

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Экологический факультет
Кафедра биологии, экологии и природопользования

Е.В. РАССАДИНА

БИОНЖИНИРИНГ. ФАРМСУБСТАНЦИИ

методические рекомендации по организации самостоятельной работы
студентов 1 курса магистратуры экологического факультета ИМЭиФК УлГУ
направления подготовки 06.04.01 Биология

Ульяновск, 2024

УДК 57.085.23 (075.8)

Р 24

Автор-составитель – Е.В. Рассадина

Рецензент – кандидат биологических наук, заведующая кафедры дошкольного, начального образования и методик преподавания общеобразовательных дисциплин ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова», кандидат биологических наук, доцент *Е.В. Спирина*

Рассадина, Е.В. Биоинжиниринг. Фармсубстанции: методические рекомендации по организации самостоятельной работы студентов 1 курса магистратуры экологического факультета ИМЭиФК УлГУ направления подготовки 06.04.01 Биология / Е.В. Рассадина. – Ульяновск: УлГУ, 2024. – 127 с.

Методические рекомендации предназначены для студентов первого курса направления подготовки 06.04.01 Биология, изучающих дисциплину «Биоинжиниринг. Фармсубстанции». Методические рекомендации включают в себя требования к результатам освоения дисциплины, содержание курса, вопросы и тесты для самостоятельной работы, список учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины, контрольные вопросы к зачету.

СОДЕРЖАНИЕ

1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ	5
2. МЕСТО ДИСЦИПЛИНЫ В СТРУКТУРЕ ОПОП	5
3. ПЕРЕЧЕНЬ ПЛАНИРУЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ОБУЧЕНИЯ ПО ДИСЦИПЛИНЕ, СООТНЕСЕННЫХ С ПЛАНИРУЕМЫМИ РЕЗУЛЬТАТАМИ ОСВОЕНИЯ ОПОП.....	7
4. ОБЩАЯ ТРУДОЕМКОСТЬ ДИСЦИПЛИНЫ	8
5. СОДЕРЖАНИЕ КУРСА.....	13
6. ТЕМЫ ПРАКТИЧЕСКИХ И СЕМИНАРСКИХ ЗАНЯТИЙ.....	16
7. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ, ПРАКТИКУМЫ	21
8. ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ЭКЗАМЕНУ	103
9. ТЕСТЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ	107
10. САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ.....	122
11. УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ И ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ	126
12. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ	129
13. СПЕЦИАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ С ОГРАНИЧЕННЫМИ ВОЗМОЖНОСТЯМИ ЗДОРОВЬЯ.....	111

1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ

Цель преподавания курса «Биоинжиниринг. Фармсубстанции»:

формирование базовых представлений и практических навыков для получения и анализа терапевтических и диагностических пептидных фармсубстратов в ядерной медицине.

Задачами изучения курса являются:

- освоение основных понятий ядерной медицины: радионуклидная диагностика и радионуклидная терапия, радиофармацевтический лечебный препарат, метод меченых атомов, органотропность, свойства ионизирующих излучений и др.;
- знакомство с биологическим действием ионизирующих излучений и принципами дозирования;
- изучение классификация радионуклидов по радиационной опасности и методов регистрации ионизирующих излучений;
- изучение методов получения, свойств и способов анализа радиофармацевтических лекарственных препаратов;
- анализ пептидных фармсубстанций, как прекурсоров для лечебных и диагностических радиофармпрепаратов;
- формирование умений и навыков для решения проблемных и ситуационных задач;
- формирование практических навыков постановки и выполнения экспериментальной работы.

2. МЕСТО ДИСЦИПЛИНЫ В СТРУКТУРЕ ОПОП

Данная учебная дисциплина включена в раздел Дисциплины (модули) по выбору основной образовательной программы 06.04.01 Биология, Б1.В.ДВ.02.01. Осваивается на 1 курсе, во 2 семестре. Она базируется на

знаниях и умениях, выработанных при прохождении предшествующих общих профессиональных курсов:

- Биоинформатика;
- Разработка биомедицинских продуктов;
- Общая и молекулярная биология;
- Специальные главы химии;

Требования к входным знаниям, умениям и компетенциям студента:

Студент должен знать:

- общие принципы разработки биомедицинских фармсубстанций;
- общие принципы протекания химических реакций;
- природу биохимических процессов, протекающих в живом организме;
- строение и функции белков и пептидов;
- основы радиоактивного распада.

уметь:

- проводить расчеты количественных характеристик вещества;
- планировать и ставить эксперименты.

владеть:

- навыками работы в лаборатории с реактивами, лабораторной посудой и другим оборудованием;
- навыками проведения химических реакций.

Дисциплины, для которых данная дисциплина является параллельно изучаемой и реализующей одинаковые компетенции:

- Разработка биомедицинских продуктов;
- Защита интеллектуальной собственности;
- Биоинжиниринг. Молекулярная диагностика;
- Биоинжиниринг. Генная инженерия;
- Лабораторный синтез пептидов;
- Лабораторный синтез олигонуклеотидов;
- Микробиология.

Предшествующей данная дисциплина является для:

- Разработка биомедицинских продуктов;
- Защита интеллектуальной собственности;
- Практика по профессиональной деятельности;
- Основы программирования на Python;
- Преддипломная практика;
- Подготовка к процедуре защиты и защита выпускной квалификационной работы.

3. ПЕРЕЧЕНЬ ПЛАНИРУЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ОБУЧЕНИЯ ПО ДИСЦИПЛИНЕ, СООТНЕСЕННЫХ С ПЛАНИРУЕМЫМИ РЕЗУЛЬТАТАМИ ОСВОЕНИЯ ОПОП

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих компетенций:

Код и наименование реализуемой компетенции	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине (модулю), соотнесенных с индикаторами достижения компетенций
ПК-1 Способен производить подготовительные работы для осуществления биотехнологического процесса получения биомедицинского продукта: тест-	ИД-1.1пк1 Знает основные принципы и этапы биотехнологического процесса, правила безопасности при работе с биологическими материалами и реагентами ИД-1.2пк1 Умеет выбирать и подготавливать необходимые реагенты и материалы для проведения биотехнологических процессов ИД-1.3пк1 Владеет навыком работы с лабораторным оборудованием и приборами, необходимыми для проведения биотехнологических процессов

систем / генно-инженерного продукта / радиофармпрепарата	
ПК-2 Способен проводить биотехнологический процесс с использованием живых клеток и ферментативных реакций	ИД-1.3пк2 Владеет навыками культивирования микроорганизмов и эукариотических клеток в различных условиях, методами сепарации и концентрации биологических веществ, полученных в результате биотехнологических процессов с использованием живых клеток и ферментов
ПК-3 Способен проводить исследования по разработке биомедицинского продукта, а также управлять процессом	ИД-1.1пк3 Знает правила безопасности при проведении исследований по разработке биомедицинского продукта ИД-1.2пк3 Умеет формулировать цели и задачи исследований по разработке биомедицинского продукта, анализировать результаты исследований и делать выводы о возможности использования полученного продукта в медицинских целях. ИД-1.3пк3 Владеет навыком выбора оптимальных методов и подходов для проведения исследований по разработке биомедицинского продукта, навыком планирования и организации проведения исследований по разработке биомедицинского продукта.

4. ОБЩАЯ ТРУДОЕМКОСТЬ ДИСЦИПЛИНЫ

4.1 Объем дисциплины в зачетных единицах (всего) – 6 ЗЕТ.

4.2. Объем дисциплины по видам учебной работы (в часах):

Вид учебной работы	Количество часов (форма обучения - очная)	
	Всего по плану	В т.ч. по семестрам
		2
Контактная работа обучающихся с преподавателем	90/18*	90/18*
Аудиторные занятия:		
Лекции	10	10
Практические и семинарские занятия	40/18*	40/18*
Лабораторные работы (лабораторный практикум)	40	40
Самостоятельная работа	90	90
Текущий контроль (количество и вид: контрольная работа, коллоквиум, реферат)	Устный опрос, тестирование	Устный опрос, тестирование
Курсовая работа	не предусмотрена	не предусмотрена
Виды промежуточного контроля (экзамен, зачет)	Экзамен (36)	Экзамен (36)
Всего часов по дисциплине	216/18*	216/18*

**количество часов, проводимых в интерактивной форме*

В случае необходимости использования в учебном процессе частично/исключительно дистанционных образовательных технологий в таблице через слеш указывается количество часов работы ППС с

обучающимися для проведения занятий в дистанционном формате с применением электронного обучения.

4.3. Содержание дисциплины. Распределение часов по темам и видам учебной работы:

Форма обучения очная

Название и разделов и тем	Всего	Виды учебных занятий				
		Аудиторные занятия			в т.ч. занятия в интерактивной форме	Самостоятельная работа
		лекции	практические занятия, семинары	лабораторные работы		
Тема 1. Классификация, свойства и источники излучения	18	1	4	4	2	9
Тема 2. Регистрация излучения, единицы измерения	18	1	4	4	2	9
Тема 3. Применение источников излучения в медицине	18	1	4	4	2	9

Название и разделов и тем	Всего	Виды учебных занятий				
		Аудиторные занятия			в т.ч. занятия в интерактивной форме	Самостоятельная работа
		лекции	практические занятия, семинары	лабораторные работы		
Тема 4. Инструментальные средства ядерной медицины	18	1	4	4	2	9
Тема 5. Производство радионуклидов медицинского назначения	18	1	4	4	2	9
Тема 6. Синтез и контроль качества радиофармпрепаратов	18	1	4	4	2	9
Тема 7. Радиочувствительность	18	1	4	4	2	9
Тема 8. Основы радиационной генетики	18	1	4	4	2	9

Название и разделов и тем	Всего	Виды учебных занятий				
		Аудиторные занятия			в т.ч. занятия в интерактивной форме	Самостоятельная работа
		лекции	практические занятия, семинары	лабораторные работы		
Тема 9. Молекулярная радиобиология	18	1	4	4	2	9
Тема 10. Гигиеническое нормирование радиационных воздействий	18	1	4	4	-	9
Контроль	36	-	-	-	-	-
Итого	216	10	40	40	18	90

Используемые интерактивные образовательные технологии

В процессе изучения дисциплины, с целью формирования и развития профессиональных навыков обучающихся, наряду с традиционными видами занятий, проводятся занятия в интерактивных формах: деловых и ролевых игр-семинаров, разбор конкретных ситуаций в сочетании с внеаудиторной работой.

Лекции проводятся в следующих формах: лекция-визуализация (с использованием различных форм наглядности: компьютерные симуляции, рисунки, фото, схемы и таблицы), лекция-консультация (осуществляемая в формате «вопросы – ответы»), проблемная лекция и лекция с заранее запланированными ошибками.

Практические занятия проводятся в следующих формах: проблемный семинар, разбор конкретных ситуаций в форме дискуссий и мозгового штурма.

Удельный вес занятий, проводимых в интерактивных формах, определен с учетом поставленной цели рабочей программы, особенностей обучающихся и содержания дисциплины и составляют не менее 20% от всего объема аудиторных занятий.

5. СОДЕРЖАНИЕ КУРСА

Тема 1. Классификация, свойства и источники излучения.

Классификация источников ионизирующего излучения, природные источники ионизирующего излучения, техногенные источники ионизирующего излучения. Радионуклиды – источники ионизирующих излучений. Источники α -частиц, протонов и атомов отдачи продуктов деления. Источники электронов. Источники рентгеновского излучения. Радионуклидные источники рентгеновского излучения. Источники γ -излучения. Ускорители – источники тормозного излучения. Портативные источники нейтронов. Радионуклидные нейтронные источники. Генераторы нейтронов. Ускорители. Ядерные реакторы. Реакторы – генераторы постоянных потоков нейтронов и гамма-излучения. Импульсные реакторы. Свойства излучений.

Тема 2. Регистрация излучения, единицы измерения.

Основные методы регистрации ионизирующих излучений: ионизационный, сцинтилляционный, калориметрический, химический, в том числе, и фотографический, термолюминесцентный (ТЛД). Виды детекторов: ионизационные детекторы (ионизационные камеры, пропорциональные счётчики, счётчики Гейгера); сцинтилляционные и черенковские счётчики; полупроводниковые детекторы; диэлектрические детекторы (стёкла, слюды, природные и синтетические кристаллы, органические полимеры);

кристаллический детектор, например, алмаз, сернистый цинк, сульфид кадмия и др. Внесистемная (старая) единица измерения радиоактивности(Кюри (Ки)). Единицы радиоактивности в системе СИ. Измерение ионизирующих излучений. Экспозиционная доза. Поглощенная доза. Эквивалентная доза.

Тема 3. Применение источников излучения в медицине.

Ядерная медицина. Методы диагностики в ядерной медицине *in vitro* и *in vivo*. Позитронно-эмиссионная томография. Лучевая терапия и ее три основных варианта лечения: дистанционная лучевая терапия, брахитерапия и системная радионуклидная терапия. Современные методы лучевой терапии опухолей. Дистанционная, внутрисполостная, внутритканевая, аппликационная терапия. Характеристика радионуклидов как источников излучения в радиотерапии. Применение рентгено- и гамма-установок, линейных ускорителей, нейтронных источников. Перспективы использования тяжелых ядерных частиц и нейтронзахватной терапии в лечении онкологических заболеваний. Фракционирование дозы облучения, кинетика клеточных популяций при фракционированном облучении. Понятие о реоксигенации опухоли. Выбор оптимальных режимов фракционирования.

Тема 4. Инструментальные средства ядерной медицины.

Истинная эндорадиотерапия. Терапевтические РФП 1 поколения. Терапевтические РФП 2 поколения. РФП для внутриартериальной РНТ. Устройство и принцип работы гамма-камеры и ОФЭКТ-сканера. Устройство и принцип работы ПЭТ-сканера.

Тема 5. Производство радионуклидов медицинского назначения.

Радионуклиды биогенных элементов. Радиоактивный распад. Радионуклидная диагностика. Основные понятия. Применение радионуклидов для диагностики. Получение радионуклидов для ПЭТ-диагностики. Меченые соединения. Радиофармацевтический препарат.

Циклотрон. Кинетика накопления продуктов ядерной реакции. Сечение реакции.

Тема 6. Синтез и контроль качества радиофармпрепаратов.

Радиофармацевтические препараты. Радионуклиды для ядерной медицины. Позитронно-эмиссионная томография. РФП первого поколения. РФП второго поколения. РФП третьего поколения. Создание современных препаратов для ПЭТ/ОФЭКТ. Выбор лиганда-вектора. Выбор радионуклида. Влияние линкера. Выбор и влияние хелатирующего агента. Другие способы модификации молекулы РФП. Контроль качества РФ(Л)П.

Тема 7. Радиочувствительность.

Основные стадии действия ионизирующего излучения на биологические системы. Радиационные мутации. Понятие о радиочувствительности. Факторы, определяющие радиочувствительность к воздействию повышенных доз ИИ. Основные реакции организма на действие ионизирующего излучения. Детерминированные и стохастические эффекты. Классификация лучевых поражений от внешнего облучения. Общая характеристика поражений от внутреннего радиоактивного заражения.

Тема 8. Основы радиационной генетики.

Предмет радиационной генетики. Радиогенетические эффекты на разных уровнях организации эукариот. Основные количественные зависимости индукции радиационных мутаций от дозы, вида и мощности излучений. Биологические проблемы радиационного риска. Оценка генетических рисков. Адаптивный ответ. Байстендер эффект (bystander effect, эффект соседства). Влияние ионизирующих излучений на популяции. Механизмы защиты от радиогенетических поражений. Прикладные аспекты радиационной генетики.

Тема 9. Молекулярная радиобиология.

Хромосомные aberrации и их классификация. Классификация радиоиндуцированных хромосомных aberrаций. Радиационно-индуцированные генные мутации. Методы детекции хромосомных

перестроек. Репарация ДНК. Радиационно-индуцированное повреждение ДНК. Методы детекции хромосомных перестроек. Репарация ДНК. Радиационно-индуцированное повреждение ДНК. Пострепликационная репарация ДНК. SOS-репарация. Mismatch-репарация (репарация ошибочно спаренных нуклеотидов).

Тема 10. Гигиеническое нормирование радиационных воздействий.

Нормирование радиоактивных веществ. Нормы радиационной безопасности» (НРБ-96, 1996). Категории облучаемых лиц: категория А - персонал (профессиональные, работают непосредственно с источниками ионизирующих излучений; категория Б - ограниченная часть населения - лица, которые не работают непосредственно с источниками ионизирующего излучения, но по условиям проживания или размещения рабочих мест могут подвергаться воздействию радиоактивных веществ. Основные дозовые пределы для разных категорий лиц. Годовая доза облучения у населения.

6.ТЕМЫ ПРАКТИЧЕСКИХ И СЕМИНАРСКИХ ЗАНЯТИЙ

Тема 1. Классификация, свойства и источники излучения.

Круглый стол

Вопросы для обсуждения:

- 1.Классификация источников ионизирующего излучения, природные источники ионизирующего излучения, техногенные источники ионизирующего излучения.
- 2.Радионуклиды – источники ионизирующих излучений.
- 3.Источники α -частиц, протонов и атомов отдачи продуктов деления.
- 4.Источники электронов.
- 5.Источники рентгеновского излучения.
- 6.Радионуклидные источники рентгеновского излучения.
- 7.Источники γ -излучения.

8. Ускорители – источники тормозного излучения.
9. Портативные источники нейтронов.
10. Радионуклидные нейтронные источники.
11. Генераторы нейтронов.
12. Ускорители.
13. Ядерные реакторы.
14. Реакторы – генераторы постоянных потоков нейтронов и гамма-излучения.
15. Импульсные реакторы.
16. Свойства излучений.

Тема 2. Регистрация излучения, единицы измерения.

Круглый стол

Вопросы для обсуждения:

1. Основные методы регистрации ионизирующих излучений: ионизационный, сцинтилляционный, калориметрический, химический, в том числе, и фотографический, термолюминесцентный (ТЛД).
2. Виды детекторов: ионизационные детекторы (ионизационные камеры, пропорциональные счётчики, счётчики Гейгера); сцинтилляционные и черенковские счётчики; полупроводниковые детекторы; диэлектрические детекторы (стёкла, слюды, природные и синтетические кристаллы, органические полимеры); кристаллический детектор, например, алмаз, сернистый цинк, сульфид кадмия и др.
3. Внесистемная (старая) единица измерения радиоактивности (Кюри (Ки)).
4. Единицы радиоактивности в системе СИ.
5. Измерение ионизирующих излучений.
6. Экспозиционная доза.
7. Поглощенная доза.
8. Эквивалентная доза.

Тема 3. Применение источников излучения в медицине.

Семинар-дискуссия

Вопросы к теме:

1. Ядерная медицина.
2. Методы диагностики в ядерной медицине *in vitro* и *in vivo*.
3. Позитронно-эмиссионная томография.
4. Лучевая терапия и ее три основных варианта лечения: дистанционная лучевая терапия, брахитерапия и системная радионуклидная терапия.
5. Современные методы лучевой терапии опухолей.
6. Дистанционная, внутрисполостная, внутритканевая, аппликационная терапия.
7. Характеристика радионуклидов как источников излучения в радиотерапии.
8. Применение рентгено- и гамма-установок, линейных ускорителей, нейтронных источников.
9. Перспективы использования тяжелых ядерных частиц и нейтронзахватной терапии в лечении онкологических заболеваний.
10. Фракционирование дозы облучения, кинетика клеточных популяций при фракционированном облучении.
11. Понятие о реоксигенации опухоли.
12. Выбор оптимальных режимов фракционирования.

Тема 4. Инструментальные средства ядерной медицины.

Семинар-дискуссия

Вопросы к теме:

1. Истинная эндорадиотерапия.
2. Терапевтические РФП 1 поколения.
3. Терапевтические РФП 2 поколения.
4. РФП для внутриартериальной РНТ.
5. Устройство и принцип работы гамма-камеры и ОФЭКТ-сканера.
6. Устройство и принцип работы ПЭТ-сканера.

Тема 5. Производство радионуклидов медицинского назначения.

Проблемный семинар

Вопросы к теме:

1. Радионуклиды биогенных элементов.
2. Радиоактивный распад.
3. Радионуклидная диагностика. Основные понятия.
4. Применение радионуклидов для диагностики.
5. Получение радионуклидов для ПЭТ-диагностики.
6. Меченые соединения.
7. Радиофармацевтический препарат.
8. Циклотрон.
9. Кинетика накопления продуктов ядерной реакции.
10. Сечение реакции.

Тема 6. Синтез и контроль качества радиофармпрепаратов.

Семинар-дискуссия

Вопросы к теме:

1. Радиофармацевтические препараты.
2. Радионуклиды для ядерной медицины.
3. Позитронно-эмиссионная томография.
4. РФП первого поколения. РФП второго поколения.
5. РФП третьего поколения.
6. Создание современных препаратов для ПЭТ/ОФЭКТ.
7. Выбор лиганда-вектора.
8. Выбор радионуклида.
9. Влияние линкера.
10. Выбор и влияние хелатирующего агента.
11. Другие способы модификации молекулы РФП.
12. Контроль качества РФ(Л)П.

Тема 7. Радиочувствительность.

Семинар-дискуссия

Вопросы к теме:

1. Основные стадии действия ионизирующего излучения на биологические системы.
2. Радиационные мутации.
3. Понятие о радиочувствительности.
4. Факторы, определяющие радиочувствительность к воздействию повышенных доз ИИ.
5. Основные реакции организма на действие ионизирующего излучения.
6. Детерминированные и стохастические эффекты.
7. Классификация лучевых поражений от внешнего облучения.
8. Общая характеристика поражений от внутреннего радиоактивного заражения.

Тема 8. Основы радиационной генетики.

Семинар-дискуссия

Вопросы к теме:

1. Предмет радиационной генетики.
2. Радиогенетические эффекты на разных уровнях организации эукариот.
3. Основные количественные зависимости индукции радиационных мутаций от дозы, вида и мощности излучений.
4. Биологические проблемы радиационного риска.
5. Оценка генетических рисков.
6. Адаптивный ответ.
7. Байстендер эффект (bystander effect, эффект соседства).
8. Влияние ионизирующих излучений на популяции.
9. Механизмы защиты от радиогенетических поражений.
10. Прикладные аспекты радиационной генетики.

Тема 9. Молекулярная радиобиология.

Семинар-визуализация

Вопросы к теме:

- 1.Хромосомные aberrации и их классификация.
- 2.Классификация радиоиндуцированных хромосомных aberrаций.
- 3.Радиационно-индуцированные генные мутации.
- 4.Методы детекции хромосомных перестроек.
- 5.Репарация ДНК.
- 6.Радиационно-индуцированное повреждение ДНК.
- 7.Методы детекции хромосомных перестроек.
- 8.Репарация ДНК.
- 9.Радиационно-индуцированное повреждение ДНК.
- 10.Пострепликационная репарация ДНК.
- 11.SOS-репарация.
- 12.Mismatch-репарация (репарация ошибочно спаренных нуклеотидов).

Тема 10. Гигиеническое нормирование радиационных воздействий.

Семинар-дискуссия

Вопросы к теме:

- 1.Нормирование радиоактивных веществ.
- 2.Нормы радиационной безопасности» (НРБ-96, 1996).
- 3.Категории облучаемых лиц: категория А - персонал (профессиональные, работают непосредственно с источниками ионизирующих излучений; категория Б - ограниченная часть населения - лица, которые не работают непосредственно с источниками ионизирующего излучения, но по условиям проживания или размещения рабочих мест могут подвергаться воздействию радиоактивных веществ.
- 4.Основные дозовые пределы для разных категорий лиц.
- 5.Годовая доза облучения у населения.
- 6.Решение задач на расчет допустимой дозы облучения.

7.ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ, ПРАКТИКУМЫ

Лабораторная работа № 1 Экстракция белков из растительных и животных тканей

Цель работы: провести экстракцию по растворимости и количественное определение белков растительного и животного происхождения.

Реактивы: мука пшеничная, гороховая; молочный продукт; гомогенизированная мышечная ткань; 10% и насыщенный растворы сульфата аммония, сухой сульфат аммония (мелко размолотый); 0,2; 1; 10% растворы гидроксида натрия; 0,1 н, 3% растворы уксусной кислоты; биуретовый реактив; 10% и насыщенный растворы хлорида натрия; сухой хлорид натрия (мелко размолотый); 70% раствор этилового спирта, 1% раствор альбумина (стандартный раствор); биуретовый реактив; белоксодержащие образцы.

Посуда и приборы: капельницы; стеклянные воронки; фарфоровые ступки и пестики; фильтровальная бумага; марля; технические весы с разновесами; термостат; плоскодонные колбы объемом 100 мл; пробирки; пипетки; водяные бани, мерные цилиндры; фотоэлектроколориметр (с кюветами); спектрофотометр (с 10 мм кюветами).

