по фенотипу. На обратной стороне чашки Петри отметьте цветным маркером 1-2 колонии, экспрессирующие флуоресцентный белок и содержащие целевую вставку.

31) Чистым носиком соскребите колонию с чашки, ресуспендируйте в 300 мкл жидкой среды LB.

32) Перенесите каплю суспензии (5-15 мкл) в пробирку с 5 мл жидкой селективной

среды, инкубируйте пробирку на качалке (200-250об/мин) при +37°C в течение ночи для наращивания культуры.

33) Пробирку с жидкой культурой снимите с качалки, часть жидкой культуры перелейте в 1,5 или 2 мл пробирку и центрифугируйте на настольной центрифуге 5 мин при 4-5 тыс. об/мин.

34) Отбросьте супернатант. К оставшимся на дне пробирки бактериальным клеткам добавьте вторую порцию жидкой культуры и повторите центрифугирование. Если запланировано выполнение задачи 5, сохраните остаток культуры и используйте его для наращивания биомассы с целью выделения рекомбинантного белка.

35) Из полученного бактериального осадка выделите плазмиду, пользуясь набором для выделения плазмидной ДНК и инструкцией производителя.

36) Проведите анализ препарата плазмидной ДНК с помощью гелеэлектрофореза (1.5% агароза, 2 мкл препарата плазмидной ДНК параллельно с 50 мкг маркера длин ДНК).

При решении экспериментальной задачи, для подтверждения результатов клонирования выделенную плазмидную ДНК секвенируют и проверяют правильность полученной нуклеотидной последовательности вставки. Эти этапы исключены из лабораторной работы практикума для экономии времени.

Итоги выполнения лабораторной работы 4:

Проведено направленное клонирование гена флуоресцентного белка из коралла в экспрессионный вектор. Отобраны рекомбинантные клоны. Получен и проанализирован препарат плазмидной ДНК из рекомбинантного клона (пробирка подписана и помещена на хранение при -20°C). Результаты запротоколированы в лабораторном журнале.

5.9. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 5. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА В БАКТЕРИЯХ E.COLI; ВИЗУАЛИЗАЦИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА.

Материалы и оборудование для выполнения лабораторной работы 5.

- Набор для практикума Clavularia FP cloning set (Евроген, MB001) (если не выполнялась работа 4)
- Среда для культивирования бактерий LB , жидкая и агаризованная на чашках Петри
- Ампициллин
- Буфер для озвучивания (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,5-8; 300 мМ NaCl)
- Хелатный сорбент для очистки белков с His-мишенью (например, Protino Ni-IDA или Ni-ТЕД (Macherey-Nagel), NiNTA-agarose (Qiagen))
- Раствор ЭДТА для элюции белка, 100 мМ, pH 8,0
- Оборудование для детекции флуоресценции (трансиллюминатор (295 нм) или любая УФ-лампа)
- Вортекс (желательно)

- Термостат для чашек Петри (+37°C)
- Настольная центрифуга
- Ультразвуковой гомогенизатор
- Пробирки (1,5 или 0,2 мл)
- Штатив для пробирок
- Стерильные наконечники для пипеток
- Стерильные культуральные пробирки (10-15 мл), стеклянные или полипропиленовые
- Автоматические пипетки на 10-20, 200 и 1000 мкл
- Перчатки

Ход работы

I Если данная задача выполняется без выполнения задачи 4, предварительно проведите трансформацию бактерий контрольной плазмидой из набора для практикума *Clavularia FP cloning set* как описано в п.п. 21 –

32 (работа 4).

1) Пересейте остаток суспензии (п. 34 раздела IV.5) на отдельные чашки Петри. Равномерно распределите весь объем суспензии по поверхности агара и тщательно разотрите шпателем.

2) Открытые чашки Петри подсушите в течение 3-5 мин рядом с пламенем горелки, после чего поставьте вверх дном в термостат на +37°C на ночь.

3) Через 18-20 ч перенесите чашки в холодильник на +4°C (разместив вверх дном) и оставьте на 2-3 дня для созревания белка.

4) Достаньте чашки из холодильника. Убедитесь, что выросшая биомасса имеет флуоресценцию. Для этого поместите чашку под источник УФ на 20-30 сек.

Наличие флуоресценции в биомассе является доказательством присутствия рекомбинантного белка.

5) Соскребите бактерии с поверхности агара одноразовым пластиковым ножом или расплюснутым носиком для пипетки.

6) Ресуспендируйте биомассу в 1 мл буфера для озвучивания и поместите пробирку в лед.

7) Разружьте клетки с применением ультразвука. Подберите такой режим озвучивания, чтобы не образовывалась пена (например, 3-5 импульсов средней мощности по 20-30 сек с перерывами по 30-40 сек, во время озвучивания пробирку охлаждать во льду). Вместо обработки ультразвуком можно провести гипотонический шок: ресуспендировать клетки в 10 мМ Трис-НСI, рН 7-8, и подвергнуть 5-10 циклам замораживания-размораживания). Эффективность выделения белка при этом существенно снижается.

8) Клеточный дебрис осадите центрифугированием в течение 20 мин на максимальной скорости на настольной центрифуге. Аккуратно отберите надосадочную жидкость и перенесите ее в новую пробирку.

9) Проведите очистку мини-препарата рекомбинантного белка с помощью хелатного сорбента согласно инструкции производителя. Элюируйте белок

50 мкл 100 мМ раствора ЭДТА. Препарат белка можно хранить при +4°C в течение недели и при -20°C длительное время.

10) Поместите пробирку с белковым препаратом под УФ-транслюминатор или УФ-лампу для обнаружения флуоресценции. В качестве дополнительных задач рекомендуется снять спектры флуоресценции белка на спектрофлуориметре и провести анализ денатурированного и неденатурированного белка с помощью гельэлектрофореза в ПААГ.

Итоги выполнения лабораторной работы 5:

Продемонстрировано наличие флуоресценции в биомассе. Выделен рекомбинантный белок. Результаты запротоколированы в лабораторном журнале.

6. ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ЗАЧЕТУ

1. Клетка как объект научных исследований. История культивирования.
2. Введение клеток в культуру, их происхождение. Характеристика клеток культивируемых *in vitro*. Преимущества клеток культивируемых *in vitro*
3. Типы культивируемых клеток.
4. Среды для культивирования. Требования, предъявляемые к средам и условиям культивирования клеток животных и человека.
5. Факторы, влияющие на скорость деления клеток в клеточной культуре. Основные системы культивирования клеток.
6. Влияние окружающей среды на культуру клеток. Клеточная адгезия. Клеточная пролиферация. Дифференцировка.
7. Ламинарное оборудование. Инкубаторы.
8. Асептика. Объекты асептического окружения. Стерилизация. Ламинарный поток.
9. Общая безопасность: оператор, оборудование, стеклянная посуда, химическая токсичность.
10. Биологическая опасность.
11. Контаминация. Методы определения контаминации.
12. Посуда и субстраты для культивирования клеток.
13. Подготовительные работы и стерилизация.
14. Характеристика клеток: морфология, хромосомный состав, содержание ДНК и РНК.
15. Клеточный цикл.
16. Криоконсервация клеточных культур.
17. Подсчет клеток. Оценка выживаемости.
18. Техника ведения культуры клеток.
19. Смена среды в монослойной культуре.
20. Мытье и стерилизация стеклянной посуды.
21. Ферменты и ферментативный катализ. Правила работы с ферментами.
22. Взвешивание, правила взвешивания, аналитическое взвешивание.