Теоретическая часть

Классификация белков по растворимости (в воде, растворах солей, кислот, щелочей и спирта) применяется только для простых белков:

Белки, растворимые в слабых кислотах, – это наиболее простые белки, обладают невысокой молекулярной массой и проявляют основные свойства (суммарный заряд – положительный):

- протамины обладают сильноосновными свойствами, растворимы в слабых кислотах, содержат до 80% аминокислот основной природы (лизин, гистидин, аргинин);

- гистоны обладают менее основными свойствами, чем протамины (содержание аминокислот основной природы до 30%), они выполняют стабилизирующую функцию при формировании третичной структуры ДНК у

эукариот.

Белки, растворимые в воде и растворах нейтральных солей, обладают более высокой молекулярной массой, чем гистоны и протамины, часто выполняют в организме каталитическую функцию:

- альбумины хорошо растворяются в воде и высаживаются из насыщенных растворов нейтральных солей;

- глобулины растворяются в слабых растворах нейтральных солей, высаживаются при высоких концентрациях нейтральных солей и выполняют защитные функции в организме.

Белки, растворимые в спиртах и растворах щелочей, – это высокомолекулярные белки, нерастворимые в воде, встречаются в семенах растений, выполняют запасные функции:

- проламины нерастворимы в воде и солях, растворимы в 70% спирте, содержат много пролина;

- глютелины нерастворимы в воде и разбавленных растворах нейтральных солей, растворимы в разбавленных щелочных растворах (0,2...2% растворах едкого натра) и выполняют не только запасную функцию, но обладают и биологической активностью.

Растительные белки

Белки зерновых неравномерно распределены между морфологическими частями зерна. Основное количество белка содержится в эндосперме (65...75%), на алейроновый слой приходится 15% белка, а 22% - на долю зародыша. Белки эндосперма и алейронового слоя представлены различными фракциями, белки зародыша – в основном каталитическими белками (альбуминами и глобулинами). Альбуминовые и глобулиновые фракции белков пшеницы разнородны и проявляют либо каталитическую активность, либо свойства ингибиторов ферментов. В количественном отношении главными белками пшеницы являются две фракции: глиадин (проламин пшеницы) и глютеин (глютелин пшеницы).

Белки бобовых. Основная фракция белков бобовых – глобулиновая (60...90%). Она представляет собой группу запасных белков и извлекается 5 - 10% раствором хлорида натрия из обезжиренной муки. Белки бобовых содержат лизина в 2 - 2,5 раза больше, чем злаковые, а растворимость и перевариваемость их выше, чем у других белков растений. В качестве самостоятельной группы в семядолях бобовых не обнаружены глютелины. Извлекаемые щелочными растворами белки представляют собой глобулины, связанные с полисахаридами.

На долю альбуминовой фракции приходится 10 - 20% белков бобовых. Они не являются запасными, основная роль альбуминовых белков – физиологическая, они представляют собой группу биологически активных веществ. Это, главным образом, ферменты и ингибиторы ферментов. В альбуминовой фракции встречаются ингибиторы трипсина, цитохромы с, β -амилазы, липооксидазы. Отличительной особенностью белкового комплекса бобовых является высокое содержание ингибиторов протеаз и особых белков гликопротеидной природы – лектинов.

Животные белки

Белки мяса. В питании человека мясо животных является основным источником полноценных белков. По химическому составу, структуре и свойствам эти белки наиболее близко отражают потребности организма человека в них. Фракционный состав белков мяса многокомпонентен.

Мясо - это совокупность различных тканей животных организмов, наиболее ценной из которых является мышечная ткань. Главным компонентом мышцы являются белки (16-22%). К белкам мышечной ткани относятся:

- растворимые в воде белки саркоплазмы – миоген, миоальбумин, миоглобин, глобулин X;
- солерастворимые миофибриллы – миозин, актин, их комплекс;
- нерастворимые белки стромы – белки сарколеммы (коллаген, эластин, муцин, ретикулин) и ядер.

Миоген легко экстрагируется водой и образует пену на поверхности бульона в результате денатурации. Глобулин X – это солерастворимый белок плазмы, он выполняет ферментативные функции в организме. На долю глобулина X и миогена приходится до 20-25% всех белков мышечной ткани.

Хромопротеид миоглобин имеет красную окраску, так как содержит железо, он обуславливает красный цвет мяса. Миоглобин, присоединяя кислород, образует оксимиоглобин, который определяет красный цвет мяса после убоя. При длительном воздействии кислорода на миоглобин образуется метмиоглобин, имеющий коричневый цвет, поэтому при длительном хранении мяса на воздухе его цвет изменяется из красного в коричневый. Миоглобин денатурирует при температуре 60°C и утрачивает красный цвет; по цвету мяса можно судить о его готовности.

Миоальбумин легко выделяется ацетоном из мышечной плазмы, хорошо растворим в воде, не осаждается хлоридом натрия при насыщении, но осаждается сульфатом аммония. Содержание в мышечной ткани миоальбумина и миоглобина составляет 1-2%.

Миозин – важнейший солерастворимый белок мышечной ткани, составляет около 40% всех мышечных белков, обладает водопоглощающей и водоудерживающей способностью. На долю актина приходится до 15% мышечных белков; при взаимодействии с миозином он образует актиномиозин, обладающий высокой вязкостью. Белки саркоплазмы и миофибрилл являются полноценными белками и содержат все необходимые для организма человека незаменимые аминокислоты.

Белки сарколеммы включают коллаген и эластин и относятся к полноценным белкам, в них отсутствует незаменимая аминокислота триптофан. Основное количество коллагена и эластина находится преимущественно в соединительных тканях. Хотя коллаген и относится к неполноценным белкам, после тепловой обработки он может частично усваиваться, улучшая общий аминокислотный состав продуктов.

Фракционирование основных в количественном отношении белков мышечной ткани обычно ведут методом высаливания двух белковых фракций (водо- и солерастворимых), остальные нерастворимые фракции остаются при этом в нерастворимой части мышечной ткани.

Миоген (альбуминовая фракция) - основной водорастворимый белок мышечной ткани. Он является гетерогенным белком, растворяется в воде, выпадает в осадок из насыщенного раствора сульфата аммония. Миозин (глобулиновая фракция) – основной солерастворимый белок мышечной ткани, представляет собой фибриллярный белок. Он растворим в слабых растворах нейтральных солей, осаждается из насыщенного раствора хлоридом натрия. Чистый миозин растворим в воде. Белки стромы - нерастворимые белки мышечной ткани, основными представителями которых являются коллаген и эластин.

Белки молока. Содержание белков в молоке составляет 2,9-3,5%. Белки молока обеспечивают нормальное развитие растущего организма и питание взрослого человека. Они отличаются по строению, физико- химическим свойствам и биологическим функциям. Белки молока делятся на три группы:

- казеиновые белки (80%) – α_{S1} -казеин, α_{S2} -казеин, β -казеин, χ -казеин;
- сывороточные белки (19%) – β -лактоглобулин, α -лактальбумин, иммуноглобулины, лактоферрин;
- белки оболочек жировых шариков (1%).

Сывороточные белки являются наиболее ценной частью молока по содержанию незаменимых аминокислот (НАК). По биологической ценности они превосходят казеин и имеют аминокислотный состав, близкий к составу мышечной ткани. Это глобулярные белки, в отличие от казеина не способны ассоциироваться и осаждаться в изоэлектрической точке (ИЭТ). Они гетерогенны, обладают важными биологическими функциями.

β -Лактоглобулин (β -Лг) – наиболее важный белок в количественном отношении, термолабилен. Предполагают, что он участвует в транспорте витамина А. Известно, что он переносит в кишечник макро- и

микроэлементы, витамины и липиды. Тепловая денатурация β -Лг приводит к коагуляции агрегированного белка (он коагулирует почти полностью при 85-100°C) и образованию комплексов с χ -казеином.

α -Лактальбумин (α -Ла) гетерогенен, участвует в синтезе лактозы (является частью лактозосинтезирующей системы). Так же, как и иммуноглобулины, попадает в молоко из кровеносной системы животного. Он наиболее термостабилен из всех сывороточных белков из-за присутствия в нем дисульфидных связей. При охлаждении и в присутствии ионов кальция α -Ла способен восстанавливать нативную структуру на 80-90%.

Имуноглобулины – сложные белки (гликопротеиды). Это термолабильные белки, которые коагулируют при температуре выше 70°C. Они обладают свойствами антител и выполняют защитные функции.

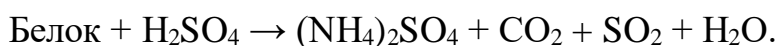
Лактоферрин – красный железосвязывающий белок. Его главная функция – транспорт железа, он оказывает бактериостатическое действие на кишечную микрофлору, связывая в кишечнике железо и делая его недоступным для микроорганизмов.

Молочные альбумины и глобулины обладают всеми свойствами белков соответствующих групп: они свертываются при кипячении и высаливаются насыщенным (альбумины) и полунасыщенным (глобулины) растворами сернокислого аммония.

Методы количественного определения белков

Метод Кьельдаля

Классическим методом определения массовой доли белка является метод Кьельдаля, который основан на минерализации белоксодержащей пробы. В результате минерализации органический продукт разлагается до углекислого газа, воды и аммиака:



Образовавшийся в реакционной среде сульфат аммония разрушают концентрированным раствором щелочи. Выделившийся при этом аммиак отгоняют с водяным паром и количественно поглощают раствором серной

кислоты. Избыток серной кислоты, не связанной с аммиаком, оттитровывают раствором щелочи. Продолжительность стадии минерализации пробы составляет 2-2,5 ч.

Спектрофотометрические методы

Более удобными в применении и оперативными являются спектрофотометрические методы, из которых наиболее часто в исследованиях при определении содержания белка применяют метод Лоури. Несмотря на то, что метод обладает высокой чувствительностью (для анализа используют сильно разбавленные растворы), он имеет ряд недостатков. Используемый по методике реактив Фолина-Чокольтей дает положительную реакцию и на некоторые другие вещества, например, фенольной природы, что осложняет анализ, особенно объектов растительного происхождения.

Для экспрессной оценки содержания белка широко используется прямая спектрофотометрия белоксодержащих образцов при определенной длине волны. Наиболее известен метод Варбурга и Христиана, основанный на измерении оптической плотности растворов при 280 и 260 нм, хотя он дает лишь ориентировочные результаты.

Биуретовый метод

Более надежные и воспроизводимые результаты анализа получают биуретовым методом. Он менее чувствителен, чем метод Лоури, но при этом не дает побочных реакций с небелковыми веществами.

Биуретовый метод основан на определении интенсивности окраски исследуемого образца, возникающей в результате взаимодействия белков и полипептидов с ионами меди (II) в щелочной среде. При этом раствор белка окрашивается в сине-фиолетовый цвет.

Интенсивность окраски раствора пропорциональна концентрации белка в пробе. Оптическую плотность растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны в диапазоне от 540 до 650 нм. Для определения содержания белка строят калибровочный график на основе стандартного раствора белка.

Спектрофотометрический метод Варбурга и Христиана

Данный метод основан на способности ароматических радикалов таких аминокислот, как тирозин, триптофан, фенилаланин, содержащихся в белках, к светопоглощению при 280 нм. Однако при данной длине волны дают поглощение и нуклеиновые кислоты (максимум адсорбции – 260 нм). Поэтому при определении массовой доли измерение оптической плотности раствора производят при 260 и 280 нм, внося тем самым поправку на присутствие нуклеиновых кислот и нуклеотидов. Метод неприменим к объектам, в которых содержание нуклеиновых кислот превышает 20%.

Количественное определение белка с помощью флуориметра

Флуориметр – это устройство, используемое для измерения параметров флуоресценции видимого спектра: ее интенсивности и распределения длин волн спектра испускания после возбуждения определенным спектром света. Эти параметры используются для определения наличия и количества определенных молекул в среде, таких как нуклеиновые кислоты и белки.

Количественная оценка нуклеиновых кислот и белков важна для последующих приложений, таких как секвенирование нового поколения (NGS), ПЦР, трансфекция, вестерн-блот, иммуноанализы и т. д.

Флуориметры определяют концентрацию веществ по уровню свечения вещества в момент воздействия возбуждающим светом. В исследуемый образец вводится флуоресцентный зонд, который специфически связывает целевую молекулу, образуя флуоресцентный комплекс. Источник света возбуждает флуоресценцию, которая пропорциональна концентрации определяемого вещества.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Это хроматографический метод, широко используемый для разделения и очистки сложных смесей. Он основан на дифференциальном взаимодействии между компонентами образца и неподвижной фазой внутри колонки. Подвижная фаза, состоящая из растворителя или смеси растворителей, переносит образец через колонку.

ВЭЖХ предлагает несколько преимуществ для очистки белков, включая высокое разрешение, масштабируемость и совместимость с широким спектром типов образцов. Выбор метода ВЭЖХ зависит от конкретных свойств белка и целей очистки.

Примеры: эксклюзионная хроматография, также известная как гель-фильтрационная хроматография, разделяет белки на основе их размера. В этом методе используется пористая неподвижная фаза, и более крупные белки элюируются быстрее, чем более мелкие. SEC особенно полезна для удаления загрязняющих веществ, таких как агрегаты и протеазы, а также для оценки молекулярной массы белков.

Ионообменная хроматография (ИОХ) разделяет белки на основе их заряда. Она использует неподвижную фазу с заряженными функциональными группами, которые взаимодействуют с противоположно заряженными белками. Регулируя pH и ионную силу подвижной фазы, белки могут быть селективно связаны и элюированы, что позволяет проводить их очистку.

Аффинная хроматография (АХ) использует специфические взаимодействия между интересующим белком и лигандом, иммобилизованным на неподвижной фазе. Лигандом может быть антитело, ион металла или другая молекула, которая специфически связывается с целевым белком. Этот метод обеспечивает высокую специфичность и может использоваться для очистки белков с исключительной чистотой.

Хроматография гидрофобного взаимодействия (НІС) разделяет белки на основе их гидрофобности. Используется гидрофобная неподвижная фаза, и белки элюируются в порядке убывания гидрофобности путем снижения концентрации органического растворителя в подвижной фазе. НІС часто используется для очистки мембранных белков и белковых комплексов.

Обращенно-фазовая хроматография (RPC) разделяет белки на основе их гидрофобности, подобно НІС. Однако она использует гидрофильную неподвижную фазу и гидрофобную подвижную фазу. RPC особенно полезна

для разделения белков с тонкими различиями в гидрофобных свойствах и может использоваться как для аналитической, так и для препаративной очистки белков.

Аффинная хроматография с иммобилизованными ионами металлов (ИМАС) - это метод, который использует средство определенных ионов металлов к определенным остаткам аминокислот, таким как гистидин. Неподвижная фаза загружена ионами металлов, обычно никеля или кобальта, и белки с гистидиновыми метками связываются с этими ионами. ИМАС широко используется для очистки рекомбинантных белков с гистидиновыми метками.

Хроматография белка А/Г - это мощный метод очистки антител и фрагментов антител. Он использует сильное связывающее средство белка А и белка Г к Fc-области иммуноглобулинов. Этот метод обеспечивает высокую селективность и может использоваться как для мелкомасштабной, так и для крупномасштабной очистки антител.

Мультимодальная хроматография объединяет несколько режимов взаимодействия в одном хроматографическом шаге. Она позволяет проводить более полное разделение и очистку белков, используя различные свойства, такие как заряд, гидрофобность и средство. Мультимодальная хроматография универсальна и может быть адаптирована к конкретным потребностям очистки.

Обращенно-фазовая сверхбыстрая жидкостная хроматография (RP-UFLC) - это передовая технология, которая сочетает преимущества обращенно-фазовой хроматографии со сверхбыстрым разделением. Она обеспечивает быструю очистку белков с высоким разрешением и пропускной способностью. RP-UFLC особенно полезна для высокопроизводительного скрининга и очистки белков в исследовательских и промышленных условиях.

Количественное определение белка методами масс-спектрометрии MALDI-TOF

В масс-спектрометрии матрично-ассистированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI) - это метод ионизации, который использует поглощающую лазерную энергию матрицу для создания ионов из больших молекул с минимальной фрагментацией. Метод применяется для анализа биомолекул (биополимеров, таких как ДНК, белки, пептиды и углеводы) и различных органических молекул (таких как полимеры, дендримеры и другие макромолекулы), которые, как правило, хрупкие и фрагментируются при ионизации более традиционными методами ионизации.

Методология MALDI представляет собой трехэтапный процесс. Во-первых, образец смешивается с подходящим материалом матрицы и наносится на металлическую пластину. Во-вторых, импульсный лазер облучает образец, вызывая абляцию и десорбцию образца и материала матрицы. Наконец, молекулы аналита ионизируются путем протонирования или депротонирования в горячем шлейфе аблированных газов, а затем их можно ускорить в любом масс-спектрометре, который используется для их анализа.

Тип масс-спектрометра, наиболее широко используемый с MALDI, - это времяпролетный масс-спектрометр (TOF), в основном из-за его большого диапазона масс. Процедура измерения TOF также идеально подходит для процесса ионизации MALDI, поскольку импульсный лазер делает отдельные «выстрелы», а не работает в непрерывном режиме. Приборы MALDI-TOF часто оснащены рефлектроном («ионным зеркалом»), который отражает ионы с помощью электрического поля. Это увеличивает траекторию полета ионов, тем самым увеличивая время пролета между ионами с разным m/z и повышая разрешение.

Практическая часть

Ход анализа

Выделение белков пшеницы

I Выделение водорастворимых белков пшеницы.

1.10 г пшеничной муки растереть в фарфоровой ступке с 50 мл

дистиллированной воды. Полученной смеси дать отстояться 2-3 мин, затем отфильтровать. Получить фильтрат. Остаток муки (после фильтрации) промыть два раза небольшими порциями дистиллированной воды и оставить для последующего извлечения глобулинов пшеницы.

2.Полученный фильтрат использовать для получения фракции альбуминовых белков. К фильтрату добавить сухой тонкоизмельченный порошок сульфата аммония при небольшом нагревании (не выше 40°C) до полного насыщения (до прекращения растворения сульфата аммония). Выпавший осадок, представляющий собой альбуминовую фракцию белков пшеницы, отфильтровать.

3.Осадок на фильтре растворить в 5 мл дистиллированной воды. Получить раствор.

4.Полученный раствор использовать для количественного определения альбуминовых белков.

II Выделение солерастворимых белков пшеницы.

1.Промытый водой остаток муки (после извлечения альбуминовой фракции белков) растереть в ступке с 50 мл 10% раствора хлорида натрия, дать отстояться 2-3 мин и отфильтровать. Получить фильтрат. Остаток муки промыть два раза небольшими порциями свежего раствора хлорида натрия и оставить для следующих опытов.

2.Добавить к фильтрату равный объем насыщенного раствора хлорида натрия, достигнув тем самым полунасыщения. Выпавший осадок, представляющий собой глобулиновую фракцию белков пшеницы, фильтровать. Осадок растворить на фильтре в 5 мл 10% раствора хлорида натрия. Получить раствор.

3.Полученный раствор использовать для количественного определения альбуминовых белков.

III Выделение белков пшеницы, растворимых в щелочах.

1.Остаток муки после удаления альбуминовой и глобулиновой фракции белков растереть в фарфоровой ступке с 50 мл 0,2% раствором гидроксида

натрия, дать отстояться 2-3 мин и отфильтровать. Получить фильтрат.

2.К фильтрату добавить по каплям 0,1н раствор уксусной кислоты. Выпавший осадок представляет собой глютеин - глютелин пшеницы.

IV Выделение белков пшеницы, растворимых в спиртах.

1.В фарфоровой ступке растереть 5 г пшеничной муки с 25 мл 70% этилового спирта. Полученной суспензии дать отстояться и отфильтровать. Получить фильтрат.

2.К 3 мл фильтрата добавить по каплям дистиллированную воду до выпадения осадка. Полученный осадок представляет собой глиадин - проламин пшеницы.

Выделение белков гороха

I Выделение водорастворимых белков гороха.

1.Смолоть на кофемолке 20 г гороха. Взять 10 г гороховой муки и растереть ее в фарфоровой ступке с 50 мл дистиллированной воды. Полученной смеси дать отстояться 2-3 мин, затем отфильтровать. Получить фильтрат. Остаток гороховой муки (после фильтрации) промыть два раза небольшими порциями дистиллированной воды и оставить для последующего извлечения глобулинов пшеницы.

2.Полученный фильтрат использовать для получения фракции альбуминовых белков. К фильтрату добавить сухой тонкоизмельченный порошок сульфата аммония при небольшом нагревании (не выше 40°C) до полного насыщения (до прекращения растворения сульфата аммония). Выпавший осадок, представляющий собой альбуминовую фракцию белков гороха, отфильтровать.

3.Осадок на фильтре растворить в 5 мл дистиллированной воды. Получить раствор альбуминовой фракции белков.

4.Полученный раствор использовать для количественного определения альбуминовых белков.

II Выделение солерастворимых белков гороха (легумина).

1.В гороховой муке содержится глобулиновый белок легумин,

нерастворимый в воде, но растворимый в растворах нейтральных солей.

2.5 г гороховой муки залить 20 мл 10% раствора сульфата аммония и экстрагировать в термостате в течение 20 мин при температуре 30°C (при постоянном перемешивании). Полученный раствор фильтровать через складчатый фильтр, смоченный раствором соли. Получить фильтрат.

3.Добавить к 1 мл фильтрата 1 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Выпавший осадок легумина отфильтровать и растворить на фильтре в 1 мл 10% раствора хлорида натрия. Получить раствор легумина.

4.Полученный раствор (п.2) использовать для количественного определения легумина.

Выделение белков молока

I Выделение казеина.

1.В колбу объемом 100 мл налить 25 мл молока и 25 мл дистиллированной воды. Содержимое колбы хорошо перемешать и добавить по каплям 5 мл 3% раствора уксусной кислоты. Полученную смесь снова хорошо перемешать и оставить в покое на 5-10 мин. Осадок казеина отфильтровать.

2.Полученный фильтрат (сыворотка), содержащий сывороточные белки, нейтрализовать, добавив сухого бикарбоната натрия до прекращения выделения углекислого газа, и использовать для выделения солерастворимых белков молока.

3.Выпавший казеин промыть на фильтре водой и растворить в 10 мл 1% раствора едкого натра.

4.Полученный раствор использовать для количественного определения альбуминовых белков.

II Выделение солерастворимых белков молока.

1.В пробирку внести 5 мл фильтрата (после выделения казеина), добавить равный объем насыщенного раствора серноуксусной кислоты (для достижения полунасыщения). Выпавший осадок глобулиновых белков молока оставить на 5-10 мин, а затем отфильтровать. Фильтрат использовать

для выделения водорастворимых белков молока.

2. Выпавшие глобулины растворить на фильтре в 5 мл 1% раствора хлорида натрия. Получить раствор.

3. Полученный раствор использовать для количественного определения глобулиновых белков.

III Выделение водорастворимых белков молока.

1. Полученный после извлечения глобулиновых белков молока фильтрат насытить сухим порошком сернокислого аммония. Для этого при перемешивании добавить тонкоизмельченный порошок сульфата аммония. Раствор следует слегка подогреть на водяной бане при температуре не выше 40°C до прекращения растворения сульфата аммония.

2. Вторично выпавший осадок представляет собой альбуминовую фракцию белков молока. Альбумины отфильтровать и полученный осадок растворить на фильтре в 5 мл дистиллированной воды.

3. Полученный раствор использовать для количественного определения альбуминов молока.

Выделение белков мышечной ткани

I Выделение водорастворимых белков мышечной ткани.

1. В ступке растереть 10 г мышечной ткани.

2. В плоскодонную колбу объемом 100 мл поместить 2 г гомогенизированной мышечной ткани, залить 12 мл дистиллированной воды и экстрагировать в термостате при температуре 300°C в течение 15 мин (при постоянном перемешивании). При этом в раствор переходят альбуминовые фракции белков мышечной ткани (миоген, миоальбумин, миоглобин, глобулин X).

3. Водорастворимой фракции белков мышечной ткани дать отстояться 2-3 мин, осадок отфильтровать через два слоя марли, положенной на воронку. Получить фильтрат. Промытый водой осадок мышечной ткани оставить для выделения глобулинов.

4. Полученный фильтрат использовать для количественного

определения альбуминовых белков.

II Выделение солерастворимых белков мышечной ткани.

1. Оставшуюся на марле кашицу из мышечной ткани (после извлечения водорастворимых белков) отжать, перенести в фарфоровую ступку и растереть с 10 мл 10% раствора сульфата аммония для извлечения глобулиновой фракции белков. Полученному экстракту дать отстояться и отфильтровать. Получить фильтрат. Оставшийся осадок, содержащий белки стромы, используют для выделения белков мышечной ткани, растворимых в щелочах.

2. Полученный фильтрат, содержащий глобулиновую фракцию белков мяса, разделить на две части. Одну часть фильтрата использовать для количественного определения белков.

3. Для осаждения миозина ко второй части фильтрата (около 5 мл), содержащего глобулины мышечной ткани, добавить сухой порошок хлорида натрия при небольшом нагревании до полного насыщения, образовавшийся осадок, который представляет собой фибриллярный белок - миозин, спустя 5 мин отделить на центрифуге. Надосадочную жидкость декантировать, оставшийся на дне миозин растворить в дистиллированной воде, получить раствор.