23. рН-метр (что такое рН, правила работы с рН-метром, хранение электрода).
24. Термошейкер, вортекс (правила работы).
25. Меры безопасности в лаборатории (средства индивидуальной защиты, ультрафиолет, опасные, горючие, вредные вещества).
26. Центрифугирование. Основные формулы (центробежное ускорение (G), ОЦУ, время осаждения (t)). Классификация центрифуг.
27. Лабораторная посуда. Мытье и стерилизация лабораторной посуды.
28. Правила работы с общими реактивами.
29. Расчет растворов. Моль, процентное содержание.
30. Растворение. Сольватация. Таблица растворимости.
31. Способы дополнительной очистки растворов.
32. Лабораторная посуда. Лабораторный пластик.
33. Автоклавирование. Работа с автоклавом. Техника безопасности.
34. Потенциометрия, водородный показатель. Щелочной и кислотный рН.
35. Виды микроскопов. Современные технологии микроскопии.
36. Работа с микроскопом. Световой микроскоп. Инвертированный микроскоп.
37. Приготовление растворов. Расчет растворов.
38. Моль, молярный вес, процентное содержание, молекулярный вес.
39. Способы дополнительной очистки растворов.
40. Буферные растворы. Приготовление буферных растворов
41. История развития микроскопии в биологии. Виды микроскопии
42. Сущность флуоресцентной микроскопии: физические основы, характеристика поглощения и эмиссии.
43. Функциональные особенности устройства флуоресцентного микроскопа.
44. Методы фиксации биологических образцов. Фиксаторы. Общая характеристика и классификация биологических красителей.
45. Способы детекции сигнала при флуоресцентной микроскопии: флюорофоры, флюоресцентные метки и зонды. Характеристика и область использования флуоресцентных красителей.
46. Методы выделения нуклеиновых кислот.
47. Выделение ДНК и РНК из клеток клеточных линий.
48. Техника проведения электрофореза нуклеиновых кислот.
49. Горизонтальный и вертикальный электрофорез.
50. Электрофорез в агарозном геле. Электрофорез в полиакриламидном геле.
51. Общая характеристика метода полимеразной цепной реакции.
52. Виды ДНК-полимераз. dNTP. Праймеры для ПЦР. Буферный раствор. Приготовление реакционной смеси.
53. Флуоресцентный анализ. Виды флуориметров.
54. Работа с прибором Qubit. Измерение концентрации ДНК и РНК в растворах.

55. Автоматический синтезатор ДНК и РНК. Синтез олигонуклеотидов.
56. Применение синтезированных ДНК и РНК.
57. Геномика. Протеомика. Метагеномика. Биоинформатика.
58. Классические методы секвенирования.
59. Новые методы секвенирования.
60. Новейшие методы секвенирования.

7. ТЕСТЫ (ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ) ДЛЯ ТЕКУЩЕГО КОНТРОЛЯ И КОНТРОЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ОБУЧАЮЩИХСЯ

1. К средствам индивидуальной защиты в научно-исследовательской и диагностической лаборатории относят:

1. халат
2. перчатки, шапочка
3. халат, перчатки, защитные очки
4. вытяжной шкаф

2. Последовательность действий при попадании на кожу рук щелочи:

1. смыть водой, нейтрализовать буфером для нейтрализации
2. смыть водой, промыть кожу с мылом
3. промыть с мылом, обработать перекисью водорода
4. промыть с мылом, обработать йодом

3. Последовательность действий при попадании на кожу рук кислоты:

- 1) смыть водой, нейтрализовать буфером для нейтрализации
- 2) смыть водой, промыть кожу с мылом
- 3) промыть с мылом, обработать перекисью водорода
- 4) промыть с мылом, обработать йодом

4. Средства защиты при работе с трансиллюминатором:

1. халат, очки
2. перчатки, закрытая обувь
3. халат, перчатки
4. перчатки, защитный экран или маска

5. Чем опасны UV-лампы?

1. повреждением глаз, ожогами на коже
2. покраснением кожных покровов
3. вдыханием ядовитого газа
4. сильным свечением

6. Какие из перечисленных веществ являются горючими?

1. органические растворители
2. кислота, щелочь
3. эфир, спирт, газ
4. ферменты, нуклеиновые кислоты, нуклеотиды

7. Какой тип пластика не выдерживает автоклавирование?

1. Полипропилен
2. Полиэтилен
3. Полистерол
4. Полистерен

8. Сколько типов наконечников для автоматических пипеток используют в исследовательской лаборатории?

- 1)1
- 2)2
- 3)3
- 4)4

9. Порядок подготовки лабораторной посуды к стерильной работе?

- 1) мытье с моющим средством, вымачивание в дистиллированной воде, автоклавирование
- 2) автоклавирование, мытье с моющим средством, вымачивание в дистиллированной воде
- 3) вымачивание в дистиллированной воде, мытье с моющим средством, автоклавирование
- 4) мытье с моющим средством, автоклавирование, вымачивание в дистиллированной воде

10. Оптимальные давление и температура при автоклавировании?

- 1) 2 атм, 134°C
- 2) 3 атм, 135 °C
- 3) 4 атм, 140 °C
- 4) 2 атм, 200 °C

11. Влияет ли температура на жидкость при наборе автоматической пипеткой?

- 1) да, если температура жидкости и окружающей среды отличаются
- 2) да, если температура жидкости выше 60 °C
- 3) да, если жидкость холодная
- 4) не влияет

12. При какой температуре хранятся ферменты?

- 1) при комнатной
- 2) при 37 °C
- 3) при 4 °C

4)при -20-40 °С

13.Сколько классов ферментов выделяют?

1)10

2)4

3)6

4)5

14.Каким прибором измеряют водородный показатель?

1)Термошейкер

2)Вортекс

3)рН-метр

4)Микроцентрифуга

15.С помощью какого прибора осуществляют быстрое перемешивание?

1)Термошейкер

2)Вортекс

3)рН-метр

4)Микроцентрифуга

16.С помощью какого прибора осуществляют перемешивание и подогрев содержимого пробирок?

1)Термошейкер

2)Вортекс

3)рН-метр

4)Микроцентрифуга

17.Центробежное ускорение рассчитывается по формуле:

1) $G=r*W$

2) $G=r^2*W$

3) $G=W^2*r$

4) $W=G*r$

18.В каких единицах выражают центробежное ускорение?

1)См

2)Мм

3)g

4)Мм/с²

19.При одинаковых плотностях частицы большего размера оседают , чем мелкие.

1)Медленнее

2)Быстрее

20.Чем больше вязкость среды, тем оседают частицы.

- 1) Медленнее
- 2) Быстрее

21. Чему пропорциональна скорость оседания частиц?

- 1) Квадрату числа оборотов ротора
- 2) Количеству жидкости в пробирке
- 3) Количеству времени центрифугирования

22. Какое центрифугирование основано на различиях в скорости седиментации частиц, отличающихся друг от друга размерами и плотностью?

- 1) Равновесное
- 2) Изопикническое
- 3) Зонально-скоростное
- 4) Дифференциальное

23. Какое центрифугирование заключается в наслаивании исследуемого образца на поверхность раствора с непрерывным градиентом плотности?

- 1) Равновесное
- 2) Изопикническое
- 3) Зонально-скоростное
- 4) Дифференциальное

24. Какие вещества используют для создания градиента плотности?

- 1) Жиры
- 2) Белки
- 3) Нуклеиновые кислоты
- 4) Соли тяжелых металлов

25. Какую скорость могут развивать аналитические центрифуги?

- 1) До 70000 об/мин
- 2) До 7000 об/мин
- 3) До 15000 об/мин
- 4) До 100000 об/мин

26. Что является основными элементами оптической системы микроскопа?

- 1) объект, предметный столик
- 2) конденсор, окуляр
- 3) зеркало, объектив
- 4) окуляр, объектив

27. Чему равно увеличение оптического микроскопа без дополнительных линз между объективом и окуляром?

- 1) произведению их увеличений
- 2) сумме их увеличений
- 3) увеличению объектива

4)увеличению окуляра

28. Чем настраивают резкость на световом микроскопе?

- 1)микровинтом
- 2)макрвинтом
- 3)макрвинтом, микровинтом
- 4)диафрагмой

29. У какого микроскопа объектив расположен под наблюдаемым предметом?

- 1)Инвертированный
- 2)Флуоресцентный
- 3)Оптический
- 4)Световой

30. Какое оборудование используют для обеспечения стерильных условий?