4. Использовать раствор для количественного определения миозина.

III Выделение белков мышечной ткани, растворимых в щелочах.

1. Оставшийся после экстракции водо- и солерастворимых белков осадок перенести в плоскодонную колбу, залить 5 мл раствора 10% гидроксида натрия и поместить на 20 мин в кипящую водяную баню. Полученный раствор охладить и отфильтровать.

2. К 3 мл фильтрата добавить по каплям раствор 0,1 н уксусной кислоты для нейтрализации щелочи. Выпавший осадок, который представляет собой белки стромы, спустя 5 мин отфильтровать. К фильтрату добавить 1 мл биуретового реактива, объяснить полученный результат.

Количественное определение белков

Взять 1 мл исследуемого белоксодержащего раствора, добавить 4 мл биуретового реактива и оставить на 30 мин при комнатной температуре.

Измерить светопоглощение окрашенного раствора при $\lambda = 540$ нм на спектрофотометре относительно контрольного раствора. Содержание белка в пробе определить по калибровочному графику.

Массовую долю белка (Б, %) рассчитать по формуле:

$$Б = 100 \times C / 1000$$

где С – концентрация белка, найденная по калибровочному графику, мг/мл; 100 – коэффициент пересчета в проценты; 1000 – коэффициент перевода миллиграммов в граммы.

Оформление результатов работы

Записать в тетрадь ход работы

Оформить результаты работы в виде таблицы (табл. 1).

Таблица 1 Результаты анализа фракционного состава исследуемого белка

Исходный материал	Растворитель	Название растворимого белка	Из какого растворителя высаливается	Массовая доля в растворе, %

Лабораторная работа №2

Количественное определение белка по методам Лоури, Брэдфорда

Цель работы: освоить методы определения белка; определить содержание белка в крупах методом Лоури; определить содержание белка в растительном материале и в мышцах рыб методом Брэдфорда.

Реактивы: мука пшеничная, рисовая; гомогенизированная мышечная ткань рыб; вольфрамата натрия, молибдата натрия, дистиллированная вода, 85%-ный раствор ортофосфорной кислоты плотностью 1,869 г/см³, концентрированная соляная кислота; сульфат лития, бром, раствор NaOH по фенолфталеину; 2%-ный раствор Na₂CO₃ в 0,1 н растворе гидроксида натрия и

0,5%-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ном растворе цитрата натрия, чистый кристаллический альбумин, фосфатный буфер (pH 7,4), реактив Bradford (краситель Кумасси ярко-голубой (Coomassie Blue Brilliant G- 250), 96% этанол, 85% фосфорная кислота), проростки гороха, фасоли, пшеницы или ржи, трис-НСl (pH 7,5), мышечная ткань рыб.

Посуда и приборы: круглодонная колба вместимостью 2 дм³ с пришлифованным обратным холодильником, асбестовая сетка, коническая колба Эрленмейера, трубка Аллина, заполненная стеклянной ватой, склянки из темного стекла, пипетки, коническая колба с пробкой вместимостью 250 см³, кюветы, фарфоровые ступки с пестиками, центрифужные пробирки, пипетки на 0,025; 0,1; 0,5; 1 мл; мерные цилиндры или колбы на 50, 100, 500 и 1000 мл; пробирки на 3-10 мл, мерные цилиндры на 10 и 25 мл, дозаторы на 10-1000 мкл, стеклянные палочки, пинцеты, скальпели, ножницы, спектрофотометр, механический встряхиватель, центрифуга, фотоэлектроколориметр.

Теоретическая часть

Точный количественный анализ белка имеет важное значение для всех экспериментов, связанных с белками во множестве научно-исследовательских тем в области молекулярной биологии, клеточной биологии, биохимии, биологии развития и неврологии.

За последнее столетие были разработаны различные методы для количественного определения белков в определённом анализе, для определения общего содержания белка и для единичных белков.

Общие методы количественного анализа белка включают традиционные методы, такие как измерение УФ-поглощения при 280 нм, бицинониновой кислоты (БХК) и Брэдфорд анализ, а также альтернативные методы, такие как Лоури или новые аналитические методы, разработанные коммерческими фирмами. Обычно коммерческие поставщики предоставляют хорошо продуманный, удобный комплект для каждого типа анализа.

Индивидуальные методы количественного белка включают твердофазный иммуноферментный (ELISA) анализ, Вестерн-блоттинг, а совсем недавно, и масс-спектрометрию и другие методы.

Метод Лоури основан на реакции реактива Фолина с фенольными радикалами некоторых аминокислот, входящих в состав белков, в результате которой образуется соединение, придающее синюю окраску раствору белка. Интенсивность окрашивания зависит от массовой доли белка в исследуемом объекте. Преимуществом данного метода является его чувствительность, а главное, точность. Однако, этот метод требует больше времени, чем другие анализы, и многие соединения, обычно используемые в буферных растворах для приготовления белкового препарата (например, детергенты, углеводы, глицерин, трицин, ЭДТА, Трис) препятствуют анализу методом Лоури и образуют осадки. Тем не менее, влияние этих веществ может быть уменьшено путем разбавления образца, но только тогда, когда концентрация белка достаточно высока. Кроме того, было показано, что время для выполнения этого анализа можно уменьшить путем повышения температуры или использованием микроволновой печи. Метод обладает высокой чувствительностью и позволяет определять содержание белка при концентрации его в растворе от 10 до 100 мкг.

Метод Bradford

Это простой, быстрый, недорогой и чувствительный метод определения содержания белка, вследствие чего он является одним наиболее популярных. Его основное достоинство – чувствительность; метод позволяет надежно определять от 10 до 100 мкг/мл белка.

Метод основан на прямом связывании Кумасси G-250 с аминокислотными остатками аргинина, триптофана, тирозина, гистидина и фенилаланина в белке, причем с аргинином он связывается в восемь раз чаще, чем с другими аминокислотными остатками. Поэтому, если известно, что белок обогащен остатками аргинина (пример, гистон), то в качестве стандарта необходимо также использовать аргинин-богатый белок. Комплекс

Кумасси-аргинин имеет максимум поглощения при 595 нм, тогда как сам краситель в растворе – при 470 нм.

Спектры поглощения комплекса и чистого красителя перекрываются, поэтому очень важно следить за соотношением красителя и белка, так как их неконтролируемое изменение будет приводить к ошибкам измерения. Если по какой-то причине метод Bradford используется для определения белка в широком диапазоне концентраций (до 1500 мкг/мл), то очевидно, что калибровочный график не будет линейным. Однако, им можно пользоваться если «разбить» его на линейные отрезки с целью получения линейной зависимости для каждого участка.

Еще один аспект, возникающий при использовании этого метода – возможное взаимодействие компонентов буфера образца с красителем. Необходимо проверять реакцию буферной смеси, в которой находится белок, на взаимодействие с красителем. В случае взаимодействия, необходимо удалить эти компоненты из раствора.

При постановке реакции Bradford используют соотношение объема реактива Bradford к образцу равное 50:1 (минимально рекомендуемый объем соответствует 200 мкл реагента и 4 мкл образца).

Следует отметить, что для измерения лучше использовать стеклянные кюветы, так как на стенках кварцевых и пластиковых кювет адсорбируется значительное количество красителя.

Практическая часть

Ход анализа

I Определение белка с помощью флуориметра

1. Приготовьте рабочий раствор красителя QuDye Protein из расчета, что на каждый образец и на каждый из трёх стандартов потребуется около 200 мкл. Для этого разведите 200х концентрат красителя QuDye Protein в 200 раз буфером QuDye Protein.

Например, для измерения 2 образцов и 3 стандартов необходимо приготовить $200 \text{ мкл} \times 5 = 1000 \text{ мкл}$ рабочего раствора красителя (смешайте 5 мкл концентрата красителя QuDye Protein и 995 мкл буфера QuDye Protein).

! Рабочий раствор красителя рекомендуется использовать в течение нескольких часов после приготовления. При проведении отсроченных измерений рекомендуется беречь от света готовый рабочий раствор красителя.

! Для приготовления рабочего раствора красителя используйте только пластиковую посуду. Стеклоянная посуда может сорбировать на своих стенках краситель, что приведет к снижению концентрации красителя в образцах и искажению результатов измерений.

2. Подготовьте три тонкостенные, оптически прозрачные 0,5 мл пластиковые пробирки для стандартов и по одной пробирке для каждого измеряемого образца. Подпишите крышки пробирок (не делайте пометок на стенках пробирок, так как это может привести к некорректному определению интенсивности флуоресценции).

3. Внесите в отдельные пробирки по 190 мкл рабочего раствора красителя QuDye Protein и по 10 мкл каждого из трех стандартов, поставляемых в наборе. Перемешайте на вортексе 2–3 секунды, сбросьте капли.

4. Внесите в отдельные пробирки по 180–199 мкл рабочего раствора красителя QuDye Protein и по 20–1 мкл образца (конечный объём в каждой пробирке должен составить 200 мкл). Перемешайте на вортексе 2–3 секунды, сбросьте капли.

Разведение исследуемого образца опционально и зависит от его исходной концентрации. Исходная концентрация образца может находиться в диапазоне 12,5–5000 мкг/мл; однако после разведения образца в рабочем растворе красителя QuDye Protein количество белка должно соответствовать диапазону измерения флуориметра: 0,25–5 мкг белка в 200 мкл образца для измерения. Таким образом, образец с минимально допустимой исходной

концентрацией белка 12,5 мкг/мл следует разбавить в 10 раз до 1,25 мкг/мл (в пробирку для измерения внесите 180 мкл рабочего раствора красителя и 20 мкл образца 12,5 мкг/мл, что соответствует 0,25 мкг белка), а образец с максимально допустимой исходной концентрацией белка 5000 мкг/мл следует разбавить в 200 раз (в пробирку для измерения внесите 199 мкл рабочего раствора красителя и 1 мкл образца 5000 мкг/мл, что соответствует 5 мкг). В то же время следует избегать использования маленьких объёмов при разбавлении исходного образца, поскольку неточность пипетирования маленьких объёмов может сказаться на результатах измерений.

5.Инкубируйте все пробирки (содержащие стандарты и исследуемые образцы) 15 минут при комнатной температуре.

6.Проведите измерение интенсивности флуоресценции.

Следующие пункты следует выполнять согласно инструкции к флуориметру. В зависимости от версии флуориметра пункты меню могут отличаться от приведенных ниже.

- После включения прибора выберите пункт «Quant – It Protein». Нажмите «Go».
- При каждом новом приготовлении рабочего раствора красителя следует проводить калибровку флуориметра. Выберите пункт «Run new calibration» и нажмите «Go».
- Поместите в гнездо пробирку, содержащую стандарт #1, закройте крышку, нажмите «Go». Когда прибор проведет измерение (около 3 сек), удалите пробирку со стандартом #1.
- Поместите в гнездо пробирку, содержащую стандарт #2, закройте крышку, нажмите «Go». Когда прибор проведет измерение, удалите пробирку со стандартом #2.
- Поместите в гнездо пробирку, содержащую стандарт #3, закройте крышку, нажмите «Go». Когда прибор проведет измерение, удалите пробирку со стандартом #3.

- После успешного завершения калибровки поместите в гнездо пробирку с экспериментальным образцом, закройте крышку, нажмите «Go». На экране прибор покажет значение QF Value.
- Рассчитайте концентрацию белка по формуле: Концентрация белка в образце = QF Value x 200/объем образца; или введите объем образца в прибор.

II Определение белка в растительном материале методом Лоури

1. *Приготовление стандартного реактива Фолина.* 100 г вольфрамата натрия и 25 г молибдата натрия вносят в круглодонную колбу вместимостью 2 дм³ с пришлифованным обратным холодильником, добавляют 700 см³ дистиллированной воды, 50 см³ 85%-ного раствора ортофосфорной кислоты плотностью 1,869 г/см³ и 100 см³ концентрированной соляной кислоты; смесь кипятят на слабом огне на асбестовой сетке в течение 10 ч (можно с перерывом), охлаждают, переносят в коническую колбу Эрленмейера, стенки колбы и холодильник ополаскивают 50 см³ воды, затем туда же добавляют 150 г сульфата лития и 5 капель брома. Открытую колбу нагревают и кипятят под тягой на слабом огне 15–20 мин для удаления паров брома (раствор должен иметь желтую окраску, если раствор зеленый, то обработку бромом повторяют). После охлаждения раствор доводят дистиллированной водой до 1 дм³ и фильтруют через трубку Аллина, заполненную стеклянной ватой. Концентрацию кислоты проверяют, титрованием разбавленного в десять раз реактива Фолина 0,1 н. раствором NaOH по фенолфталеину. Приготовленный раствор хранят в склянке из темного стекла. Рабочий раствор Фолина готовят разведением основного раствора дистиллированной водой в два раза.

2. *Приготовление смешанного реактива.* 2%-ный раствор Na₂CO₃ в 0,1 н растворе гидроксида натрия и 0,5%-ный раствор CuSO₄·5H₂O в 1%-ном растворе цитрата натрия – натрия смешивают в соотношении объемов 50 : 1 в день проведения анализа (раствор годен в течение дня).

3. *Подготовка проб.* Взвешивают навеску массой 1,5–5 г (мука

пшеничная – 2 г, рисовая мука – 5 г) с погрешностью $\pm 0,01$ г в зависимости от содержания водорастворимого белка и помещают в коническую колбу вместимостью 250 см³, снабженную пробкой. В колбу добавляют пипеткой 100 см³ дистиллированной воды, смесь хорошо перемешивают и встряхивают на механическом встряхивателе в течение 60 мин.

4. Затем суспензию центрифугируют в течение 7–10 мин при частоте вращения 4–5 тыс. мин⁻¹. Водный экстракт белков осторожно сливают с осадка в пробирку и используют для анализа.

5. *Проведение испытаний.* В пробирку отмеривают пипетками 0,5 см³ белковой вытяжки, содержащей 50–500 мкг белка и 2,5 см³ смешанного реактива, перемешивают и через 10 мин добавляют к ней 0,25 см³ рабочего раствора Фолина. После 30 мин выдержки, необходимой для развития окраски, раствор переливают в кювету с толщиной слоя раствора 5 мм, определяют величину оптической плотности на фотоэлектроколориметре при длине волны 580 нм и содержании белка 50–500 мкг в 1 см³ или на спектрофотометре при длине волны 750 нм и содержании белка 10–15 мкг в 1 см³.

6. *Построение калибровочной кривой.* Для построения калибровочной кривой применяют белок, близкий по своей природе к исследуемому белку, приготавливая несколько растворов с точно известной массовой долей белка. Для этого в 100 см³ дистиллированной воды растворяют 100 мг взвешенного с погрешностью $\pm 0,0001$ г чистого кристаллического альбумина. В 1 см³ раствора содержится 1 мг белка. В 9 пробирок с меткой на 10 см³ отмеряют в возрастающих количествах приготовленный раствор белка в первую – 1 см³, во вторую – 2 см³ и так далее до 9 см³.

7. Объем в пробирках доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Определяют оптическую плотность полученных растворов. При построении калибровочной кривой на оси абсцисс откладывают содержание белка в растворе (в мг/см³), на оси ординат – величину оптической плотности.

8. *Обработка результатов.* По величине оптической плотности белковой вытяжки определяют массовую долю белка с помощью калибровочной кривой. Результат выражают в процентах на сухие вещества.

9. Сделать выводы по работе.

III Определение концентрации белка по методу Bradford в растительном материале

1. Используем клеточный лизат.

2. 0,1 мл раствора препарата, содержащего 0,01-0,1 мг испытуемого белка помещают в пробирки, прибавляют 5 мл реактива Bradford, перемешивают и оставляют при комнатной температуре в течение одинакового времени в интервале, как правило, 10 мин. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 595 нм. В качестве раствора сравнения вместо образца берут аналогичное количество буфера или экстрагирующего раствора. Содержание белка в пробе в мг/л определяют по калибровочному графику.

3. Измерения проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях.

4. Калибровочную кривую строят, используя бычий сывороточный альбумин (БСА) или яичный альбумин. Приготовление раствора БСА: 10 мг БСА растворить в 10 мл дистиллированной воды – концентрация раствора 1 мг/мл. Затем готовят второй стандартный раствор, для этого берут 1 мл первого стандартного раствора и 9 мл H₂O (общий объем этого раствора – 10 мл). Концентрация второго стандартного раствора 0,1 мг/мл. Из второго стандартного раствора готовят серию разведений в пробирках в соответствии со схемой (табл. 3).

5. Для построения калибровочного графика берут 0,1 мл соответствующего раствора белка, помещают в пробирки, прибавляют 5 мл реактива Bradford, перемешивают и оставляют при комнатной температуре в течение одинакового времени в интервале, как правило, 10 мин. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 595

нм. В качестве раствора сравнения вместо образца берут аналогичное количество буфера или экстрагирующего раствора. После определения оптической плотности по полученным цифрам строится калибровочная кривая. На оси абсцисс откладываются значения концентрации, по оси ординат - значения экстинции.

Таблица 1 Приготовление растворов белка для построения калибровочного графика

№ пробирки	Концентрация раствора белка (мкг/мл)	Количество исходного раствора белка в мкл	Количество H ₂ O в мкл
1.	10 мкг/мл	100	900
2.	20 мкг/мл	200	800
3.	30 мкг/мл	300	700
4.	40 мкг/мл	400	600
5.	50 мкг/мл	500	500
6.	60 мкг/мл	600	400
7.	70 мкг/мл	700	300
8.	80 мкг/мл	800	200
9.	100 мкг/мл	1000	-

6. Приготовление реактива Bradford. 100 мг красителя Кумасси яркоголубого (Coomassie Blue Brilliant G- 250) растворить в 50 мл 96% этанола. Затем к этому раствору, постоянно перемешивая его стеклянной палочкой, добавить 100 мл 85% фосфорной кислоты. При добавлении фосфорной кислоты окраска раствора из синего должна перейти в коричневый. В стакан объёмом 1 л налить 500-700 мл дистиллированной воды и медленно, помешивая воду стеклянной палочкой, добавлять в неё раствор, содержащий краситель Кумасси голубой, этанол и фосфорную кислоту. Довести раствор до 1 литра и оставить на ночь при комнатной температуре. После этого полученный раствор необходимо профильтровать. Реактив Bradford хранить в холодильнике в колбе из темного стекла с притёртой пробкой. При

длительном хранении (более 1 месяца) реактив необходимо повторно калибровать.

IV Определение концентрации белка по методу Bradford в мышцах рыб

1. Для анализа с помощью скальпеля и пинцета отобрать навеску мышечной ткани рыбы массой 0,1367г-0,2235г, взвешивая массу образцов на аналитических весах. Навеску поместить в пластиковую пробирку и измельчить ткань с помощью ножниц. После этого к ткани добавить буферный раствор трис-HCl (pH 7,5) и гомогенизировать в течение 2 минут с помощью гомогенизатора, используя стальные шарики. После гомогенизации методом центрифугирования в течение 30 минут образец разделить на растворимую и нерастворимую фракции. Для дальнейшего анализа использовать растворимую фракцию.

2. Для определения концентрации белка в мышцах рыб использовать приготовленный ранее в лаборатории реактив Бредфорд.

3. К 0,04 мл пробы добавить 2 мл реактива Бредфорд и на спектрофотометре определить оптическую плотность при длине волны 595 нм. Измерения проводить в кварцевых кюветах.

4. Для определения концентрации белка в тканях необходимо построить калибровочный график. Для этого приготовить стандартные растворы белка с известной концентрацией (Таблица 2), путем разбавления раствора белка с концентрацией 1 мг/л.

Таблица 2. Состав стандартных растворов белка

№ п/п	Конц. белка, мг/мл	Объем буфера, мл	Объем раствора белка, мл
1	0,1	0,9	0,1
2	0,2	0,8	0,2
3	0,3	0,7	0,3
4	0,4	0,6	0,4

5	0,5	0,5	0,5
6	0,6	0,4	0,6
7	0,7	0,3	0,7

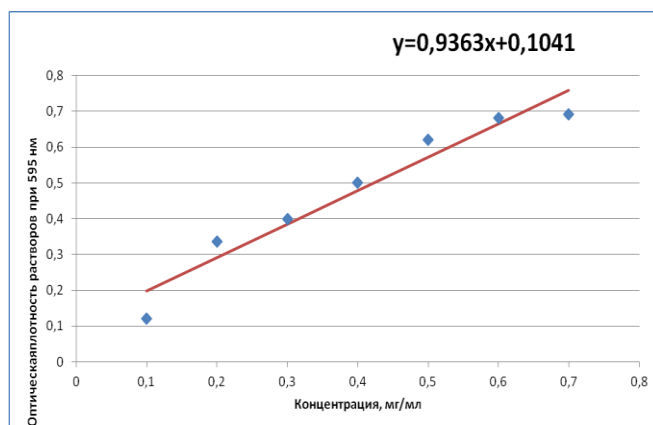
5.К 0,04 мл стандартного раствора белка добавить 2 мл реактива Брэдфорд и измерить на спектрофотометре оптическую плотность при длине волны 595 нм. По полученным данным построить калибровочную прямую (Рисунок 1). С помощью калибровочного графика, используя уравнение полученной прямой, рассчитать концентрацию белка в тканях с учетом разбавления.

6.Полученные данные обработать математически. Для вычисления концентрации белка с помощью калибровочного графика использовать функцию линейного уравнения:

$$y = 0,9363x + 0,1041, \text{ где}$$

y – оптическая плотность растворов при 595 нмх – концентрация белка, мг/л.

Исходя из уравнения, рассчитать концентрацию белка в пробах: $x = (y -$



$0,1041)/0,9363$

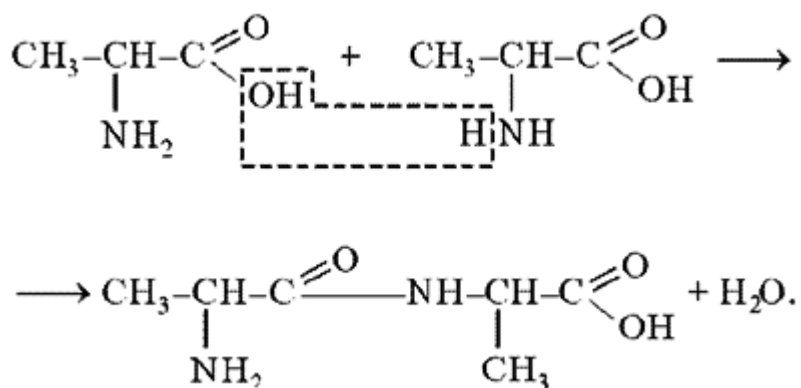
Рисунок 1 Пример калибровочной прямой

V Проведение качественных реакций на белки

• Реакция Пиотровского (биуретовая реакция)

В белках аминокислоты связаны друг с другом по типу полипептидов и дикетопиперазинов. Образование полипептидов из аминокислот происходит

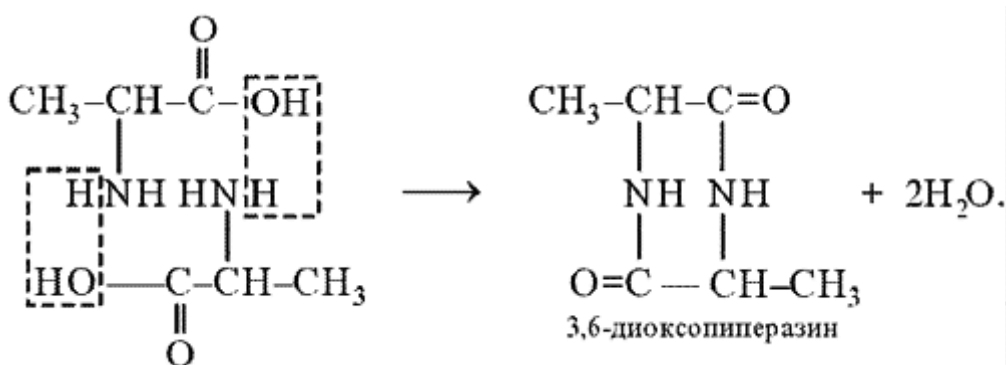
путем отщепления молекулы воды от аминогруппы одной молекулы аминокислоты и карбоксильной группы другой молекулы:



Образующаяся группа $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ называется пептидной группой, связь $\text{C}-\text{N}$, соединяющая остатки молекул аминокислот, – пептидной связью.

При взаимодействии дипептида с новой молекулой аминокислоты получается трипептид и т. д.

Дикетопиперазины образуются при взаимодействии двух молекул аминокислот с отщеплением двух молекул воды:



Дикетопиперазины были выделены из белков Н.Д. Зелинским и В.С. Садиковым в 1923 г.

Наличие в белке повторяющихся пептидных групп подтверждается тем, что белки дают фиолетовое окрашивание при действии небольшого количества раствора медного купороса в присутствии щелочи (биуретовая реакция).

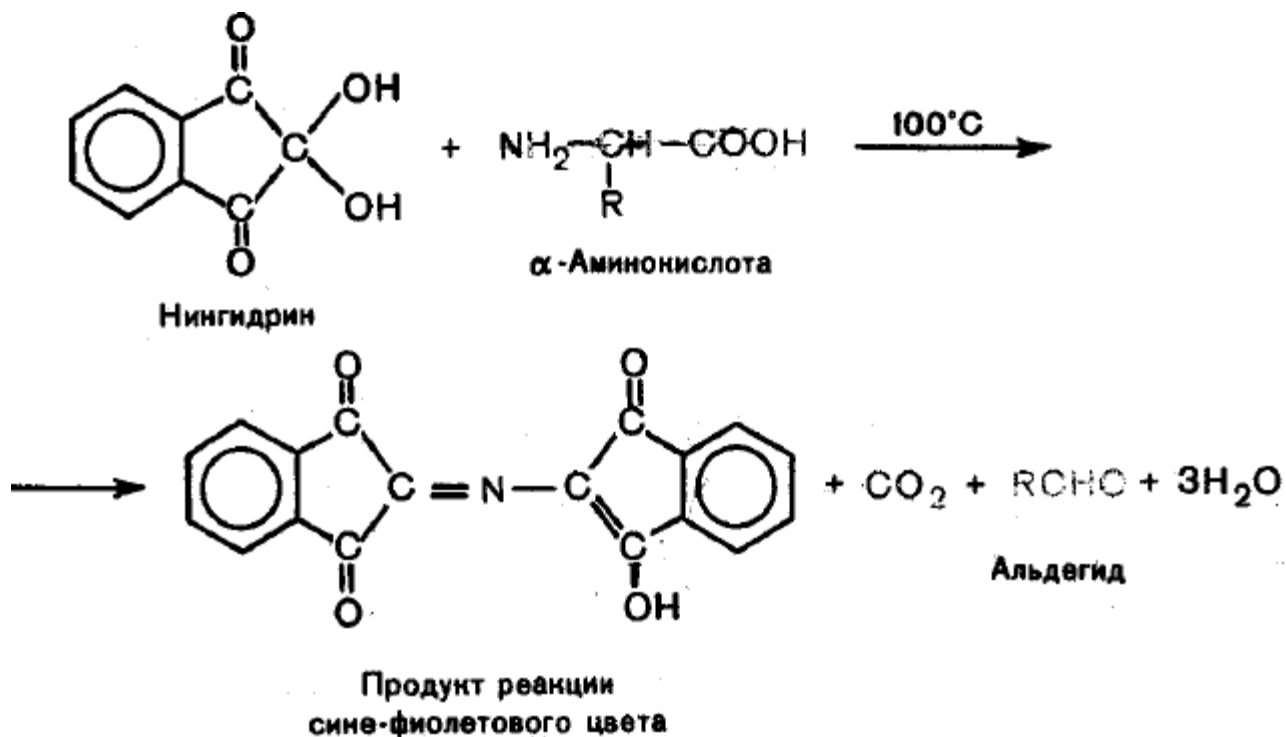
Описание опыта. 2–3 мл раствора белка нагревают с 2–3 мл 20%-го раствора едкого кали или натра и несколькими каплями раствора медного

купороса. Появляется фиолетовое окрашивание вследствие образования комплексных соединений меди с белками.

- **Реакция Руэмманна (нингидриновая реакция (1911))**

α -Аминокислоты реагируют с нингидрином, образуя сине-фиолетовый комплекс (пурпур Руэмманна), интенсивность окраски которого пропорциональна количеству аминокислоты.

Реакция идет по схеме:



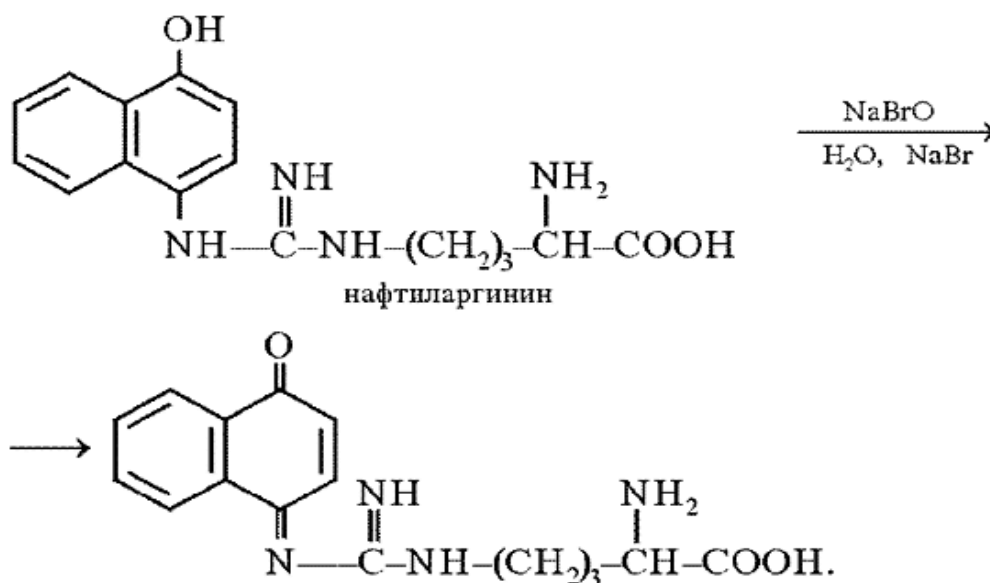
Реакция с нингидрином используется для визуального обнаружения α -аминокислот на хроматограммах (на бумаге, в тонком слое), а также для колориметрического определения концентрации аминокислот по интенсивности окраски продукта реакции.

Описание опыта. В пробирку наливают 1 мл 1%-го раствора глицина и 0,5 мл 1%-го раствора нингидрина. Содержимое пробирки осторожно нагревают до появления сине-фиолетового окрашивания.

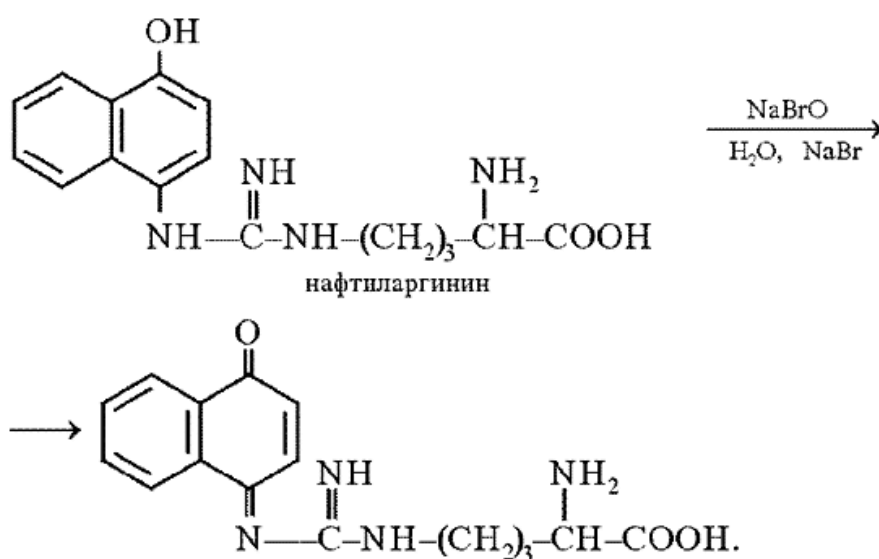
- **Реакция Сакагучи**

Эта реакция на аминокислоту аргинин основана на взаимодействии аргинина с α -нафтолом в присутствии окислителя. Ее механизм еще

полностью не выяснен. По-видимому, реакция осуществляется по следующему уравнению:



Поскольку производные хинониминов (в данном случае нафтохинона), у которых водород иминогруппы -NH- замещен на алкильный или арильный радикал, всегда окрашены в желто-красные тона, то, по-видимому, оранжево-красный цвет раствора при проведении реакции Сакагучи объясняется возникновением именно производного нафтохинонимина. Не исключена, однако, вероятность образования еще более сложного соединения за счет дальнейшего окисления оставшихся NH- групп аргининового остатка и бензольного ядра α -нафтола:

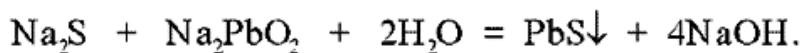
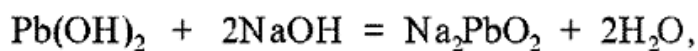
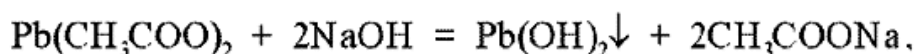
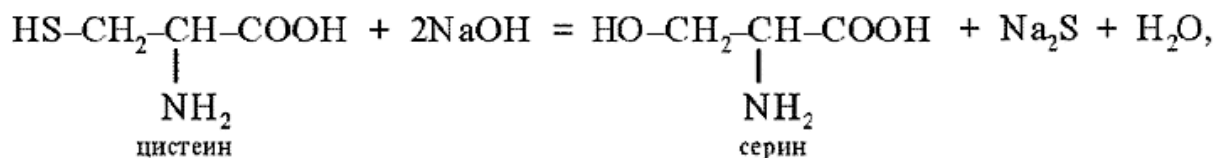


Описание опыта. В пробирку наливают 2 мл 0,01%-го раствора аргинина, затем добавляют 2 мл 10%-го раствора едкого натра и несколько капель 0,2% спиртового раствора α -нафтола. Содержимое пробирки хорошо перемешивают, приливают 0,5 мл раствора гипобромита и вновь перемешивают. Немедленно добавляют 1 мл 40%-го раствора мочевины для стабилизации быстро развивающегося оранжево-красного окрашивания.

- **Реакция Фоля**

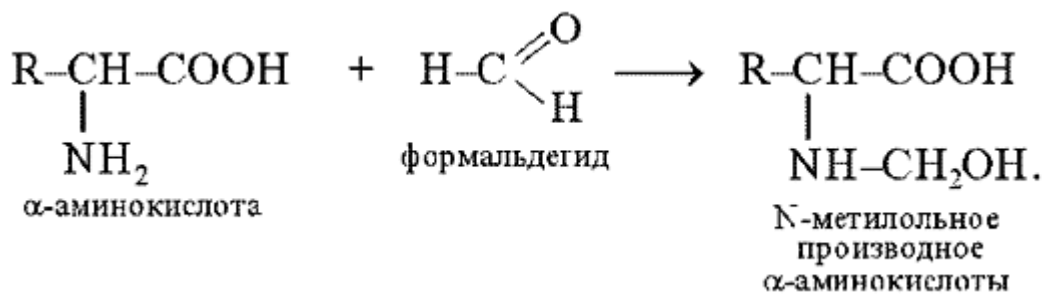
Это реакция на цистеин и цистин. При щелочном гидролизе «слабосвязанная сера» в цистеине и цистине достаточно легко отщепляется, в результате чего образуется сероводород, который, реагируя со щелочью, дает сульфиды натрия или калия. При добавлении ацетата свинца(II) образуется осадок сульфида свинца(II) серо-черного цвета.

Описание опыта. В пробирку наливают 1 мл раствора цистина, прибавляют 0,5 мл 20%-го раствора гидроксида натрия. Смесь нагревают до кипения, а затем добавляют 0,5 мл раствора ацетата свинца(II). Наблюдается выпадение серо-черного осадка сульфида свинца(II):



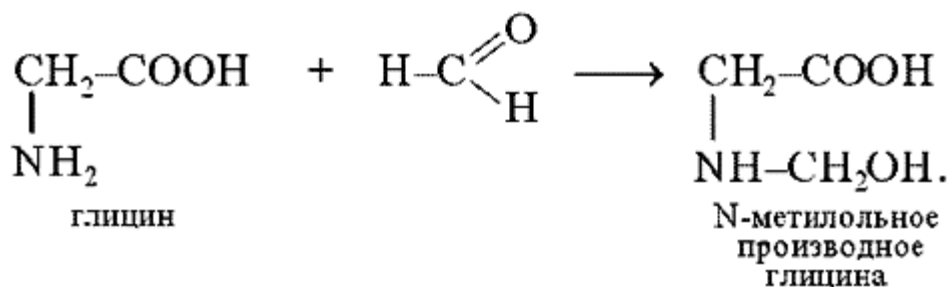
- **Реакция с формальдегидом**

При взаимодействии α -аминокислот с формальдегидом образуются относительно устойчивые карбиноламины – N-метилольные производные, содержащие свободную карбоксильную группу, которую затем титруют щелочью:



Эта реакция лежит в основе количественного определения α -аминокислот методом формального титрования (метод Сёренсена).

Описание опыта. В пробирку наливают 5 капель 1%-го раствора глицина и прибавляют 1 каплю индикатора метилового красного. Раствор окрашивается в желтый цвет (нейтральная среда). К полученной смеси добавляют равный объем 40%-го раствора формальдегида (формалин). Появляется красное окрашивание (кислая среда):



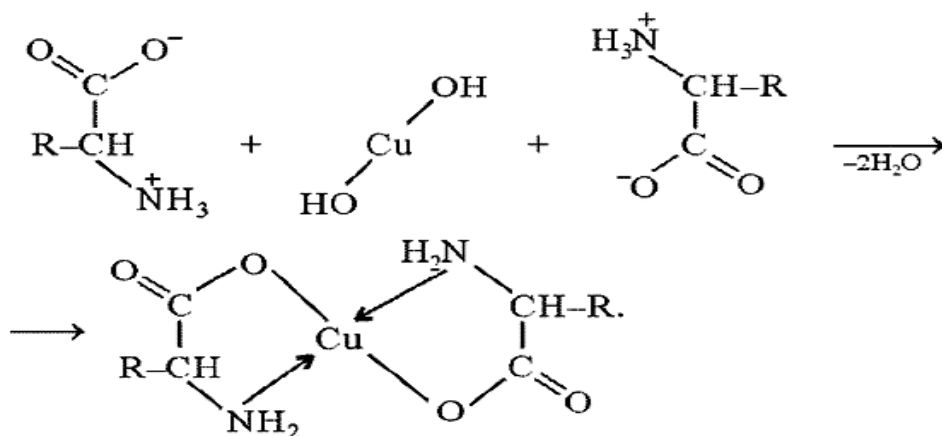
- **Реакция Циммермана**

Это реакция на аминокислоту глицин.

Описание опыта. К 2 мл 0,1%-го раствора глицина, доведенного добавлением 10%-го раствора щелочи до pH = 8, приливают 0,5 мл водного раствора о-фталевого диальдегида. Реакционная смесь начинает медленно окрашиваться в ярко-зеленый цвет. Через несколько минут выпадает зеленый осадок.

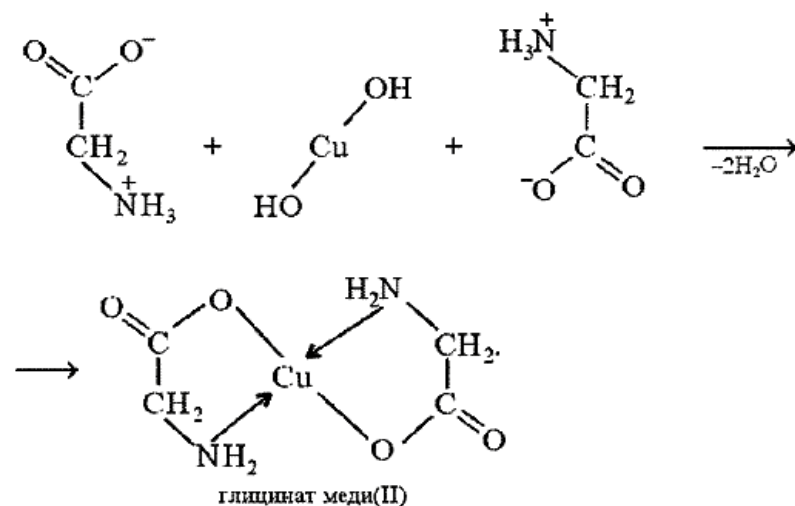
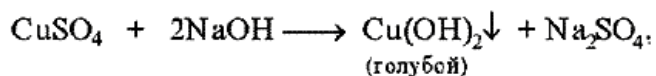
- **Образование комплексов с металлами**

α -Аминокислоты образуют с катионами тяжелых металлов внутрикомплексные соли. Со свежеприготовленным гидроксидом меди(II) все α -аминокислоты в мягких условиях дают хорошо кристаллизующиеся внутрикомплексные (хелатные) соли меди(II) синего цвета:



В таких солях ион меди координационными связями соединен с аминогруппами.

Описание опыта. В пробирку наливают 3 мл 3%-го раствора сульфата меди (II), добавляют несколько капель 10%-го раствора гидроксида натрия до образования голубого осадка. К полученному осадку гидроксида меди(II) приливают 0,5 мл концентрированного раствора глицина. При этом образуется темно-синий раствор глицината меди:

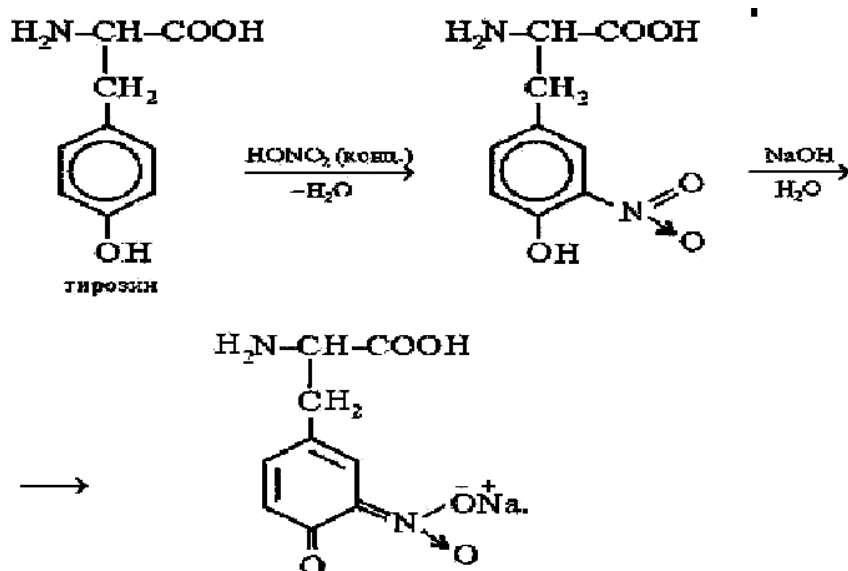


• Ксантопротеиновая реакция

Эта реакция используется для обнаружения α-аминокислот, содержащих ароматические радикалы. Тирозин, триптофан, фенилаланин при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образуют нитропроизводные, имеющие желтую окраску. В щелочной среде

нитропроизводные этих α -аминокислот дают соли, окрашенные в оранжевый цвет.

Описание опыта. В пробирку наливают 1 мл раствора тирозина и добавляют 0,5 мл концентрированной азотной кислоты. Смесь нагревают до появления желтой окраски. После охлаждения добавляют 1–2 мл 20%-го раствора гидроксида натрия до появления оранжевой окраски раствора:



- **Осаждение белка солями тяжелых металлов**

Описание опыта. В две пробирки наливают по 1–2 мл раствора белка и медленно, при встряхивании, добавляют по каплям в одну пробирку насыщенный раствор сульфата меди, а в другую – 20%-й раствор ацетата свинца. Образуются осадки труднорастворимых солеобразных соединений белка. Опыт иллюстрирует применение белка как противоядия при отравлении солями тяжелых металлов.

- **Открытие аминного азота в белках**

Описание опыта. В сухую пробирку помещают немного сухого белка, например, желатины. Прибавляют пятикратное количество натронной извести (смесь едкого натра и гидроксида кальция), перемешивают встряхиванием и подогревают. Выделяется аммиак, вызывающий посинение розовой лакмусовой бумажки, смоченной водой. Одновременно ощущается запах жженого волоса, что всегда наблюдается при сжигании белковых веществ.

- **Открытие серы в белках**

Описание опыта. В пробирку наливают около ~0,5 мл раствора уксуснокислого свинца и прибавляют раствор едкого кали до растворения образовавшегося осадка гидроксида свинца. В другую пробирку наливают ~2–3 мл раствора белка и приливают такой же объем полученного раствора плюмбита. Нагревают смесь до кипения в течение 2–3 мин. Появление темного окрашивания указывает на образование сульфида свинца.

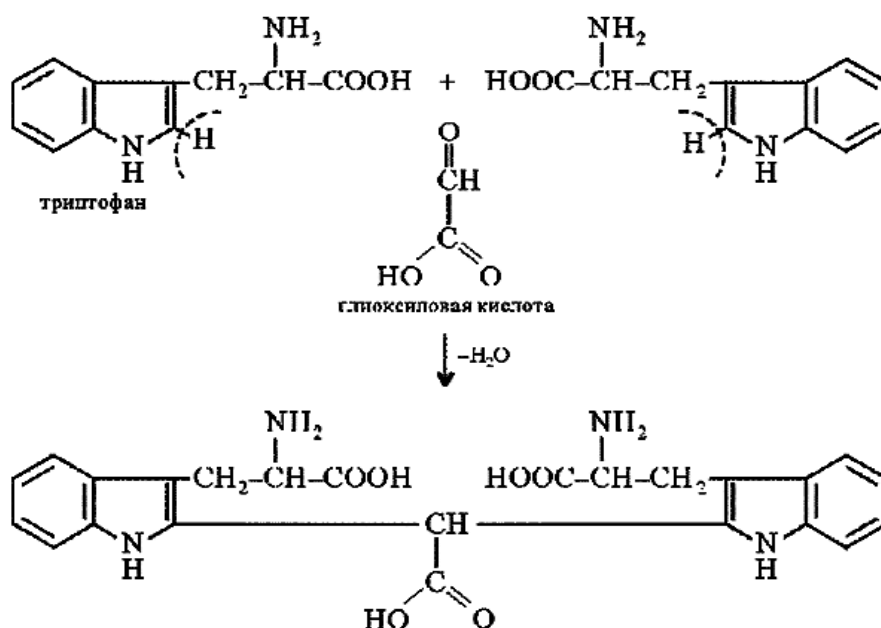
- **Реакция на присутствие серосодержащих α -аминокислот в белке**

Качественной реакцией на серосодержащие α -аминокислоты является реакция Фоля. Белки, содержащие остатки цистеина или цистина, также дают эту реакцию.

Описание опыта. В пробирку наливают 10 капель раствора яичного белка и вдвое больший объем 20%-го раствора гидроксида натрия. Содержимое пробирки нагревают до кипения (1-2 мин). К полученному щелочному раствору добавляют 5 капель раствора ацетата свинца(II) и вновь кипятят реакционную смесь. Наблюдается появление серо-черного осадка.

- **Реакция на триптофан**

Триптофан, реагируя в кислой среде с альдегидами, образует окрашенные продукты конденсации. Например, с глиоксиловой кислотой (являющейся примесью к концентрированной уксусной кислоте) реакция протекает по уравнению:



По аналогичной схеме протекает и реакция триптофана с формальдегидом.

Лабораторная работа 3. Определение структуры и молекулярной массы белка методом электрофореза в ПААГ с ДСН

Цель работы: освоить метод определения структуры и молекулярной массы белка с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН.

Реактивы: запасной раствор акриламида (З.Р.А - 30%); N,N-метиленбисакриламид (З.Р бис-А - 0,7% ; С 2,4); буфер для разделяющего геля (б-р Р.Г.×4): 1,5 М трис - НСl (рН 8,8)/0,4% ДДС-Na; буфер для концентрирующего геля (б-р К.Г.×4): 0,5 М трис-НСl (рН 6,8)/0,4% ДДС-Na; 10% раствор персульфата аммония (ПСА); раствор ТЕМЕДа; буфер для добавления к пробам (×10): 0,625 М трис-НСl (рН 6,8), 20% ДДС- Na; раствор БФС (бромфеноловый синий): 50% глицерин, 0,25% БФС; электродный буфер: 0,025 М трис-НСl, 0,192 М глицин, 0,1% ДСН.

Посуда и приборы: прибор для электрофореза, блок питания. Стаканы мерные: 50мл, 100мл; пипетки переменного объема для нанесения образца (50 мкл); наконечники для пипеток. Линейка, карандаш, стеклянные палочки.

Теоретическая часть

В настоящее время электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) является общепринятым

методом при определении гомогенности белков, определения их молекулярной массы и очистки (препаративный электрофорез)

Особенности электрофореза белков. Белки – это цвиттер-ионы, т.е. молекулы, имеющие и положительно (+) заряженные и отрицательно (-) заряженные радикалы. Поэтому молекула белка в растворе при любом рН, отличным от изоэлектрической точки, имеет определенный преобладающий заряд (+) или (-) и мигрирует к соответствующему полюсу в постоянном электрическом поле. Этот метод начала XX века получил название электрофорез с подвижной границей.