- 1)Инкубатор
- 2)Ламинарный бокс
- 3)Вытяжной шкаф
- 4)Амплификатор

31. В каких единицах измеряется количество вещества?

- 1)Моль
- 2)Проценты
- 3)Мл
- 4)Гр

32. В каких единицах измеряется отношение количества данного вещества к количеству всего раствора?

- 1)Моль
- 2)Проценты
- 3)Мл
- 4)Гр

33. При каком способе очистки растворов используются колонки, ячейки и шприцы?

- 1)Очистка углем
- 2)Фильтрация
- 3)Автоклавирование
- 4)Деионизация

34. При каком способе очистки растворов используют высокую температуру и давление?

- 1)Очистка углем
- 2)Фильтрация
- 3)Автоклавирование

4) Деионизация

35. При каком способе очистки растворов удаляются ионы?

- 1) Очистка углем
- 2) Фильтрация
- 3) Автоклавирование
- 4) Деионизация

36. С помощью какого вещества проводят очистку спирта?

- 1) Перманганат калия
- 2) Перманганат железа
- 3) Перманганат натрия
- 4) Перманганат кальция

37. Какая клеточная линия относится к суспензионным?

- 1) К-562
- 2) НСТ-116
- 3) СНО-К1

38. Какая клеточная линия относится к адгезивным?

- 1) К-562
- 2) НСТ-116
- 3) НЛ-60

39. По наличию каких веществ различаются среды для культивирования клеток?

- 1) Глюкоза
- 2) Глутамин
- 3) Витамины
- 4) Всех вышеперечисленных

40. Какое вещество добавляют в среду для культивирования клеток при разморозке клеточной линии?

- 1) Витамины
- 2) Минералы
- 3) Mg
- 4) Бычьей сыворотку

41. Что называется контаминацией клеточной культуры?

- 1) Попадание в культуру бактерий
- 2) Разрастание культуры клеток в несколько слоев
- 3) Прекращение роста культуры клеток
- 4) Смены среды

42. Для чего используется камера Горяева?

- 1) Для подсчета клеток
- 2) Для выращивания клеток
- 3) Для фиксации клеток
- 4) Для окрашивания клеток

43. Из каких клеток возможно выделение нуклеиновых кислот?

- 1) Из клеток клеточной линии
- 2) Из клеток растений
- 3) Из клеток крови
- 4) Из всех вышеперечисленных

44. Какие молекулы визуализируются в агарозном геле при помощи ультрафиолета и этидиума бромиды?

- 1) Белки
- 2) Углеводы
- 3) Жиры
- 4) Нуклеиновые кислоты

45. Концентрацию каких молекул определяют с помощью флуориметра?

- 1) ДНК
- 2) РНК
- 3) Белков
- 4) Всех вышеперечисленных

46. Из каких молекул происходит сборка олигонуклеотидов во время синтеза?

- 1) Аминокислоты
- 2) Нуклеотиды
- 3) РНК
- 4) Дезоксирибозы

47. В каком веществе растворяют все реактивы для синтеза ДНК?

- 1) Ацетонитрил
- 2) Спирт
- 3) Эфир
- 4) Дистиллированная вода

48. Как называется раздел молекулярной биологии, занимающийся изучением и расшифровкой генетической информации?

- 1) Геномика
- 2) Биоинформатика
- 3) Метагеномика
- 4) Протеомика

49. Как называется раздел молекулярной биологии, изучающий геном "сверхорганизма", состоящего не только из Homo Sapiens как такового, но и

из его бесчисленных обитателей?

- 1)Геномика
- 2)Биоинформатика
- 3)Метагеномика
- 4)Протеомика

50.Как называется раздел молекулярной биологии, изучающий белки, в частности, экспрессию белков в различных типах клеток в определенный период времени?

- 1)Геномика
- 2)Биоинформатика
- 3)Метагеномика
- 4)Протеомика

51.Как называется использование компьютерных, математических, статистических методов, программ и алгоритмов для решения биологических задач?