Позднее был разработан **метод ступенчатого электрофореза (диск-электрофорез (от англ. «discontinuous» - прерывистый))**. Отличительная особенность диск-электрофореза - это полимеризация на пластине двух гелей: рабочего (мелкопористого) и над ним – «формирующего» (крупнопористого) геля. Диск-электрофорез – метод, сочетающий в себе разделение белков по их общему электрическому заряду, по величине молекулярной массы и по форме. Использование двухслойного носителя с различным размером пор и двух буферов, отличающихся между собой по составу и рН, обеспечивает концентрирование исследуемых белков в узкой стартовой зоне. *Это важно для чёткого разделения смеси белков.*

Полиакриламид. Раствор, в котором мигрируют белки, удерживается сеткой полиакриламидного геля (ПААГ). ПААГ служит при электрофорезе поддерживающей средой и принимает активное участие в процессе разделения макромолекул благодаря эффекту молекулярного сита.

В качестве носителя при диск-электрофорезе используют ПААГ, который имеет структуру трехмерной сетки. Получают его сополимеризацией акриламида и сшивающего агента N,N'- метиленбисакриламида. Подбирая соответствующую концентрацию акриламида получают гель с нужным размером пор. При работе с глобулярными белками пользуются соотношением между средней молекулярной массой белков (M) и

концентрацией (С) акриламида, которую надо взять для полимеризации, например, (см. табл.):

М	С, %
10000 – 30000	15,0 – 30,0
30000 – 100000	7,5 – 15,0

В качестве катализаторов при получении ПААГ - геля используют персульфат аммония (инициатор) и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) (катализатор). Варьируя концентрацией полимера можно получить гели с широким диапазоном пор.

Для удобства изложения используются следующие обозначения: **Т** - процентное отношение *суммарной* массы обоих мономеров к *объему* их раствора, **С** – процентное отношение массы метиленбисакриламида (Бис) к общей массе обоих мономеров. Для крупнопористых гелей, чтобы увеличить степень сшивки линейных полимеров акриламида отношение акриламида/Бис должно составлять, от 35:1 до 20:1. Процентное содержание мономеров определяется по формуле: $T = (a + b) / M \times 100\%$, количество сшивающего агента в % от общего количества мономеров определяется по формуле: $C = b / (a + b) \times 100\%$, где **Т** - процентное содержание мономеров; **С** - процентное количество (концентрация) сшивающего агента; **а** – количество акриламида, (г); **б** – количество бис-акриламида, (г); **М** – объём буфера, (мл). Правильно подобранные соотношения акриламида и бис-акриламида важны для качества фракционирования, окрашивания, высушивания и т.д.

Для расчёта оптимального соотношения акриламида и бис-акриламида можно использовать эмпирическую формулу: $C = 6,5 - 0,3T$, которая обеспечивает приемлемые гели в диапазоне $T = 5 - 20 \%$.

На практике для исследования белков часто **Т** составляет 30 %, а **С** - 2,6 %. Чтобы приготовить растворы используют следующий расчет:

<p>Количество Бис $\rightarrow T \times C / 100 = 30 \times 2,6 / 100 = 0,76$ г. Количество акриламида $\rightarrow 30$ г - 0,76 г = 29,24 г.</p>
--

Навески акриламида и бис-акриламида растворяют в 100 мл дН₂О.

Характеристика миграции белков. Электрофоретическая подвижность биополимеров в геле (Rf') пропорциональна их подвижности в свободной жидкости (Rf_0), которая определяется отношением суммарного заряда макромолекулы к её массе. Фактором, обуславливающим отличие Rf' от Rf_0 , является сила трения о гель. Сила трения зависит от соотношения линейных размеров белков и пор геля, и, следовательно, от молекулярных масс белков. Молекулярные массы большинства белков не превышают 500000, поэтому использование гелей агарозы не целесообразно. Как правило, электрофорез белков проводят в ПААГ, содержащем от 5% до 20 % акриламида.

Как говорилось выше, белки являются цвиттер-ионами. Их суммарным зарядом, а, следовательно, и отношением заряда к массе можно управлять изменением рН буфера, в котором полимеризуется ПААГ и ведется электрофорез. Оптимальное значение рН рабочего буфера обуславливает не максимальный заряд, а максимальное различие зарядов разных белков, составляющих смесь. Таким образом, рН рабочего буфера не должно слишком отличаться от изоэлектрических точек всех белков смеси (при изоэлектрической точке все белки имеют нейтральный заряд). Для кислых белков оптимальные значения рН – нейтральное или слабощелочное. Белки мигрируют от катода (-) к аноду (+). Для щелочных белков (гистонов, белков рибосом и т.д.) целесообразно использовать слабокислые буферы (рН = 4 – 5). Эти белки различаются по величине суммарного положительного заряда и мигрируют в направлении от анода (+) к катоду (-). Обычно скорость миграции зависит от трех параметров анализируемых белков: величины молекул, формы молекул и суммарного заряда.

Для однозначного определения молекулярной массы белка по скорости его миграции при электрофорезе полипептидную цепочку распрямляют (рис. 1). Такой приём используется при электрофорезе белков, обработанных додецилсульфатом натрия (ДСН - $C_{12}H_{25}OSO_3Na$)

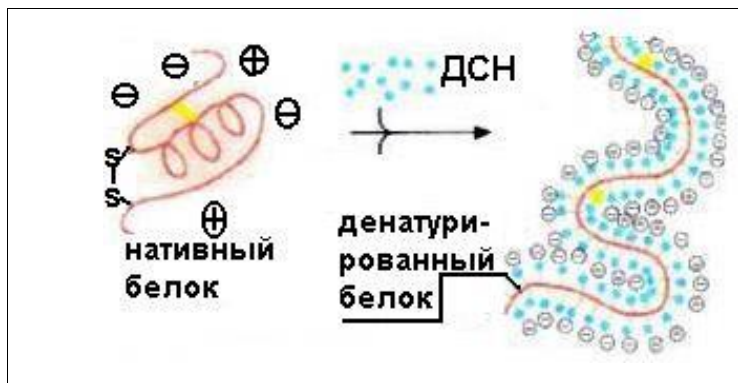


Рисунок 1 Схема электрофореза белка

Разделение белков по размеру с использованием додецилсульфата натрия (ДСН). Суть метода. Электрофорез в ПААГ-ДСН позволяет фракционировать белки только по молекулярной массе. Для этого белки обрабатывают трёхкратным избытком ДСН-Na (1,4 мг ДСН-Na на 1 мг белка). Под действием ДСН олигомерные белки диссоциируют на субъединицы и денатурируют. Постоянство соотношения детергент/белок делает постоянным отношение (-) заряда к массе любого белка. Благодаря электрическому отталкиванию остатков серной кислоты на поверхности белка полипептидная цепочка распрямляется и приобретает форму жёсткого эллипсоида вращения (рис. 2).



Рисунок 2 Схематичное изображение полипептидной цепочки после добавления ДСН

Размер малой оси эллипсоида равен 1,6 нм, большой - линейно связан с числом аминокислотных остатков, т.е. с молекулярной массой. Электрофоретическая подвижность (R_f) связана с молекулярной массой белка (M) соотношением: $R_f = A - B \lg M$, где A и B – коэффициенты пористости геля и др. условий.

Величину электрофоретической подвижности (R_f) определяют в относительных единицах, выражающих отношение пути миграции белка к

миграции бромфенолового синего за время электрофореза. Одновременно проводят электрофорез белков-«маркёров», молекулярные массы которых известны.

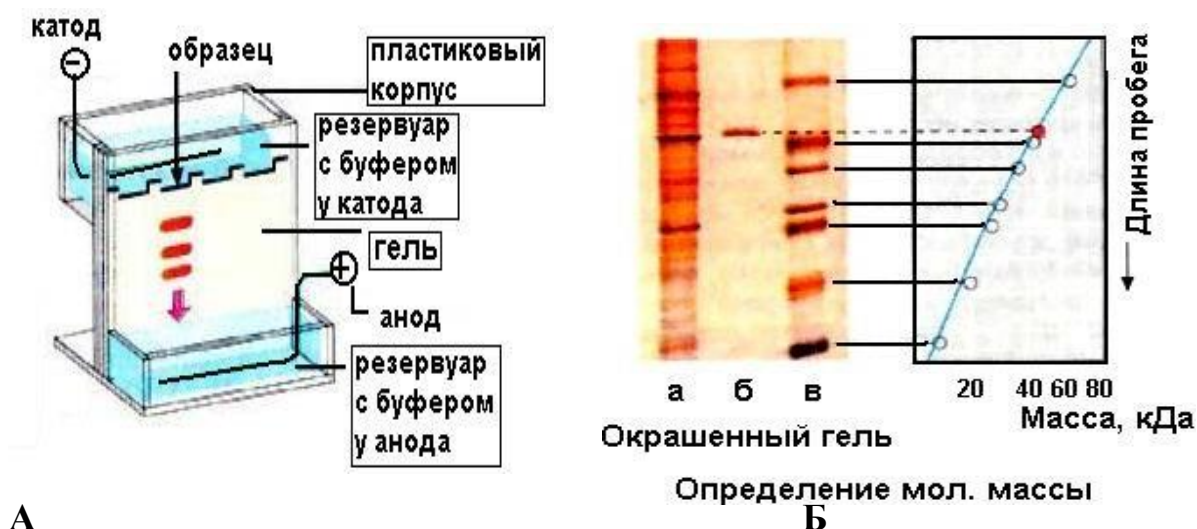


Рисунок 3 Схема электрофореза: А - камера для электрофореза, Б - электрофореграмма трех препаратов.

Электрофорез проводят в тонком слое полиакриламида. После завершения электрофореза, зоны белков выявляют с помощью красителя.

В качестве примера на рис. 3 Б приведена электрофореграмма трех препаратов: клеточного экстракта, содержащего сотни белков (а); выделенного из экстракта гомогенного белка (б); контрольной смеси белков с известными молекулярными массами (в).

Двумерный электрофорез белков - способ разделения сложных смесей белков, в котором сочетаются электрофорез белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и изоэлектрическое фокусирование. Этот метод увеличивает разрешение одномерного геле-электрофореза, а также позволяет исследовать неканонические структуры, возникающие в сверхспирализованной молекуле кольцевой ДНК. Оценить размер молекул помогут маркеры молекулярных масс. Последующая детекция на гельдокументирующих системах позволит визуализировать результат.

Для автоматического препаративного электрофореза - при отделении необходимого фрагмента автоматически – используются системы препаративного электрофореза для разделения и выделения ДНК/РНК/белков серии Pirpin, производства Sage Science.

Капиллярный электрофорез (КЭ) - интенсивно развивающийся метод разделения сложных смесей, позволяющий анализировать ионные и нейтральные компоненты различной природы с высокой экспрессностью и уникальной эффективностью.

В основе капиллярного электрофореза лежат электрокинетические явления - электромиграция заряженных частиц и электроосмос. Эти явления возникают в растворах при помещении их в электрическое поле, преимущественно, высокого напряжения. Если раствор находится в тонком капилляре, например, в кварцевом, то электрическое поле, наложенное вдоль капилляра, вызывает в нем движение заряженных частиц и пассивный поток жидкости, в результате чего проба разделяется на индивидуальные компоненты, так как параметры электромиграции специфичны для каждого сорта заряженных частиц. В то же время, такие возмущающие факторы, как диффузионные, сорбционные, конвекционные, гравитационные и т. п., в капилляре существенно ослаблены, благодаря чему достигаются рекордные эффективности разделений.

Практическая часть

Ход анализа

1.Собрать стеклянную камеру для электрофореза (рис. 4). Камера состоит из подставки для стекол, двух стеклянных пластин разной толщины, пластиковых прокладок, которые устанавливаются между стеклами (толщина геля) и резиновых прокладок (2-короткие, 2-длинные).

2.После сборки обязательно проверить камеру на герметичность: для этого залить в нее dH_2O .

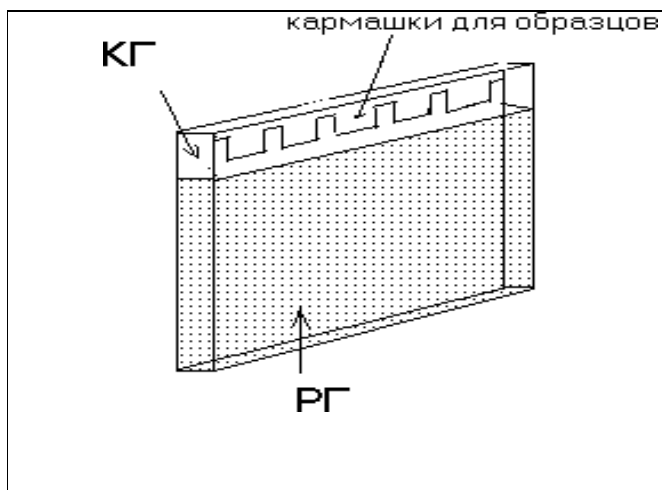


Рисунок 4 Стекло́нная камера для электрофореза. КГ - концентрирующий гель, РГ - разделяющий гель

3. Приготовить 8%-ный разделяющий гель (Р.Г.):

З.Р.А. → 5,5 мл,

дН₂О → 9,5 мл,

б-р Р.Г. → 5,0 мл,

ТЕМЕД → 100 мкл,

10% ПСА → 100 мкл.

4. Залить РГ в стеклянную камеру, не доводя до верха 2 см.

5. Наслоить поверх геля дН₂О (полимеризация геля 10-20 мин)

6. Приготовить 4,5% концентрирующий гель (К.Г.):

З.Р.А. → 1,0 мл,

дН₂О → 2,75 мл,

б-р К.Г. → 1,25 мл,

ТЕМЕД → 50 мкл,

10% ПСА → 50 мкл.

7. Вылить К.Г. на поверхность Р.Г. и вставить гребёнку.
(Полимеризация ≈ 5 мин).

8. Установить стеклянную камеру в аппарат для электрофореза.

9. Налить электродный буфер по обе стороны геля. «Кармашки» должны быть в буфере со знаком (-).

10. Убрать гребёнку, вынуть заднюю (длинную) резинку, чтобы открыть доступ к буферу со знаком (+) нижней части геля.

11. Подготовка образцов. Смешать в пробирках «Эппендорф»:

образец (1 мг/мл) X → 50 мкл

буфер для проб → 5 мкл

БФС → 5 мкл

12. Пробу прогреть в водяной бане при 96°C в течение 3 мин, с последующим охлаждением до 20°C.

13. Режим проведения электрофореза:

Установить ток 10 мА. Внести в кармашки по 20 мкл проб. (Каждую пробу вносить новым наконечником. Записать № кармашка и тип образца.)

Электрофорез ведётся при постоянной силе тока. До входа образцов в Р.Г. – ток 20 мА, основной режим – 40-45 мА. Когда полоса БФС дойдёт до границы геля, электрофорез остановить.

14. Фиксация белков в геле. После электрофоретического разделения буфер слить, стеклянную камеру с гелем, разъединить стекла и гель поместить в кристаллизатор, содержащий раствор 7% уксусной кислоты и 20% спирта (1ч – 24ч).

15. Окраска белков:

– Слить фиксирующий раствор.

– Отмыть гель в дН₂О 4 раза по 5 мин (на качалке).

– Налить краситель Кумасси, содержащий 9% уксусной кислоты/40 % этилового спирта/ 0,25% Comassie G-250. Время окраски 10-30 мин.

– Краску слить, промыть гель 3 раза по 5 мин (на качалке). При необходимости отмывать гель до снятия фона и проявления синих полос.

16. Оценка результатов:

– Зарисовать полученную картину распределения белков (полосы) после электрофореза.

– Определить молекулярную массу неизвестного образца – X:

–Измерить путь, пройденный бромфеноловым синим (гБФС в см) и маркерами молекулярных масс.

$$\text{Определить } Rf_{\text{БСА}} = \frac{r_{\text{БСА}}}{r_{\text{БФС}}} = \frac{2\text{см}}{10\text{см}} = 0,2$$

$$\text{Определить } Rf_{\text{ЯА}} = \frac{r_{\text{ЯА}}}{r_{\text{БФС}}} = ?$$

$$\text{Определить } Rf_{\text{Л}} = \frac{r_{\text{Л}}}{r_{\text{БФС}}} = ?$$

–Построить график зависимости логарифма молекулярной массы белков ($\lg M$) от относительного расстояния миграции (Rf) белков-маркёров (рис. 6).

–На графике по горизонтали найти Rf -маркеров; по вертикали найти $\lg M$ (табличные данные):

Белок	Мол. масса, Да	$\lg M$
БСА	68000	4,84
Альбумин	43000	4,63
Лизоцим	13900	4,14

–В точках пересечения $\lg M$ и Rf ставим точки (o) и проводим прямую (рис.

б).

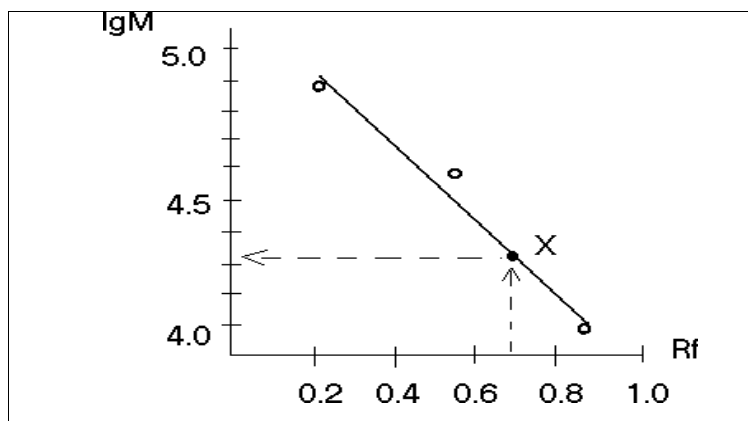


Рисунок 5 График зависимости логарифма молекулярной массы ($\lg M$) белка от его электрофоретической подвижности (Rf).

–Измерить r_X , пройденный X-белком, и определить $Rf = r_X / r_{\text{БФС}}$.

–Спроецировать положение точки X на вертикальную прямую и определить $\lg M$ X-белка и вычислить по таблице или на калькуляторе молекулярную массу.

Лабораторная работа №4. Определение специфичных белков в образце с помощью вестерн-блоттинга

Цель работы: освоить методы определения специфичных белков с помощью вестерн-блоттинга.

Реактивы: Лизирующие буферы можно хранить при температуре 4°C в течение нескольких недель или аликвотировать и хранить при температуре -20°C до года. Буфер NP-40: 150 мМ NaCl, 1,0% NP-40 (можно заменить на 0,1% Triton X-100), 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, ингибиторы протеазы; буфер RIPA (буфер для радиоиммунопреципитации): 150 мМ NaCl, 1,0% NP-40 или 0,1% Triton X-100, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% SDS (додецилсульфат натрия), 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, ингибиторы протеазы; Tris-HCl: 20 мМ Tris-HCl, ингибиторы протеазы; буфер Laemmli 2X/загрузочный буфер: 4% SDS, 10% 2-меркаптоэтанола, 20% глицерина, 0,004% бромфенолового синего, 0,125 М Tris-HCl, pH должен быть 6,8! рабочий буфер (Tris-Glycine/SDS): 25 мМ Tris-основание, 190 мМ глицин, 0,1% SDS, pH должен быть 8,3! Переносной буфер (влажный): 25 мМ Tris-основание, 190 мМ глицин, 20% метанола, pH должен быть 8,3! Для белков размером более 80 кДа рекомендуется SDS включен в конечной концентрации 0,1%. Трансферный буфер (полусухой): 48 мМ Трис, 39 мМ глицин, 20% метанол, 0,04% SDS. Блокирующий буфер: 3–5% молоко или BSA (бычий сывороточный альбумин). Добавьте в буфер TBST. Хорошо перемешайте и отфильтруйте. Невыполнение фильтрации может привести к образованию пятен, когда мелкие темные зерна загрязнят пятно во время проявления цвета.

Посуда и приборы: прибор для электрофореза, блок питания. Стаканы мерные: 50 мл, 100 мл; пипетки переменного объема для нанесения образца (50 мкл); наконечники для пипеток, бумажные фильтры. Линейка, карандаш, стеклянные палочки.

Теоретическая часть

Вестерн-блоттинг (вестерн-блот, белковый иммуноблот, англ. Western blot) – это аналитический метод, используемый для определения в образце специфичных белков. На первом этапе используют электрофорез белков в ПААГ для разделения денатурированных полипептидов по длине (как правило, в присутствии SDS) или по трехмерной структуре белка (в нативном состоянии). Далее белки переносят на нитроцеллюлозную или PVDF мембрану, затем детектируют с использованием антител, специфичных к заданному белку.

Вестерн-блоттинг является высокочувствительным методом для обнаружения белков или мониторинга наличия антител, которые реагируют с дискретными антигенами в сложных смесях. Высокая чувствительность и специфичность этого метода подходит для обнаружения малых концентраций конкретных белков и позволяет идентифицировать конкретные антитела к аллергенам, патогены, опухоли и аутоантигены в сыворотке человека и животных. Ранняя и чувствительная диагностика заболевания является решающим фактором в обеспечении эффективного и успешного лечения различных болезней.

Вестерн-блоттинг используется для визуализации белков, разделенных с помощью гель-электрофореза. Гель помещается рядом с нитроцеллюлозной или PVDF (поливинилиденфторидной) мембраной, и электрический ток заставляет белки мигрировать из геля в мембрану. Затем мембрану можно зондировать антителами, специфичными для интересующей цели, и визуализировать с помощью вторичных антител и реагентов для обнаружения.

Образец может быть взят из цельной ткани или из клеточной культуры. В большинстве случаев, твёрдые ткани сначала измельчаются механически с использованием блендера (для образцов большого объёма), с использованием гомогенизатора (меньшие объёмы), или обработки ультразвуком. Различные детергенты, соли и буферы такие как β -меркаптоэтанол или Тритон X-100 могут быть применены для улучшения лизиса клеток и растворения белков.

Ингибиторы протеаз и фосфатаз часто добавляются для предотвращения расщепления образцов их собственными ферментами.

Подготовка тканей часто выполняется при низких температурах, чтобы избежать денатурации белка. Для разделения различных клеточных компартментов и органелл применяют комбинации биохимических и механических методик фракционирования, в том числе, различные типы фильтрации и центрифугирования. Обязательным шагом является также измерения общей концентрации белка (по методу Лоури или Брэдфорда) и выравнивание ее в разных образцах путем разведения, что облегчает сравнение конечных результатов.

Практическая часть

Ход анализа

1. Подготовка лизата из клеточной культуры. Поместите чашку для клеточной культуры на лед и промойте клетки ледяным PBS.

2. Аспирируйте PBS, затем добавьте ледяной буфер для лизиса (1 мл на 10^7 клеток/чашку 100 мм/колбу 150 см²; 0,5 мл на 5×10^6 клеток/чашку 60 мм/колбу 75 см²).

3. Соскребите прилипшие клетки с чашки с помощью холодного пластикового клеточного скребка, затем аккуратно перенесите клеточную суспензию в предварительно охлажденную микроцентрифужную пробирку. В качестве альтернативы клетки можно трипсинизировать и промыть PBS перед ресуспендированием в буфере для лизиса в микроцентрифужной пробирке.

4. Поддерживайте постоянное перемешивание в течение 30 мин при 4 °C.

5. Центрифугируйте в микроцентрифуге при 4 °C. Возможно, вам придется изменять силу и время центрифугирования в зависимости от типа клеток; ориентировочное значение составляет 20 мин при 12 000 об/мин, но это должно быть определено для вашего эксперимента (лейкоцитам требуется очень легкое центрифугирование).

6. Аккуратно извлеките пробирки из центрифуги и поместите на лед, аспирируйте супернатант и поместите в чистую пробирку, хранящуюся на льду, и выбросьте осадок.

7. Подготовка лизата из тканей. Отрежьте интересующую ткань чистыми инструментами, положите желательный лед и как можно быстрее, чтобы предотвратить деградацию протеазами.

8. Поместите ткань в круглодонные микроцентрифужные пробирки или пробирки Эппендорфа и погрузите в жидкий азот для мгновенной заморозки. Храните образцы при -80°C для последующего использования или держите на льду для немедленной гомогенизации. Для образца ткани весом ~ 5 мг быстро добавьте в пробирку ~ 300 мкл ледяного буфера для лизиса, гомогенизируйте с помощью электрического гомогенизатора, дважды промойте лезвие еще 2 x 200 мкл буфера для лизиса, затем поддерживайте постоянное перемешивание в течение 2 ч при температуре 4°C (например, поместите на орбитальный шейкер в холодильнике). Объемы буфера для лизиса должны определяться в зависимости от количества присутствующей ткани; экстракт белка не должен быть слишком разбавленным, чтобы избежать потери белка и больших объемов образцов для загрузки в гели. Минимальная концентрация составляет $0,1$ мг/мл, оптимальная концентрация составляет $1-5$ мг/мл.

9. Центрифугируйте в течение 20 мин при $12\ 000$ об/мин при 4°C в микроцентрифуге. Аккуратно извлеките пробирки из центрифуги и поместите на лед, аспирируйте супернатант и поместите в чистую пробирку, хранящуюся на льду; выбросьте осадок.

10. Подготовка образца. Удалите небольшой объем лизата для проведения количественного анализа белка. Определите концентрацию белка для каждого лизата клеток.

11. Определите, сколько белка нужно загрузить, и добавьте равный объем 2X буфера для образцов Лэммли. Мы рекомендуем восстанавливать и денатурировать образцы, используя следующий метод, если в онлайн-листе

данных антител не указано, что следует использовать невосстанавливающие и неденатурирующие условия.

12. Чтобы восстановить и денатурировать ваши образцы, прокипятите каждый лизат клеток в буфере для образцов при 100 °С в течение 5 мин. Лизаты можно разделить на аликвоты и хранить при -20 °С для будущего использования.

13. Загрузка и запуск геля. Загрузите равные количества белка в лунки геля SDS-PAGE вместе с маркером молекулярной массы. Загрузите 20–30 мкг общего белка из клеточного лизата или гомогената ткани или 10–100 нг очищенного белка.

14. Запустите гель на 1–2 часа при 100 В.

15. Время и напряжение могут потребовать оптимизации. Мы рекомендуем следовать инструкциям производителя. Следует использовать восстанавливающий гель, если в паспорте антитела не рекомендуются невосстанавливающие условия.

Требуемый процент геля зависит от размера интересующего вас белка:

Размер белка	Процент геля
4–40 кДа	20%
12–45 кДа	15%
10–70 кДа	12.5%
15–100 кДа	10%
25–100 кДа	8%

Также можно использовать градиентные гели.

17. Перенос белка из геля на мембрану

Мембрана может быть как нитроцеллюлозной, так и PVDF. Активируйте PVDF метанолом в течение 1 мин и промойте буфером переноса перед подготовкой стопки. Время и напряжение переноса могут потребовать

некоторой оптимизации. Мы рекомендуем следовать инструкциям производителя. Перенос белков на мембрану можно проверить с помощью окрашивания Ponceau S перед этапом блокировки.

Подготовьте стопку следующим образом:



Рисунок 1. Пример подготовленной стопки

18. Заблокируйте мембрану на 1 час при комнатной температуре или на ночь при 4 °C с использованием блокирующего буфера.

19. Инкубируйте мембрану с соответствующими разведениями первичного антитела в блокирующем буфере. Мы рекомендуем инкубацию на ночь при 4 °C; другие условия могут быть оптимизированы.

20. Промойте мембрану в трех промывках TBST, по 5 мин каждая.

21. Инкубируйте мембрану с рекомендуемым разбавлением конъюгированного вторичного антитела в блокирующем буфере при комнатной температуре в течение 1 часа.

22. Промойте мембрану в трех промывках TBST, по 5 мин каждая.

23. Для проявления сигнала следуйте рекомендациям производителя набора. Удалите излишки реагента и накройте мембрану прозрачной пластиковой пленкой.

24. Получите изображение с помощью методов проявления в темной комнате для хемилюминесценции или обычных методов сканирования изображения для колориметрического обнаружения.

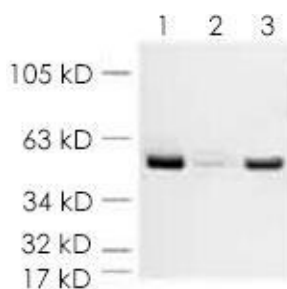


Рисунок 2. Пример контроля загрузки: ab8227 бета-актин

Все дорожки: антитело к бета-актину - контроль загрузки (ab8227) при разведении 1/5000. Дорожка 1: Экстракт цельных клеток HeLa

Дорожка 2: Экстракт дрожжевых клеток

Дорожка 3: Лизат ткани мозга мыши

Лабораторная работа №5. Основные принципы работы с культурами клеток

Цель работы: изучить оснащение бокса для работы с культурами клеток и познакомиться с методами асептики при работе с культурами клеток; познакомиться с основными расходными материалами при работе с культурами клеток и освоить основные приемы асептических методов работы в боксе и ламинарном шкафу; освоить приготовление основных индивидуальных растворов для субкультивирования клеток: полной ростовой среды, раствора Версена и раствора трипсина для дальнейшей работы; изучить технику пассирования монослойной культуры клеток и подсчета количества клеток при помощи камеры Горяева; изучить технику прижизненной и препаратной окраски клеток; изучить технику клонирования клеток монослойной культуры с использованием планшетов для микротитрации.

Реактивы: Основная среда DMEM/F12 объема (стерильная), глутамин (стерильный), бычья сыворотка, фетальная или новорожденного теленка, раствор 0,25% трипсина, раствор Версена или PBS 100 мл, этанол 70%; клеточная культура CHO-K1, 3-5 день после посева при концентрации $1,5 \times 10^5$ клеток/мл; 4% водный раствор параформальдегида, фосфатно-солевой буфер (PBS) pH 7,4, реактив гематоксилина Эрлиха, раствор эозина,

солянокислый спирт, теплая водопроводная вода, дистиллированная вода, глицерине.

Посуда и приборы: CO₂-инкубатор, ламинарно-поточный шкаф, инвертированный микроскоп, центрифуга, холодильник, общий план лаборатории в масштабе 1:50, линейки, карандаши, блокноты; расходные материалы, находящиеся в лаборатории (культуральные флаконы объема 25 см², 75 см²; центрифужные пробирки), дозаторы различного объема (0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл), наконечники различного объема (0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл); стерильные стеклянные флаконы объема 50 мл, пинцеты лабораторные, тампоны ватные; камера Горяева; планшеты 6-ти луночные нестерильные, пипетки Пастера одноразовые на объем 2 мл, предметные стекла; планшеты для микротитрации 96-ти луночные, пробирки типа Эппендорф.

Теоретическая часть

Главное требование для культивирования клеток – необходимость поддержания асептических условий. Важно, чтобы помещения лаборатории выполняли комплекс минимальных требований:

- Для работы с клетками существует стерильная зона (бокс), в которой поддерживаются чистота, минимум перемещения людей и нет сквозного прохода.
- Бокс расположен отдельно от помещений, в которых содержатся животные или ведутся микробиологические работы.
- Есть подготовительная зона, в которой проводятся нестерильные работы.
- Есть моечная зона.
- Есть отдельные зоны для хранения реактивов и жидкостей (при комнатной температуре, +4⁰С и -20⁰С), отделения для хранения лабораторного пластика и газовых баллонов.
- Есть отдельное помещение для стерилизации материалов и посуды.
- В стерильной зоне (боксе) обязательно присутствие следующих приборов: CO₂-инкубатора, ламинарно-поточного шкафа,

инвертированного микроскопа, центрифуги, холодильника.

Влажный CO₂-инкубатор необходим для дозирования и регулирования таких физических параметров, как влажность, температура, содержание CO₂ в вентилируемом воздухе. Система оснащена датчиками содержания газов (CO₂ и O₂), температуры, влажности, причём измерения осуществляются со строгой периодичностью. Погрешность регулирования концентрации CO₂ достигает 0,1% – это очень малая величина в общем объёме газовой смеси. Большинство инкубаторов поддерживают диапазон значений концентрации углекислого газа 0-20%, кислорода – 0,2-95%. Большинство клеточных культур теплокровных животных и человека культивируются при условиях содержания в атмосфере 5% CO₂, 70% влажности и температуре 37 °С.

Ламинарно-поточный шкаф II класса биологической безопасности. Основная задача ламинарно-поточных шкафов II класса – защита оператора, рабочей зоны и окружающей среды. Принцип работы: очищенный специальными HEPA-фильтрами воздух равномерным вертикальным (ламинарным) потоком опускается внутри рабочей зоны, создавая стерильные условия и удаляется в воздуховод через отверстия в поверхности столешницы. Большая часть воздуха (70%) проходит через основные фильтры и поступает обратно в рабочую зону, осуществляя рециркуляцию. 30% воздуха проходит через выходной HEPA фильтр и выбрасывается в помещение. Эффективность фильтрации составляет 99,9997% для частиц размером 0,3 мкм. Кроме того, шкаф оснащен ультрафиолетовой лампой, которая зажигается на 40 минут до начала работы и на 40 минут после окончания для обеззараживания внутреннего объема шкафа.

Инвертированный микроскоп – это оптический прибор с «перевернутой» конструкцией, которая позволяет вести исследование объекта с его нижней стороны. Объективы микроскопа расположены под исследуемым образцом, осветительный конденсор находится сверху. Микроскопы для работы с культурами клеток обязательно оснащены *системами фазового контраста* – дополнительной функцией, которая

позволяет изучать прозрачные объекты без предварительного окрашивания за счет специального конденсора и особо устроенного объектива, которые регулируют изменения фазы световых волн и превращают разность фаз в разность интенсивностей света, благодаря чему детали строения объекта становятся доступными для глаза. Система колец в конденсоре и объективе отделяет те лучи, которые диафрагмировали (отклонились) на объекте от тех, которые не диафрагмировали. После того как диафрагмировавшие лучи проходят через фазовую пластинку объектива, вносящую дополнительный сдвиг по фазе, они рекомбинируются с недифрагмировавшими лучами. Именно таким образом удается резко повысить контраст клеток или внутриклеточных структур.

Центрифуга с числом оборотов от 200 до 2000-4000 об/мин. Предназначена для осаждения клеток для их концентрирования без покидания помещения бокса (в доступности).

Холодильник, поддерживающий температурные режимы от +2 до +8⁰С и -20⁰С предназначен для хранения основных растворов реактивов без покидания помещения бокса (в доступности).

Присутствие этих приборов в боксе минимизирует возможность контаминации (заражения) клеточных культур из воздуха помещений.

В подготовительной зоне располагаются лабораторные столы, шкафы и навесные полки для хранения расходных материалов, лабораторной посуды, находятся дополнительные приборы для приготовления реактивов и подготовки образцов – термостат, настольная центрифуга, шейкер, аналитические весы, магнитные мешалки.

В помещении для стерилизации лабораторной посуды и материалов находятся: вертикальный паровой стерилизатор с системой управления, шкаф суховоздушный для стерилизации, шкаф для хранения материалов.

Культуральная посуда. При работе с клетками необходимо соблюдать методы асептики, поэтому вся культуральная посуда должна быть стерильной. Существует два основных типа лабораторной посуды для работы

с культурами клеток: стеклянная и пластиковая (таблица 5). Выбор посуды зависит от материального обеспечения лаборатории и предпочтения исследователя, однако последнее время популярной стала пластиковая – из-за относительной дешевизны и удобства в использовании.

Весь спектр посуды для работы с клеточными культурами можно разделить на несколько больших групп – в зависимости от выполняемых задачи частоты употребления в рутинной работе. Мы рассмотрим те группы, которые необходимы для пассажирования и криозаморозки клеточных культур (таблица 6).

Следует отметить, что внутри каждой из перечисленных групп в настоящее время существует огромное разнообразие видов и моделей, с которыми исследователю следует познакомиться самостоятельно перед началом работы.

Таблица 1 Виды посуды для работы с культурами клеток

Виды	Кратность использования	Стерилизация
Стеклянная	Многоразовая	Требует тщательного мытья и стерилизации после каждого использования

Пластиковая	Одноразовая	Не требуется, в случае приобретения стерильной посуды Требуется, если приобретена нестерильная (например, наконечники для автоматических пипеток)
-------------	-------------	--

Приборы для дозирования жидкости. Существует большой спектр приспособлений и приборов для дозирования жидкостей, которые используются в данных работах – это простые лабораторные груши, полумеханические лабораторные груши, различные виды автоматических дозаторов. Наиболее распространены механические и электрические дозаторы, которые имеют функцию «с возможностью автоклавирования», поскольку для поддержания асептических условий должны автоклавироваться 1 раз в 2-3 месяца.

Средства для подсчета клеток. Подсчет клеток – одна из рутинных процедур, которую выполняет исследователь при работе с клетками. Существует большое разнообразие электрических приборов для подсчета клеток – цитометров, различных по выполняемым функциям и по цене. Также используются камеры Горяева. Камера Горяева – приспособление, предназначенное для подсчета количества клеток в заданном объеме жидкости. Обычно ее используют для определения числа форменных элементов в образце крови. Представляет собой предметное стекло, с бороздами и нанесённой микроскопической сеткой.

Таблица 2. Основные виды материалов для ведения клеточных культур

Наименование	Виды	Использование
Культуральные флаконы	25 см ² , 75 см ² , 150 см ² , 175 см ² , 225 см ²	Рост клеточных культур

Культуральные планшеты	Количество лунок: 96, 48, 24, 12, 6	Рост клеточных культур, манипуляции с клеточными культурами (проведение экспериментов, клонирование, окраска)
Чашки Петри	35 мм, 60 мм, 90 мм	
Пипетки серологические	Различного объема до 25 мл	Отбор жидкостей при манипуляциях
Автоматические дозаторы жидкостей с постоянным и переменным объемом	0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл, 10 мл	Отбор жидкостей при манипуляциях
Пробирки для центрифугирования типа фалькон	15 мл и 50 мл	Для центрифугирования
Пробирки типа эппендорф	0,5 мл, 1,5 мл, 2,0 мл	Отбор жидкостей при манипуляциях, хранение реактивов до T=-200C
Контейнеры для хранения наконечников	Для каждого типа наконечников	Хранение наконечников в асептических условиях
Контейнеры для хранения пробирок Эппендорфа	Для каждого типа пробирок Эппендорфа	Хранение
Лабораторные пластиковые подставки для пробирок различного диаметра	Для каждого типа пробирок	При работе в ламинарном шкафу
Пробирки для замораживания клеток (криопробирки)	0,5 мл, 1,5 мл, 2,0 мл	Для хранения в криохранилище

Приборы и материалы, находящиеся в ламинарном шкафу. В ламинарном шкафу должен всегда находиться необходимый минимум материалов и предметов, которые используются в повседневной работе: емкость с 70% спиртом для протирки поверхностей, ватные тампоны в контейнере, контейнеры с наконечниками, дозаторы разного объема, пинцет, горелка. Все предметы, вносимые в ламинарный шкаф, должны протираться

ватным тампоном, смоченным 70% спиртом, а края открываемых и закрываемых сосудов – также протираться спиртом и прокаливаться в пламени горелки. Полная ростовая среда – среда, содержащая все среды и добавки и подходящая для использования при выделении или культивировании определенного типа клеток. Ее обычно готовят из среды определенного химического состава с добавлением аминокислот (наиболее часто – глутамина), сыворотки, факторов роста, гормонов, антибиотиков и антимикотиков.

Среда определенного химического состава. В подавляющем большинстве случаев в исследованиях используются готовые коммерческие среды с известным химическим составом, предназначенные для ведения определенных культур клеток. Например, минимальная среда Игла (MEM) используется в качестве основы для множества полных готовых сред. В состав среды входят незаменимые аминокислоты (цистин, цистеин, аргинин, тирозин), витамины (биотин, витамины группы В, холин, фолиевая кислота, инозитол, никотинамид). Соли, входящие в состав среды, обеспечивают осмотическое давление (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , HSO_3^-), кроме того Na^+ , K^+ и Cl^- регулируют мембранный потенциал, а SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , HSO_3^- выступают в качестве анионов, необходимых в качестве предшественников макромолекул и регуляторов внутриклеточного заряда. Глюкоза входит в состав большинства сред как источник энергии, ее метаболизм происходит главным образом путем гликолиза.

Аминокислоты. В основном аминокислоты содержатся уже в самих средах определенного химического состава. Большинство стандартных сред определенного химического состава не содержит аминокислоту глутамин, поэтому ее добавляют дополнительно. Однако некоторые клеточные культуры требуют повышенной концентрации аминокислот – тогда отдельно добавляют их.

Сыворотка. Для большинства клеточных культур используется телячья сыворотка (CS), эмбриональная бычья сыворотка (FBS), сыворотка взрослых

лошадей и человеческая сыворотки. Сыворотку (жидкую фракцию крови) получают из цельной крови либо путем образования сгустка, либо физическим отделением форменных элементов крови. Основными компонентами сыворотки являются:

Факторы адгезии (фибронектин);

Пептиды, регулирующие рост и дифференцировку (основной тромбоцитарный фактор роста – PDGF и небольшое количество других);

Белки: альбумин (переносчик липидов, минералов), фибронектин (способствует адгезии клеток), макроглобулины (ингибиторы трипсина), трансферрин (связывает железо, делая его менее токсичным и более доступным для клеток), присутствует множество других белков, функции которых еще не выяснены достоверно;

Питательные компоненты (неорганические соединения, жирные кислоты и их метаболиты, витамины);

Гормоны (инсулин, гидрокортизон, эстрогены, трийодтиронин), которые регулируют мембранный транспорт, строение клеточной поверхности и фенотип клетки.

Факторы роста. Для лучшей пролиферации клеток в полные питательные среды могут добавляться дополнительные факторы роста, различающиеся по своей специфичности и продающиеся отдельно как коммерческие препараты рекомбинантных белков (например, фактор роста фибробластов – FGF, эпидермальный фактор роста – EGF, ангиогенин и другие).

Антибиотики и антимикотики добавляют для снижения возможности контаминации (заражения). Однако использование ламинарно-поточных шкафов и выполнение асептических правил работы делают применение антибиотиков и антимикотиков не обязательным и даже вредным в рутинной работе.

Препараты для снятия клеток с культуральной поверхности. При стандартном пассировании (пересадке) для отмывки клеток от остатков

полной ростовой среды после ее удаления применяются буферные растворы различных солей (рН 7,4). Наиболее часто применяются фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) и раствор Хенкса. Обработка растворами необходима, поскольку содержащиеся в ростовой среде макроглобулины ингибируют действие дисоциирующих агентов, например, трипсина, и снятие клеток без предварительной промывки затрудняется.

Для снятия клеток с культуральной поверхности необходимо разорвать ионные связи, образованные с помощью двухвалентных ионов и пептидные связи, образованные молекулами факторов адгезии, которыми клетки прикрепляются к субстрату.

Первые разрушаются с помощью раствора Версена (натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты в растворе солей).

Пептидные связи разрушают с помощью ферментных препаратов, наиболее часто применяют 0,25 % раствор фермента трипсина.

Большинство культур клеток эпителиального происхождения выращиваются в адгезивном (прикрепленном) состоянии. Адгезия клеток к пластику (стеклу) происходит из-за действия 3-х классов трансмембранных белков: интегринов, молекул межклеточной адгезии и трансмембранных протеогликанов. Для выращивания адгезивных клеток требуется поверхность, на которой имеются шероховатости – поэтому используются стеклянные или пластиковые культуральные флаконы различных модификаций, внутренняя поверхность которых может быть обработана специальным образом. Для улучшения адгезии и стимуляции роста и дифференцировки внутренняя поверхность флакона может покрываться коллагеном или элементами внеклеточного матрикса. В последнее время для выращивания адгезивных клеток тканей животных и человека с целью пространственного формирования будущей ткани, органа или его фрагмента в качестве носителей все чаще используются скаффолды (англ. *scaffold* - леса, подмости) - трехмерные подложки-носители естественного или искусственного происхождения.

Процесс роста адгезивной культуры внутри одного культурального сосуда можно представить в виде стандартного графика (рис. 1). Сразу после посева наступает lag-период, за ним возникает период экспоненциального роста – log-период, в котором клетки активно пролиферируют, истощая среду и занимая все большее пространство культурального флакона. Когда плотность клеток (количество клеток/см² субстрата) достигает уровня, что весь субстрат оказывается занятым, рост прекращается или значительно снижается (фаза плато).

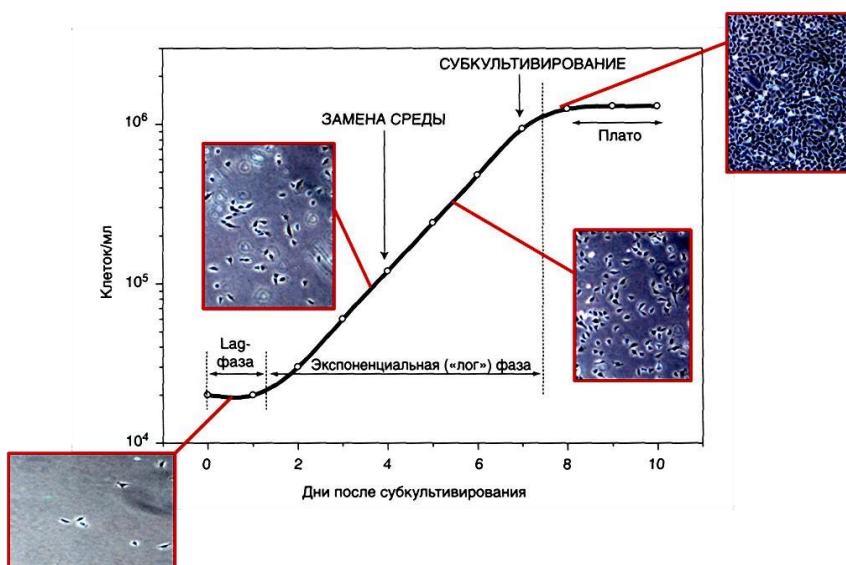


Рисунок 1. Кривая роста и поддержания культуры (Фрешни, 2010)

При выращивании клеток, из-за постоянного деления может возникнуть их переизбыток в культуре. В результате чего могут возникнуть следующие проблемы:

- накопление в питательной среде продуктов выделения, в том числе токсичных,
- накопление в культуре омертвевших клеток, прекративших жизнедеятельность,
- избыточное количество клеток оказывает негативное влияние на клеточный цикл, рост и деление замедляются, а клетки начинают стареть и отмирать (контактное ингибирование роста).

Для поддержания нормального функционирования культур клеток, а также для предотвращения негативных явлений периодически проводят

замену питательной среды, а также пересадку клеток – пассирование. Пассаж (субкультивирование) – процедура переноса части активно пролиферирующей клеточной культуры в другой культуральный сосуд со свежей питательной средой. Субкультивирование обычно включает в себя (рис. 2.):

- удаление истощенной питательной среды,
- диссоциацию клеток монослоя при помощи трипсина или некоторых других гидролитических ферментов (слабоприкрепленные культуры можно отделить от дна флакона простым встряхиванием),
- разведение клеток в новом флаконе и свежей среде.

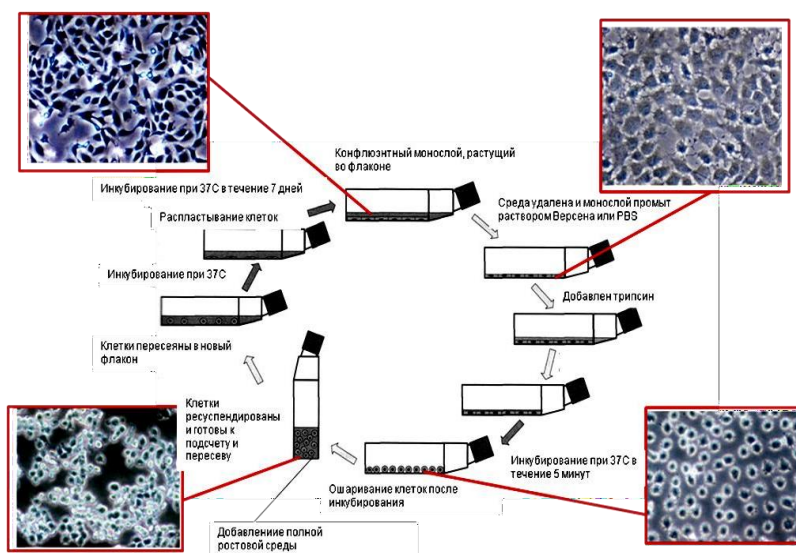


Рисунок 2. Субкультивирование монослойной культуры клеток (Фрэшни, 2010)

Подсчет клеток осуществляют при помощи камеры Горяева. Это предметное стекло, с бороздами и нанесённой микроскопической сеткой. Размеры малых делений клетки сетки составляют 0,05 мм, а больших – 0,2 мм. При этом сетка нанесена на площадку (участок стекла), расположенный на 0,1 мм ниже, чем две соседние площадки. Эти площадки служат для притирания покровного стекла. В результате объем жидкости над квадратом, образованным большими делениями сетки Горяева, составляет 0,004

микролитра. Существует много способов подсчета количества клеток, наиболее распространен и прост следующий.

Наиболее распространенным методом определения общего числа клеток в 1 мл суспензии является их подсчет под микроскопом с использованием счетной камеры. Существует несколько видов счетных камер, принципиальное устройство которых одинаково: Тома-Цейсса, Бюркера, Горяева, камера подсчета с сеткой Нейбауэра.

Счетная камера Горяева представляет собой специальное предметное стекло с нанесенными на него поперечными прорезями, образующими три поперечно расположенные плоские площадки. Средняя площадка продольной прорезью разделена еще на две площадки, каждая из которых имеет выгравированную на ней сетку с квадратами определенной площади. По обе стороны средней площадки в камере Горяева расположены две других на 0,1 мм выше средней. Плоскости этих площадок служат для притирания покровного стекла до появления так называемых Ньютоновских колец.