- 1)Геномика
- 2)Биоинформатика
- 3)Метагеномика
- 4)Протеомика

52.К какому методу секвенирования относится метод Сэнгера?

- 1)Классический
- 2)Новый
- 3)Новейший

53.К какому методу секвенирования относится пиросеквенирование?

- 1)Классический
- 2)Новый
- 3)Новейший

54.К какому методу секвенирования относится секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников?

- 1)Классический
- 2)Новый
- 3)Новейший

55.К какому методу секвенирования относится циклическое лигазное секвенирование?

- 1)Классический
- 2)Новый
- 3)Новейший

56. К какому методу секвенирования относится полупроводниковое секвенирование?

- 1) Классический
- 2) Новый
- 3) Новейший

57. К какому методу секвенирования относится технология секвенирования одной молекулы?

- 1) Классический
- 2) Новый
- 3) Новейший

58. К какому методу секвенирования относится секвенирование единичных молекул в реальном времени?

- 1) Классический
- 2) Новый
- 3) Новейший

59. К какому методу секвенирования относится секвенирование через нанопоры?

- 1) Классический
- 2) Новый
- 3) Новейший

Тестовые задания открытого типа:

Заполните пропуски в следующих предложениях:

1. Фермент, ответственный за синтез ДНК как при репликации, так и при репарации, называется _____.

2. Фермент, который сшивает разрывы в ДНК во время синтеза ДНК или ее репарации, называется _____.

3. Для ДНК полимеразы в отличие от РНК-полимеразы совершенно необходим свободный 3'-ОН-конец _____, спаренный с расплетенной ДНК, чтобы присоединять к нему новые нуклеотиды.

4. Если ДНК-полимераза ошибочно присоединяет неправильный нуклеотид к 3'-концу, ее отдельный каталитически активный домен, обладающий (3' → 5') - _____ активностью, удалит неподходящее основание.

5. Для инициации синтеза ДНК на отстающей цепи нужны короткие праймеры, возникающие благодаря работе фермента _____, которая в качестве субстратов использует рибонуклеозидтрифосфаты.

6. Расплетание двойной спирали ДНК в зоне репликативной вилки катализируется _____, использующей для направленного движения по ДНК энергию гидролиза АТФ.

7. Способствующие расплетанию ДНК _____ связываются с

одноцепочечной ДНК таким образом, что основания становятся доступными для реакции матричного синтеза.

8. Каждая молекула ДНК упакована в _____, а вся генетическая информация, хранящаяся в хромосомах организма, составляет его _.

9. Для функционирования хромосом необходимы три элемента последовательности ДНК: по крайней мере одна _____ для того, чтобы могло осуществляться копирование хромосом, одна _____ для обеспечения последующего разделения двух копий при митозе и две _____ для поддержания целостности хромосомы в период между делениями.

10. В спирали ДНК каждая область, где синтезируется функциональная молекула РНК, представляет собой _____.

Критерии шкала оценки:

- критерии оценивания – правильные ответы на поставленные вопросы;
- показатель оценивания – процент верных ответов на вопросы;
- шкала оценивания(оценка) – выделено 4 уровня оценивания компетенций:
высокий (отлично) - более 80% правильных ответов;
достаточный (хорошо)– от 60 до 80 % правильных ответов;
пороговый(удовлетворительно)– от 50 до 60% правильных ответов;
критический(неудовлетворительно) – менее 50% правильных ответов.

8. УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ И ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

а) Список рекомендуемой литературы

основная:

1. Биологические методы научных исследований (избранные лекции) [Электронный ресурс] : учебное пособие / . — Электрон. текстовые данные. — Омск: Сибирский государственный университет физической культуры и спорта, 2014. — 76 с. — 2227-8397. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/iprbooks-reader?publicationId=64973>
2. Вознесенский Э.Ф. Методы структурных исследований материалов. Методы микроскопии [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Вознесенский Э.Ф., Шарифуллин Ф.С., Абдуллин И.Ш.— Электрон. текстовые данные.— Казань: Казанский национальный исследовательский технологический университет, 2014.— 184 с.— Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/61986.html>