После притирания покровного стекла создается камера, закрытая с двух боковых сторон, а с двух других имеющая капиллярные пространства, через которые с помощью пастеровской пипетки камеру заполняют разведением взвеси микроорганизма (рис.3).

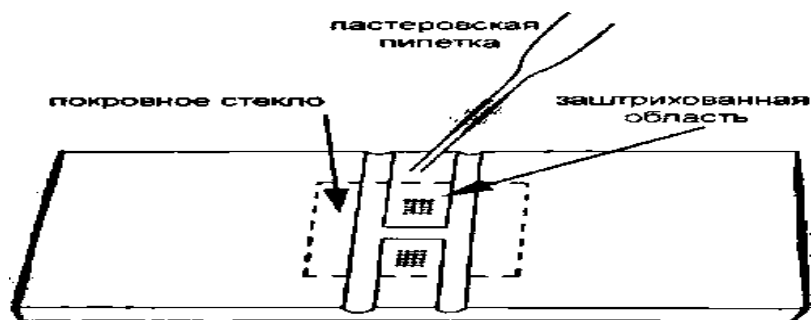


Рисунок 3. Камера Горяева

Подсчет клеток проводят под микроскопом, который настраивают таким образом, чтобы была видна нанесенная на камеру сетка и клетки микроорганизма, равномерно распределенные на ней. Считают число клеток

в 5 горизонтальных и 15 диагональных больших квадратах, после чего определяют число клеток (x) в 1 мл исследуемой взвеси по формуле:

$$x = \frac{a}{20} \cdot N \cdot k \cdot b = \frac{a \cdot 225 \cdot 1111}{20} \cdot b = a \cdot 12499 \cdot b$$

где: а - число клеток в 20 квадратах;

N = 225 - число больших квадратов в камере Горяева;

$k = \frac{1}{v} = \frac{1}{0,0009} = 1111$ - коэффициент, равный величине, обратной
 $v = 0,9 \text{ мм}^3 = 0,9 \cdot 10^{-3}$
объему камеры Горяева

(мл); b - разведение исходной взвеси микроорганизма.

При подсчете с использованием камеры Горяева необходимо соблюдать следующие основные правила:

- использовать только стандартные покровные стекла;
- проводить подсчет только чистых культур;
- избегать недостаточного заполнения и переполнения камеры;
- избегать наличия пузырьков воздуха в камере;
- учитывать все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата;
- подсчет клеток производить с объективом 8x (10x), реже 40x. С иммерсионным объективом работать нельзя.

Витальная (прижизненная) окраска клеточных культур. Красители, пригодные для прижизненного окрашивания, называются витальными. Окраска живых клеток дает возможность выявлять изменения, происходящие в клетках и тканях при разных внешних воздействиях. В последнем случае чрезвычайно важно то, что количество красителя, поглощенного неповрежденными или поврежденными путем какого-либо воздействия клетками, можно точно определить и выразить количественно. Разница в количестве красителя, поглощенного неповрежденными и поврежденными клетками, свидетельствует о характере и степени изменений, возникающих под влиянием различных внешних воздействий.

В отличие от препаратных, витальные красители обладают дополнительными свойствами: низкой токсичностью и способностью легко проникать в живые клетки и их структуры через клеточные оболочки и цитоплазматические мембраны. По оптическим свойствам различают витальные красители для видимого света и флуоресцентные красители (флуорохромы). По химическим свойствам различают основные и кислотные (кислые) витальные красители. В основных красителях хромофорная группа связана с катионом (нейтральный красный, метиленовый синий). В кислотных хромофорная группа связана с анионом (феноловый красный, цианол). Проникая в клетки животных, одни красители диффузно окрашивают цитоплазму, другие красители откладываются в виде гранул в области комплекса Гольджи, оставляя ядро и цитоплазму неокрашенными.

Метод витальной окраски с использованием трипанового синего (рис. 4) – это контроль за состоянием проницаемости плазматической мембраны клеток.

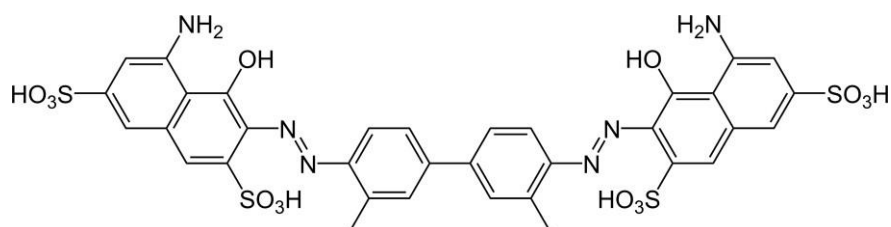


Рисунок 4. Химическая формула трипанового синего

Неповрежденные мембраны непроницаемы для трипанового синего при кратковременной инкубации; при этом даже небольшие включения красителя в цитозоле свидетельствуют о нарушении интактности клеточной мембраны. Для визуальной оценки повреждения клеток используется способность ядерных белков адсорбировать краску. Даже самое слабое окрашивание ядра является индикатором повреждения клеточной мембраны. Метод очень прост и дает возможность без специального оборудования получить ответ в течение нескольких минут. Тем не менее, тест на трипановый синий, по-видимому, недостаточно чувствителен для выявления незначительных повреждений плазматической мембраны. Это связано с тем,

что краситель проникает в клетки и окрашивает их лишь тогда, когда плазматическая мембрана становится проницаемой для высокомолекулярных соединений, например, белков, и не может идентифицировать более ранние нарушения ее селективности, когда она становится доступной для низкомолекулярных соединений.

При окраске трипановым синим соблюдается следующая очередность манипуляций:

Суспензию живых клеток смешивают со свежeproфильтрованным 0,5% раствором трипанового синего в PBS.

Полученный раствор переносят в камеру Горяева и выполняют подсчет количества окрашенных и неокрашенных клеток в 25 заштрихованных квадратах (стандартным способом). Жизнеспособность клеток (ЖК) определяют по формуле:

$$\text{ЖК} = (1 - (N_1 : N_2)) \times 100 \%, \text{ где}$$

ЖК – жизнеспособность клеток (%), N_1 – количество окрашенных клеток, N_2 – общее количество клеток.

Количество жизнеспособных клеток на 1 мл культуры определяют по формуле:

$$C = N_3 \times 10^4 \times R, \text{ где}$$

C- количество жизнеспособных клеток (кл/мл) N_3 – жизнеспособные неокрашенные клетки,

$$R = 1,1 \text{ – коэффициент разведения при подсчете в камере Горяева.}$$

В силу своей простоты и достаточно высокой воспроизводимости метод окрашивания клеток трипановым синим общепринят как обязательный экспресс-метод оценки жизнеспособности клеточных культур.

Клон – группа клеток, происходящая из одной клетки-предшественника путем многократного деления. Получение клонов отдельных клеток является традиционным подходом исследователей к решению проблемы гетерогенности популяции клеток. Метод эффективно применяется в отношении постоянных клеточных линий, а для конечных

культур его эффективность снижена, поскольку эти клетки могут пройти ограниченное количество делений, и к тому времени, когда клон может продуцировать достаточное количество клеток, он может находиться на стадии старения.

Метод клонирования эффективно используется для оценки выживания клеток, оптимизации условий роста культуры, для определения химио- и радиочувствительности.

Самый распространенный и эффективный метод клонирования – разведение клеточной культуры до крайне низкой плотности, когда при выращивании в определенных условиях вокруг единичной клетки возникает группа ее потомков, не смешивающихся с потомками соседней. Такую отдельную группу можно извлечь микроманипуляциями (вручную или с использованием специальной аппаратуры).

При использовании метода в большинстве случаев выживаемость клеток снижается, так как клетки посеяны при низкой посевной концентрации. В этих условиях клеткам требуется большее количество питательных веществ в связи с их потерей при утечке через мембрану. Также существует предположение, что сигнальные молекулы, выделяемые клетками (факторы кондиционирования), которые присутствуют в культурах с высокой плотностью, в культурах низкой плотности либо отсутствуют, либо имеют низкую концентрацию. Для решения проблемы улучшения выживаемости клеток при клонировании в практике используются несколько подходов.

Обогащение условий культивирования. Использование насыщенных полных ростовых сред – с увеличенным содержанием сыворотки (до 30%), с добавлением факторов роста, гормонов, промежуточных метаболитов. Обработка поверхности культуральных сосудов для улучшения адгезии клеток (используется полилизин, коллаген, матригель и др.).

Использование кондиционированной среды – среды, которая использовалась для роста других клеток этой же линии и содержит

метаболиты, факторы роста и продукты матрикса, оставшиеся от этих клеток. Такие среды добавляют в питательные среды для культивирования единичных клеток.

Использование фидерных слоев клеток – клеток с подавленной пролиферативной активностью, на сформировавшийся монослой которых высевают сильно разведенные клоногенные культуры. Таким образом имитируются факторы окружающей среды, соответствующие нормальной плотности посева клеток. В качестве фидерного слоя часто используются клетки постоянных линий, пролиферативная активность которых полностью подавляется по достижении монослоя. В таком состоянии клетки могут существовать 2-3 недели, и за это время поддерживать растущие клоны.

Можно выделить два основных подхода к получению изолированных колоний из отдельных клеток. Первый – выращивание отдельных клонов в планшетах для микротитрации, когда каждая клетка находится в отдельной ячейке и колонии могут быть изолированы для дальнейшей работы трипсинизацией отдельных ячеек. Второй – выращивание отдельных клонов в общем объеме – например, в чашке Петри, - и тогда применяются различные способы для изолирования растущих колоний с последующим механическим извлечением.

Практическая часть

I. Ознакомление с приборами и оборудованием лаборатории, знакомство с правилами техники безопасности

Ход анализа

1. Под руководством преподавателя ознакомиться с комплексом оборудования, находящимся в лаборатории для работы с культурами клеток. Понять предназначение и функциональную нагрузку каждого прибора.

2. Отметить на плане местонахождение предметов основного оборудования в приблизительном масштабе.

3. Обозначить основные зоны работы.

4. Обозначить на плане возможное размещение помещения для

криохранилища клеток. Обосновать свой выбор.

5. Ознакомиться с правилами техники безопасности при работе в лаборатории и при работе с культурами клеток.

II. Реактивы и культуральная посуда

Ход анализа

1. Под руководством преподавателя ознакомиться с расходными материалами, находящимся в лаборатории для работы с культурами клеток. Понять предназначение и функциональную нагрузку материалов.

2. В нестерильных условиях выполнить следующие упражнения:

- При помощи дозатора перенести жидкость из одного флакона в другой, меняя переносимый объем.
- При помощи пинцета открыть культуральные сосуды с разными типами пробок.
- Разместить приборы и материалы, обязательно находящиеся в ламинарном шкафу в рабочем порядке.
- Выполнить комплекс необходимых процедур при начале и завершении работы в ламинаре.

3. Записать, какими материалами и приборами пользовались при выполнении упражнения.

4. Записать основные правила асептической работы в боксе и ламинарно-потокном шкафу.

5. Зарисовать расположение присутствующих и вносимых в ламинарно-потокный шкаф предметов.

III. Приготовление полной ростовой среды и основных растворов для субкультивирования клеточных культур

Ход анализа

1. Подготовить ламинарно-потокный шкаф к работе, а после выполнения всех упражнений – к выключению, выполнить необходимые асептические процедуры.

2. Приготовить раствор полной ростовой среды 20 мл, перенести

приготовленный раствор в пробирки (стеклянные флаконы) объемом 50 мл.

3.Перенести раствор Версена (или 0,25% раствор трипсина в пробирки (стеклянные флаконы) объемом 50 мл.

4.Перед началом работы простерилизовать ламинарно-поточный шкаф УФ-излучением в течение 40 минут.

5.Протереть рабочие поверхности раствором 70% спирта.

6.Протереть пинцеты раствором 70% спирта.

7.Поместить в ламинарно-поточный шкаф: основную среду MEM объема 0,45 л, глутамин 146 мг, бычью сыворотку 20 мл.

8.Протереть поверхности и пробки бутылей 70% спиртом.

9.Вскрыть при помощи пинцета бутылку с основной средой MEM.

10.Вскрыть при помощи пинцета флакон порошком глутамина. Перенести 1 мл основной среды во флакон с глутамином, тщательно перемешать.

11.Перенести раствор глутамина в бутылку с основной средой, тщательно перемешать.

12.Перенести 17,75 мл раствора основной среды с глутамином в центрифужные пробирки (стеклянные флаконы).

13.Вскрыть при помощи пинцета и скальпеля емкость с сывороткой.

14.Перенести 2,25 мл сыворотки в пробирки (стеклянные флаконы) с раствором основной среды и глутамина. Перемешать полученный раствор полной ростовой среды.

15.Закрыть флаконы с приготовленной полной средой, основной средой MEM. Перед закрытием протереть горлышко сосуда и пробку 70% этанолом.

16.Перенести в ламинарно-поточный шкаф: раствор Версена или PBS, раствор 0,25% трипсина 50 мл.

17.Протереть поверхности и пробки бутылей 70% спиртом.

18.Вскрыть емкости при помощи пинцета и скальпеля.

19.Перенести 20 мл раствора Версена или PBS в отдельную емкость;

закрыть крышкой с выполнением необходимых асептических процедур.

20.Перенести 5 мл раствора трипсина в отдельную емкость; закрыть крышкой с выполнением необходимых асептических процедур.

21.После завершения выполнения упражнений убрать все лишние материалы из ламинарно-поточного шкафа.

22.Протереть рабочие поверхности раствором 70% спирта.

23.Протереть пинцеты раствором 70% спирта.

24.После окончания работы простерилизовать ламинарно-поточный шкаф УФ-излучением в течение 40 минут.

25.Записать правила манипуляции с предметами в асептических условиях ламинарно-поточного шкафа.

26.Записать последовательность действий при приготовлении полной ростовой среды. Рассчитать процентное содержание сыворотки и молярное содержание глутамин в полной ростовой среде.

IV. Субкультивирование адгезивной культуры клеток

Ход анализа

1.Перед началом работы убедиться в необходимости пассажа: просмотреть культуральный флакон под микроскопом, оценить состояние культуры (наличие мертвых/апоптотических клеток, стадию роста, цвет среды во флаконе).

2.Подготовить ламинарный бокс и необходимые реактивы для работы:

-включить свет и воздушный поток в ламинарном боксе, надеть одноразовые перчатки, открыть бокс;

-проверить наличие 70%-этанола для обработки перчаток, 95%-этанола в спиртовке;

-поставить в бокс: стакан для мусора/использованных пипеток; 0,25%-раствор трипсина и культуральную среду из холодильника; марлевую салфетку.

-обработать перчатки 70%-этанолом, сразу внести руки в ламинар

(ВНИМАНИЕ! Выполнять это действие каждый раз перед внесением

рук в бокс!);

-открыть цилиндр со стерильными стеклянными пипетками;

-дождавшись высыхания перчаток (!), зажечь спиртовку, снять защитную пленку с бутылок (трипсин, среда) и обжечь горлышки и крышки в пламени горелки. (Закрутить крышки так, чтобы можно было открыть их одной рукой).

3.Быстро перенести культуральный флакон из инкубатора в бокс.

4.Обработать руки.

5.Взять из цилиндра одну пипетку объёмом не менее 5 мл (для маленького флакона), быстро обжечь её в пламени, избегая сильного нагрева (ПРИМЕЧАНИЕ 1. Цель данного действия - сжечь возможную пыль с поверхности, а не простерилизовать пипетку повторно! Чрезмерное нагревание может вызвать термическую денатурацию трипсина или ФБС в среде!

ПРИМЕЧАНИЕ 2. При случайном прикосновении пипеткой к чему-либо/отсутствии ватной пробки взять другую пипетку!)

6.Прокручивающим движением вставить пипетку в автоматический дозатор.

7.Держа дозатор с пипеткой в правой руке, открыть культуральный флакон, положить его крышку дном вниз, быстро обжечь горлышко, собрать отработанную среду.

(ПРИМЕЧАНИЕ. Удобнее всего собирать среду из одного и того же угла флакона, например, ближайшего левого, во избежание лишних царапин на дне.)

8.Вытащить пипетку и, продолжая держать дозатор в руке, обжечь горлышко и крышку флакона, завинтить крышку. ТОЛЬКО после этого можно сбросить использованную пипетку в стакан.

9.Взять вторую пипетку (можно объёмом 1-2 мл), обжечь в пламени, вставить в дозатор.

10.Открыть крышку бутылки с трипсином, положить крышку дном

вниз, обжечь горлышко и набрать 1-1,5 мл в пипетку.

11.Быстро обжечь горлышко и крышку, закрыть бутылку.

12.Открыть культуральный флакон, обжечь, добавить трипсин и, НЕ ВЫНИМАЯ ПИПЕТКУ, ополоснуть им всю поверхность дна, затем - собрать трипсин полностью из того же угла.

13.Обжечь флакон и крышку, закрыть; сбросить пипетку.

14.СОБЛЮДАЯ предыдущую последовательность мероприятий по асептике, добавить повторно 1 мл трипсина, ополоснуть дно, в этот раз оставив трипсин во флаконе.

15.Обжечь флакон, сбросить пипетку, закрыть спиртовку, убрать флакон на 5-15 минут в инкубатор.

16.Под контролем микроскопа: через 5 минут проверить, потеряли ли клетки контакты с дном флакона и друг с другом (форма меняется на шарообразную).

17.При ошаривании культуры на 90-100% перенести флакон в ламинар, обработать руки, зажечь спиртовку.

18.Обжечь пипетку с несколотым концом, открыть и обжечь горлышко бутылки со средой, набрать 3,5 мл, обжечь и закрыть бутылку.

19.Открыть и обжечь флакон, внести пипетку и струёй жидкости смыть оставшиеся клетки, забирая её обратно по мере необходимости.

(ПРИМЕЧАНИЕ 1. Старайтесь производить как можно меньше пены во избежание чрезмерного повреждения клеток.

ПРИМЕЧАНИЕ 2. Особенно тщательно смывайте в углах и швах флакона, где скапливается наибольшее количество клеток.

ПРИМЕЧАНИЕ 3. Старайтесь не попадать на «потолок» флакона.

ПРИМЕЧАНИЕ 4. Не доставайте пипетку из флакона до окончания процесса смывания!)

20.Не доставая пипетку, сбросить 3-4 капли клеточной суспензии обратно во флакон.

21.Обжечь флакон и крышку, закрыть.

22.(При необходимости слить клеточную суспензию в стерильную пробирку для дальнейшей работы.)

23.Сбросить пипетку.

24.Обжечь новую пипетку, вставить в дозатор.

25.Открыть бутылку со средой, обжечь горлышко, набрать 5 мл, обжечь горлышко и крышку, закрыть бутылку.

26.Открыть и обжечь флакон, добавить новую среду, обжечь флакон и крышку, закрыть, сбросить пипетку.

27.Маркером написать дату и номер пассажа на флаконе (ДД.ММ - р№: «01.01 - р1»);

28.Убрать флакон в инкубатор.

29.Завершить работу:

-обработать перчатки 70%-этанолом;

-закрыть цилиндр(ы) с пипетками;

-обжечь горлышки и крышки бутылок с трипсином и средой внутри, плотно закрутить, обжечь снаружи;

-закрыть спиртовку;

-обмотать горлышки бутылок защитной пленкой;

-убрать бутылки в холодильник;

-вынести из бокса стакан с мусором, с помощью марлевой салфетки обработать рабочую поверхность 70%-этанолом;

-закрыть ламинар, выключить свет и воздушный поток, включить ультрафиолет (на 1 час);

-унести посуду в мойку.

Работа с клеточной культурой

1.Подсчитать количество клеток в полученном растворе в камере Горяева по методике, описанной выше.

2.Рассадить клетки в новые культуральные флаконы из расчёта 2×10^4 кл/см². На основании полученных результатов рассчитать объем суспензии V₁, содержащий заданное количество клеток, перенести в новый

культуральный флакон и добавить полной ростовой среды до необходимого количества 5 мл. Подписать флакон, поместить в CO₂-инкубатор.

3. В ходе выполнения работы записывать выполняемые расчеты и заполнять таблицу данных.

4. Записать последовательность действий при выполнении всех процедур.

5. Рассчитать объем суспензии, содержащий 2×10^4 кл/см² (V_1).

6. Рассчитать объем полной ростовой среды, добавленный до 5 мл (V_2).

7. Представить заполненную таблицу и выполненные расчеты под ней.

Таблица 3. Основные данные, полученные при выполнении лабораторной работы

Количество клеток в двух полях камеры Горяева (N_1, N_2)	Среднее значение (N_{cp})	Количество клеток в растворе (C)	Объем суспензии, содержащий 2×10^4 кл/см ² (V_1)	Объем полной ростовой среды, добавленный до 5 мл (V_2)
$N_1 =$	$N_{cp} =$	$C =$	$V_1 =$	$V_2 =$
$N_2 =$				

V. Методы окраски клеточной культуры

Ход анализа

1. Выполнить витальное окрашивание с использованием трипанового синего в асептических условиях.

2. Выполнить подготовку и выключение ламинарно-поточного шкафа в соответствии с процедурами предыдущего занятия. В ходе работы выполнять асептические манипуляции по внесению, размещению и использованию предметов в зоне ламинарно-поточного шкафа в соответствии с процедурами предыдущего занятия. Все манипуляции проводить в ламинарно-поточном шкафу.

3. Выполнить снятие клеток с культурального флакона в соответствии с процедурами предыдущего занятия.

4. В раствор трипсина с клетками добавить 4,5 мл полной ростовой среды, тщательно ресуспендировать.

5. В две пробирки внести по 0,5 мл полученной суспензии клеток. В одну добавить 0,5 мл полной ростовой среды, а в другую 0,5 мл 70% этанола. Инкубировать в условиях CO₂-инкубатора 10 минут.

6. Клеточную суспензию после инкубации тщательно ресуспендировать и перенести в другую пробирку по 0,5 мл из каждой. К взятым 0,5 мл клеточной суспензии добавить 0,1 мл раствора трипанового синего, ресуспендировать.

7. 100 мкл полученного окрашенного раствора нанести на подготовленную камеру Горяева и выполнить подсчет количества окрашенных и неокрашенных клеток стандартным способом в соответствии с правилами, освоенными на предыдущем занятии.

8. В ходе выполнения работы по витальному окрашиванию клеток записывать выполняемые расчеты и заполнять таблицу данных.

Таблица 4. Основные данные, полученные при выполнении лабораторной работы

Вариант воздействия на клетки	Количество клеток в сетке камеры Горяева	N ₁ окрашенные клетки, шт.	N ₃ неокрашенные клетки, шт.	N ₂ общее количество клеток, шт.	ЖК, %	C, кл/мл
Без обработки спиртом	Сетка 1					
	Сетка 2					
	N _{ср}	N _{1 ср} =	N _{3 ср} =	N _{2 ср} =		
С обработкой спиртом	Сетка 1					
	Сетка 2					
	N _{ср}					

9. Записать последовательность действий при выполнении всех

процедур при окраске трипановым синим.

10. Представить преподавателю заполненную таблицу и расчеты под ней. Сделать вывод о влиянии 70% этанола на жизнеспособность клеток.

VI. Клонирование клеток

1. Выполнить посев клеток при низкой (клоногенной) плотности в 96-ти луночные планшеты.

2. Инкубировать до образования колоний. Оценить эффективность выполненного клонирования.

3. Выполнить подготовку и включение ламинарно-поточного шкафа в соответствии с процедурами предыдущего занятия. В ходе работы выполнять асептические манипуляции по внесению, размещению и использованию предметов в зоне ламинарно-поточного шкафа в соответствии с процедурами предыдущего занятия. Все манипуляции проводить в ламинарно-поточном шкафу.

4. Обработать поверхность лунок 96-ти луночного планшета раствором коллагена. Стерильный раствор коллагена разлить в 30 лунок планшета по 50 мкл на лунку, поместить в CO₂-инкубатор и оставить на 24 часа. Удалить из лунок избыток раствора коллагена, промыть лунки основной ростовой средой, внося в лунки 40 мкл среды и удаляя до тех пор, пока среда перестанет изменять цвет (минимум 2 раза).

5. Выполнить снятие клеток с культурального флакона в соответствии с процедурами предыдущего занятия.

6. В раствор трипсина с клетками добавить 4,5 мл полной ростовой среды, тщательно ресуспендировать.

7. Клеточную суспензию тщательно ресуспендировать, 100 мкл суспензии нанести на подготовленную камеру Горяева и выполнить подсчет количества клеток в 1 мл стандартным способом в соответствии с правилами, освоенными на предыдущих занятиях.

8. Приготовить серию разведений растворов с понижающейся концентрацией клеток. Из полученной суспензии приготовить 1 мл

суспензии с концентрацией 50 000 клеток на 1 мл. Этот раствор будет первым в серии разведений (P1). Выполнить последующие разведения (P2, P3, P4) в соответствии с приведенной ниже таблицей 5. Перед отбором клеток из каждого раствора обязательно тщательно ресуспендировать его, поскольку клетки опускаются на дно пробирки.