дополнительная:

1. Гигани О.Б., Биология: руководство к лабораторным занятиям [Электронный ресурс]: учебное пособие / Под ред. Гигани О.Б. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 272 с. - ISBN 978-5-9704-3726-1 - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970437261.html>
2. Маркина В.В., Биология. Руководство к практическим занятиям [Электронный ресурс]: учебное пособие / Маркина В.В., Оборотистов

- Ю.Д., Лисатова Н.Г. и др.; Под ред. В.В. Маркиной - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 448 с. - ISBN 978-5-9704-3415-4 - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434154.html>
3. Чебышев Н.В., Биология. Руководство к лабораторным занятиям [Электронный ресурс]: учеб. пособие / под ред. Н.В. Чебышева. - 2-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 384 с. - ISBN 978-5-9704-3411-6 - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434116.html>
4. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия [Электронный ресурс] : учебно-справочное пособие / С.Н. Щелкунов. — Электрон. текстовые данные. — Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2017. — 514 с. — 978-5-379-02024-8. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/65273.html>
5. Нечипуренко Ю.Д. Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами [Электронный ресурс] : монография / Ю.Д. Нечипуренко. — Электрон. текстовые данные. — Ижевск: Регулярная и хаотическая динамика, Институт компьютерных исследований, 2015. — 190 с. — 978-5-4344-0295-8. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/69338.html>

учебно-методическая:

1. Курносова, Н. А. Лабораторные методы исследований в биологии : учеб.-метод. комплекс / Н. А. Курносова; УлГУ, ИМЭиФК. - Ульяновск : УлГУ, 2009. – 13с.

б) программное обеспечение

1. ОС MicrosoftWindows (контракт №580 от 29.08.2014, контракт №581 от 29.08.2014)
2. MicrosoftOffice 2016 (договор №991 от 21.12.2016)
3. «МойОфис Стандартный» (договор №793 от 14.12.2018)
4. StatisticaBasicAcademicforWindows 13 (510 от 06.08.2018)

в) профессиональные базы данных, информационно-справочные системы

1. Электронно-библиотечные системы:

- 1.1. **IPRbooks** [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система / группа компаний Ай Пи Эр Медиа . - Электрон. дан. - Саратов , [2019]. - Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru>.
- 1.2. **ЮРАЙТ** [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система / ООО Электронное издательство ЮРАЙТ. - Электрон. дан. – Москва , [2019]. - Режим доступа: <https://www.biblio-online.ru>.
- 1.3. **Консультант студента** [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система / ООО Политехресурс. - Электрон. дан. – Москва, [2019]. - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/pages/catalogue.html>.
2. **КонсультантПлюс** [Электронный ресурс]: справочная правовая система. /Компания «Консультант Плюс» - Электрон. дан. - Москва :

КонсультантПлюс, [2019].

3. **База данных периодических изданий** [Электронный ресурс] : электронные журналы / ООО ИВИС. - Электрон. дан. - Москва, [2019]. - Режим доступа: <https://dlib.eastview.com/browse/udb/12>.

4. **Национальная электронная библиотека** [Электронный ресурс]: электронная библиотека. - Электрон. дан. – Москва, [2019]. - Режим доступа: <https://нэб.рф>.

5. **Электронная библиотека диссертаций РГБ** [Электронный ресурс]: электронная библиотека / ФГБУ РГБ. - Электрон. дан. – Москва, [2019]. - Режим доступа: <https://dvs.rsl.ru>.

6. **Федеральные информационно-образовательные порталы:**

6.1. Информационная система [Единое окно доступа к образовательным ресурсам](http://window.edu.ru). Режим доступа: <http://window.edu.ru>

6.2. Федеральный портал [Российское образование](http://www.edu.ru). Режим доступа: <http://www.edu.ru>

7. **Образовательные ресурсы УлГУ:**

7.1. Электронная библиотека УлГУ. Режим доступа : <http://lib.ulsu.ru/MegaPro/Web>

7.2. Образовательный портал УлГУ. Режим доступа : <http://edu.ulsu.ru>