Таблица 5. Получение суспензии клеток низкой концентрации

Параметры	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
Объем предыдущего раствора, мл		0,5	0,2	0,6
Объем добавленной среды, мл		4,5	4,8	3,4
Концентрация клеток в 1 мл	50 000	5 000	200	30
Разведение предыдущего раствора, раз		10	25	6,7

9. В результате проведенных разведений получить 4 мл суспензии с концентрацией 30 клеток/мл.

10. Выполнить посев клеток из суспензии с низкой концентрацией в 30 подготовленных лунок планшета. В каждую лунку поместить по 100 мкл полученной суспензии.

11. Подписать планшет и поместить в CO₂-инкубатор.

12. Провести анализ клоногенности

Реактивы и оборудование: метанол (заменяли на этанол), ледяная уксусная кислота, Crystal violet (генцианвиолет), KН₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl, KCl, среда для культивирования клеток, деионизированная и водопроводная вода, 6-ти луночный планшет, пипетки, наконечники на 1 мл, бокс для утилизации биологического материала.

Растворы: среда для культивирования (DMEM/F12 без глутамина, +10% FBS, +50 мкг/л гентамицина); PBS 1x (На 500 мл: KH_2PO_4 - 1,47 mM, 0,0999г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 4,29 mM, 1,535 г NaCl - 137 mM, 4,007 г KCl - 2,68 mM, 0,199 г, pH 7,4. Стерилизовали в автоклаве 15 мин. при 115°C); фиксатор Карнуа без хлороформа (метанол : уксусная кислота - 3 : 1). Заменяли фиксатором Кларка (этанол : уксусная кислота - 3 : 1); 0,5% раствор crystal violet в метаноле. (Заменяли на р-р в этаноле)

Ход эксперимента:

1 - Посеять клетки: 1000/на лунку.

2 - Облучить/инкубировать с химическим реагентом

(На следующий день (или после прикрепления) разделили клетки на 2 группы - опыт/контроль - по 3 лунки.

К опытной группе добавили по 500 мкМ H_2O_2 , экспозиция - 15 минут при 37°C, сменили среду во всех лунках - по 5 мл)

3 - Инкубировать в течение 9 дней

(За 9 дней в контрольных лунках среда изменила цвет, начал образовываться монослой, что затруднило подсчет колоний. Уменьшили время до 5...7 дней)

I. Окрашивание.

4 - Удалить среду

5 - Отмыть клетки PBS 1x (по 1 мл)

6 - Удалить PBS

7 - Фиксировать клетки (по 1 мл) около 5 минут (Использовали фиксатор Кларка)

8 - Удалить фиксатор

9 - Окрасить в 0,5% crystal violet in methanol - 15 минут. Краситель должен покрыть клетки. (Использовали р-р в этаноле)

10. Смыть краситель водой.

II. Анализ.

11. Подсчитать количество колоний,

(Подсчитывали колонии, содержащие более 20 клеток

Количество колоний в опытной группе: 236; 278; 300.)

12. Рассчитать уровень выживаемости (X)

$X = \text{кол-во в опыте} / \text{кол-во в контроле}$

(Другой способ:

$$PE = \frac{\text{Number of colonies counted}}{\text{Number of cells plated}} \times 100$$

Number of colonies counted – ср. количество колоний в 3 чашках

Number of cells plated - количество клеток в одной чашке (например, 100 клеток, количество которое использовали для 0Гр)

$$SF = \frac{\text{PE of treated sample}}{\text{PE of control}} \times 100$$

PE of treated sample – PE обработанных клеток

PE of control – PE контроля)

8. ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ЭКЗАМЕНУ

1. Радионуклиды биогенных элементов.
2. Радиоактивный распад.
3. Радионуклидная диагностика. Основные понятия.
4. Применение радионуклидов для диагностики.
5. Получение радионуклидов для ПЭТ-диагностики.
6. Меченые соединения.
7. Радиофармацевтический препарат.
8. Циклотрон.
9. Кинетика накопления продуктов ядерной реакции.
10. Сечение реакции.
11. Радиофармацевтические препараты.
12. Радионуклиды для ядерной медицины.
13. Позитронно-эмиссионная томография.

14. РФП первого поколения.
15. РФП второго поколения.
16. РФП третьего поколения.
17. Создание современных препаратов для ПЭТ/ОФЭКТ.
18. Выбор лиганда-вектора.
19. Выбор радионуклида.
20. Влияние линкера.
21. Выбор и влияние хелатирующего агента.
22. Другие способы модификации молекулы РФП.
23. Контроль качества РФ(Л)П.
24. Истинная эндорадиотерапия.
25. Терапевтические РФП 1 поколения.
26. Терапевтические РФП 2 поколения.
27. РФП для внутриартериальной РНТ.
28. Устройство и принцип работы гамма-камеры и ОФЭКТ-сканера.
29. Устройство и принцип работы ПЭТ-сканера.
30. Классификация источников ионизирующего излучения.
31. Природные источники ионизирующего излучения.
32. Техногенные источники ионизирующего излучения.
33. Радионуклиды – источники ионизирующих излучений.
34. Источники α -частиц, протонов и атомов отдачи продуктов деления.
35. Источники электронов.
36. Источники рентгеновского излучения.
37. Радионуклидные источники рентгеновского излучения.
38. Источники γ -излучения.
39. Ускорители – источники тормозного излучения.
40. Портативные источники нейтронов.
41. Радионуклидные нейтронные источники.
42. Генераторы нейтронов.

43. Ускорители.
44. Ядерные реакторы.
45. Реакторы – генераторы постоянных потоков нейтронов и гамма-излучения.
46. Импульсные реакторы.
47. Свойства излучений.
48. Основные методы регистрации ионизирующих излучений: ионизационный, сцинтилляционный, калориметрический, химический, в том числе, и фотографический, термолюминесцентный (ТЛД).
49. Виды детекторов: ионизационные детекторы (ионизационные камеры, пропорциональные счётчики, счётчики Гейгера); сцинтилляционные и черенковские счётчики; полупроводниковые детекторы; диэлектрические детекторы (стёкла, слюды, природные и синтетические кристаллы, органические полимеры); кристаллический детектор, например, алмаз, сернистый цинк, сульфид кадмия и др.
50. Внесистемная (старая) единица измерения радиоактивности (Кюри (Ки)).
51. Единицы радиоактивности в системе СИ.
52. Измерение ионизирующих излучений.
53. Экспозиционная доза.
54. Поглощённая доза.
55. Эквивалентная доза.
56. Основные стадии действия ионизирующего излучения на биологические системы.
57. Радиационные мутации.
58. Понятие о радиочувствительности.
59. Факторы, определяющие радиочувствительность к воздействию повышенных доз ИИ.
60. Основные реакции организма на действие ионизирующего излучения.

61. Детерминированные и стохастические эффекты.
62. Классификация лучевых поражений от внешнего облучения.
63. Общая характеристика поражений от внутреннего радиоактивного заражения.
64. Хромосомные aberrации и их классификация.
65. Классификация радиоиндуцированных хромосомных aberrаций.
66. Радиационно-индуцированные генные мутации.
67. Методы детекции хромосомных перестроек.
68. Репарация ДНК.
69. Радиационно-индуцированное повреждение ДНК.
70. Методы детекции хромосомных перестроек.
71. Репарация ДНК.
72. Радиационно-индуцированное повреждение ДНК.
73. Пострепликационная репарация ДНК.
74. SOS-репарация.
75. Mismatch-репарация (репарация ошибочно спаренных нуклеотидов).
76. Предмет радиационной генетики.
77. Радиогенетические эффекты на разных уровнях организации эукариот.
78. Основные количественные зависимости индукции радиационных мутаций от дозы, вида и мощности излучений.
79. Биологические проблемы радиационного риска.
80. Оценка генетических рисков.
81. Адаптивный ответ.
82. Байстендер эффект (bystander effect, эффект соседства).
83. Влияние ионизирующих излучений на популяции.
84. Механизмы защиты от радиогенетических поражений.
85. Прикладные аспекты радиационной генетики.
86. Ядерная медицина.
87. Методы диагностики в ядерной медицине *in vitro* и *in vivo*.

88.Позитронно-эмиссионная томография.

89.Лучевая терапия и ее три основных варианта лечения: дистанционная лучевая терапия, брахитерапия и системная радионуклидная терапия.

90.Современные методы лучевой терапии опухолей.

91.Дистанционная, внутрисполостная, внутритканевая, аппликационная терапия.

92.Характеристика радионуклидов как источников излучения в радиотерапии.

93.Применение рентгено- и гамма-установок, линейных ускорителей, нейтронных источников.

94.Перспективы использования тяжелых ядерных частиц и нейтронзахватной терапии в лечении онкологических заболеваний.

95.Фракционирование дозы облучения, кинетика клеточных популяций при фракционированном облучении.

96.Понятие о реоксигенации опухоли.

97.Выбор оптимальных режимов фракционирования.

98.Нормирование радиоактивных веществ. Нормы радиационной безопасности» (НРБ-96, 1996).

99.Категории облучаемых лиц. Основные дозовые пределы для разных категорий лиц.

100.Годовая доза облучения у населения.

9. ТЕСТЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

1. Возникновение геномики как научной дисциплины стало

возможным после:

а) установления структуры ДНК;

- б) создания концепции гена;
- в) дифференциации регуляторных и структурных участков гена;
- г) полного секвенирования генома у ряда организмов.

2. Существенность гена у патогенного организма - кодируемый геном продуктнеобходим:

- а) для размножения клетки;
- б) для поддержания жизнедеятельности;
- в) для инвазии в ткани;
- г) для инактивации антимикробного вещества.

3. Гены house keeping у патогенного микроорганизма экспрессируются:

- а) в инфицированном организме хозяина
- б) всегда
- в) только на искусственных питательных средах
- г) под влиянием индукторов

4. Протеомика характеризует состояние микробного патогена:

- а) по ферментативной активности б) по скорости роста
- в) по экспрессии отдельных белков
- г) по нахождению на конкретной стадии ростового цикла

5. Для получения протопластов из клеток грибов используется:

- а) лизоцим
- б) трипсин
- в) «улиточный фермент»
- г) пепсин

6. За образованием протопластов из микробных клеток можно

следить с помощью методов:

- а) вискозиметрии
- б) колориметрии
- в) фазово-контрастной микроскопии
- г) электронной микроскопии

7. Для получения протопластов из бактериальных клеток

используется:

- а) лизоцим
- б) «улиточный фермент»
- в) трипсин
- г) папаин

8. Объединение геномов клеток разных видов и родов возможно при соматической гибридизации:

- а) только в природных условиях;
- б) только в искусственных условиях;
- в) в природных и искусственных условиях

9. Высокая стабильность протопластов достигается при хранении:

- а) на холоду;
- б) в гипертонической среде;
- в) в среде с добавлением антиоксидантов;
- г) в анаэробных условиях.

10. Полиэтиленгликоль (ПЭГ), вносимый в суспензию протопластов:

- а) способствует их слиянию;
- б) предотвращает их слияние;
- в) повышает стабильность суспензии;

г) предотвращает микробное заражение.

11. Для протопластирования наиболее подходят суспензионные культуры:

а) в лаг-фазе;

б) в фазе ускоренного роста; в) в логарифмической фазе;

г) в фазе замедленного роста; д) в стационарной фазе;

12. Гибридизация протопластов возможна, если клетки исходных растений обладают:

а) половой совместимостью;

б) половой несовместимостью;

в) совместимость не имеет существенного значения.

13. Преимуществами генно-инженерного инсулина являются:

а) высокая активность;

б) меньшая аллергенность; в) меньшая токсичность;

г) большая стабильность.

14. Преимущества получения видоспецифических для человека белков путем микробиологического синтеза:

а) простота оборудования; б) экономичность;

в) отсутствие дефицитного сырья; г) снятие этических проблем.

15. Разработанная технология получения рекомбинантного эритропоэтина основана на экспрессии гена:

а) в клетках бактерий;

б) в клетках дрожжей;

в) в клетках растений;

г) в культуре животных клеток.

16. Особенностью пептидных факторов роста тканей являются:

- а) тканевая специфичность; б) видовая специфичность;
- в) образование железами внутренней секреции;
- г) образование вне желез внутренней секреции;

17. Преимущество ИФА перед определением инсулина по падению концентрации глюкозы в крови животных:

- а) меньшая стоимость анализа;
- б) ненужность дефицитных реагентов; в) легкость освоения;
- г) в отсутствии влияния на результаты анализа других белков;
- д) продолжительность времени анализа.

18. Основное преимущество полусинтетических производных эритромицина – азитро-, рокситро-, кларитромицина перед природным антибиотиком обусловлено:

- а) меньшей токсичностью; б) бактерицидностью;
- в) активностью против внутриклеточно локализованных паразитов;
- г) действием на грибы.

19. Антибиотики с самопротированным проникновением в клетку патогена:

- а) бета-лактамы;
- б) аминогликозиды;
- в) макролиды;
- г) гликопептиды.

20. Появление множественной резистентности опухолей к противоопухолевым агентам обусловлено:

- а) непроницаемостью мембраны;
- б) ферментативной инактивацией;
- в) уменьшением сродства внутриклеточных мишеней;

г) активным выбросом.

21. Практическое значение полусинтетического аминогликозида амикацина обусловлено:

- а) активностью против анаэробных патогенов;
- б) отсутствием нефротоксичности;
- в) устойчивостью к защитным ферментам у бактерий, инактивирующим другие аминогликозиды;
- г) активностью против патогенных грибов.

22. Действие полиенов – нистатина и амфотерицина В на грибы, но не на бактерии объясняется:

- а) особенностями рибосом у грибов;
- б) наличием митохондрий;
- в) наличием хитина в клеточной стенке;
- г) наличием эргостерина в мембране.

23. Фунгицидность полиенов нистатина и амфотерицина В обусловлена:

- а) взаимодействием с ДНК;
- б) активацией литических ферментов;
- в) формированием в мембране водных каналов и потерей клеткой низкомолекулярных метаболитов и неорганических ионов;
- г) подавлением систем электронного транспорта.

24. Защита продуцентов аминогликозидов от собственного антибиотика:

- а) низкое сродство рибосом;
- б) активный выброс;
- в) временная ферментативная инактивация;

г) компартментация.

25.Сигнальная трансдукция:

а) передача сигнала от клеточной мембраны на геном;

б) инициация белкового синтеза;

в) посттрансляционные изменения белка;

г) выделение литических ферментов.

26. Из вторичных метаболитов микроорганизмов ингибитором сигнальной трансдукции является:

а) стрептомицин;

б) нистатин;

в) циклоспорин А;

г) эритромицин.

27.Трансферазы осуществляют:

а) катализ окислительно-восстановительных реакций;

б) перенос функциональных групп на молекулу воды;

в) катализ реакций присоединения по двойным связям;

г) катализ реакций переноса функциональных групп на субстрат.

28.Цефалоспорин четвертого поколения устойчивый к беталактамазам грамотрицательных бактерий:

а) цефалексин;

б) цефазолин;

в) цефпиром;

г) цефаклор.

29.Цефалоспорин четвертого поколения устойчивый к беталактамазам грамположительных бактерий:

- а) цефазолин;
- б) цефтриаксон;
- в) цефалоридин;
- г) цефепим.

30. Пенициллинацилаза используется:

- а) при проверке заводских серий пенициллина на стерильность;
- б) при оценке эффективности пенициллиновых структур против резистентных бактерий;
- в) при получении полусинтетических пенициллинов;
- г) при снятии аллергических реакций на пенициллин.

31. Пенициллинацилаза катализирует:

- а) расщепление беталактамного кольца;
- б) расщепление тиазолидинового кольца;
- в) отщепление бокового радикала при С-6;
- г) деметилирование тиазолидинового кольца.

32. Моноклональные антитела получают в производстве:

- а) при фракционировании антител организмов;
- б) фракционированием лимфоцитов;
- в) с помощью гибридом;
- г) химическим синтезом.

33. Мишенью для физических и химических мутагенов в клетке биообъектов являются:

- а) ДНК;
- б) ДНК-полимераза;
- в) РНК-полимераза;

- г) рибосома;
- д) информационная РНК.

34.Активный ил, применяемый при очистке стоков биотехнологических производств – это:

- а) сорбент;
- б) смесь сорбентов;
- в) смесь микроорганизмов, полученных генно-инженерными методами;
- г) природный комплекс микроорганизмов.

35.При очистке промышленных стоков в «часы пик» применяют штаммы-деструкторы:

- а) природные микроорганизмы;
- б) постоянные компоненты активного ила;
- в) стабильные генно-инженерные штаммы;
- г) не стабильные генно-инженерные штаммы.

36.Постоянное присутствие штаммов-деструкторов в аэротенках малоэффективно; периодическое внесение их коммерческих препаратов вызвано:

- а) слабой скоростью их размножения;
- б) их вытеснением представителями микрофлоры активного ила;
- в) потерей плазмид, где локализованы гены окислительных ферментов;
- г) проблемами техники безопасности.

37.Функцией феромонов является:

- а) антимикробная активность;
- б) противовирусная активность;

в) изменение поведения организма, имеющего специфический рецептор;

г) терморегулирующая активность;

д) противоопухолевая активность.

38. Выделение и очистка продуктов биосинтеза и органического синтеза имеет принципиальные отличия на стадиях процесса:

а) всех;

б) конечных;

в) первых;

г) принципиальных различий нет.

39. Основное преимущество ферментативной биоконверсии стероидов перед химической трансформацией состоит:

а) в доступности реагентов;

б) в избирательности воздействия на определенные функциональные группы стероида;

в) в сокращении времени процесса;

г) в получении принципиально новых соединений.

40. Увеличение выхода целевого продукта при биотрансформации стероида достигается:

а) при увеличении интенсивности перемешивания;

б) при увеличении интенсивности аэрации;

в) при повышении температуры ферментации;

г) при исключении микробной контаминации;

д) при увеличении концентрации стероидного субстрата в ферментационной среде.

41. Директором (главным инженером) фармацевтического

предприятия должны являться согласно требованиям GMP:

- а) инженер-экономист;
- б) юрист;
- в) провизор;
- г) врач.

42.Правила СМР предусматривают производство в отдельных помещениях и на отдельном оборудовании:

- а) пенициллинов;
- б) аминогликозидов;
- в) тетрациклинов;
- г) макролидов;
- д) полиенов.

43.Свойство бета-лактамов, из-за которого их следует, согласно СМР, набирать в отдельных помещениях:

- а) общая токсичность;
- б) хроническая токсичность;
- в) эмбриотоксичность;
- г) аллергенность.

44.GLP регламентирует:

- а) лабораторные исследования;
- б) планирование поисковых работ;
- в) набор тестов при предклинических испытаниях;
- г) методы математической обработки данных.

45.Согласно ССР в обязанности этических комитетов входят:

а) контроль за санитарным состоянием лечебно-профилактических учреждений;

б) защита прав больных, на которых испытываются новые лекарственные препараты;

в) утверждение назначаемых режимов лечения;

г) контроль за соблюдением внутреннего распорядка.

46. Причина невозможности непосредственной экспрессии гена человека в клетке прокариот:

а) высокая концентрация нуклеаз;

б) невозможность репликации плазмид;

в) отсутствие транскрипции;

г) невозможность сплайсинга.

47. Прямой перенос чужеродной ДНК в протопласты возможен с помощью:

а) микроинъекции;

б) трансформации;

в) упаковки в липосомы;

г) культивирования протопластов на соответствующих питательных средах.

48. Субстратами рестриктаз, используемых генным инженером, являются:

а) гомополисахариды;

б) гетерополисахариды;

в) нуклеиновые кислоты;

г) белки.

49. Ген маркер» необходим в генетической инженерии:

- а) для включения вектора в клетки хозяина;
- б) для отбора колоний, образуемых клетками, в которые проник вектор;
- в) для включения «рабочего гена» в вектор;
- г) для повышения стабильности вектора.

50. Понятие «липкие концы» применительно к генетической инженерии отражает:

- а) комплементарность нуклеотидных последовательностей;
- б) взаимодействие нуклеиновых кислот и гистонов;
- в) реагирование друг с другом 8Н-групп с образованием дисульфидных связей;
- г) гидрофобное взаимодействие липидов.

51. Поиск новых рестриктаз для использования в генетической инженерии объясняется:

- а) различиями в каталитической активности;
- б) различным местом воздействия на субстрат;
- в) видоспецифичностью;
- г) высокой стоимостью.

52. Успехи генетической инженерии в области создания рекомбинантных белков больше, чем в создании рекомбинантных антибиотиков, что объясняется:

- а) более простой структурой белков;
- б) трудностью подбора клеток хозяев для биосинтеза антибиотиков;
- в) большим количеством структурных генов, включенных в биосинтез антибиотиков;
- г) проблемами безопасности производственного процесса.

53. Фермент лигаза используется в генетической инженерии

поскольку:

- а) скрепляет вектор с оболочкой клетки хозяина;
- б) катализирует включение вектора в хромосому клеток хозяина;
- в) катализирует ковалентное связывание углеводно-фосфорной цепи ДНК гена с ДНК вектора;
- г) катализирует замыкание пептидных мостиков в пептидогликане клеточной стенки.

54.Биотехнологу «ген-маркер» необходим:

- а) для повышения активности рекомбинанта;
- б) для образования компетентных клеток хозяина;
- в) для модификации места взаимодействия рестриктаз с субстратом;
- г) для отбора рекомбинантов.

55.Ослабление ограничений на использование в промышленности микроорганизмов-рекомбинантов, продуцирующих гормоны человека, стало возможным благодаря:

- а) совершенствованию методов изоляции генно-инженерных рекомбинантов от окружающей среды;
- б) повышению квалификации персонала, работающего с рекомбинантами;
- в) установленной экспериментально слабой жизнеспособности рекомбинанта;
- г) экспериментальному подтверждению обязательной потери чужеродных генов.

56.Вектор на основе плазмиды предпочтительней вектора на основе фаговой ДНК благодаря:

- а) большому размеру;

- б) меньшей токсичности;
- в) большей частоты включения;
- г) отсутствия лизиса клетки хозяина.

57.Активирование нерастворимого носителя в случае иммобилизации фермента необходимо:

- а) для усиления включения фермента в гель;
- б) для повышения сорбции фермента;
- в) для повышения активности фермента;
- г) для образования ковалентной связи.

58.Иммобилизация индивидуальных ферментов ограничивается таким обстоятельством, как:

- а) высокая лабильность фермента;
- б) наличие у фермента кофермента;
- в) наличие у фермента субъединиц;
- г) принадлежность фермента к гидролазам.

59.Иммобилизация целых клеток продуцентов лекарственных веществ нерациональна в случае:

- а) высокой лабильности целевого продукта (лекарственного вещества);
- б) использования целевого продукта только в инъекционной форме;
- в) внутриклеточной локализации целевого продукта;
- г) высокой гидрофильности целевого продукта.

60.Иммобилизация клеток продуцентов целесообразна в случае, если целевой продукт:

- а) растворим в воде;
- б) не растворим в воде;
- в) локализован внутри клетки;

г) им является биомасса клеток.

10.САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

Содержание, требования, условия и порядок организации самостоятельной работы обучающихся с учетом формы обучения определяются в соответствии с «Положением об организации самостоятельной работы обучающихся», утвержденным Ученым советом УлГУ (протокол №8/268 от 26.03.2019 г.).

Форма обучения – очная.

Название разделов и тем	Вид самостоятельной работы (проработка учебного материала, решение задач, реферат, доклад, контрольная работа, подготовка к сдаче экзамена, экзамена и др.)	Объем в часах	Форма контроля (проверка решения задач, реферата и др.)
Тема Классификация, свойства и источники излучения	1. • Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины; • Подготовка к тестированию; • Подготовка к сдаче экзамена	9	тестирование, устный опрос, экзамен

<p>Тема 2. Регистрация излучения, единицы измерения</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины; •Подготовка к тестированию; •Подготовка к сдаче экзамена 	<p>9</p>	<p>тестирование, устный опрос, экзамен</p>
<p>Тема 3. Применение источников излучения в медицине</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины; • Подготовка к тестированию; • Подготовка к сдаче экзамена 	<p>9</p>	<p>тестирование, устный опрос, экзамен</p>
<p>Тема 4. Инструментальные средства ядерной медицины</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины; • Подготовка к тестированию; • Подготовка к сдаче 	<p>9</p>	<p>тестирование, устный опрос, экзамен</p>

	экзамена		
Тема 5. Производство радионуклидов медицинского назначения	<ul style="list-style-type: none"> • Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины; • Подготовка к тестированию; • Подготовка к сдаче экзамена 	9	тестирование, устный опрос, экзамен
Тема 6. Синтез и контроль качества радиофармпрепаратов	<ul style="list-style-type: none"> • Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины; • Подготовка к тестированию; • Подготовка к сдаче экзамена 	9	тестирование, устный опрос, экзамен
Тема 7. Радиочувствительность	<ul style="list-style-type: none"> • Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины; • Подготовка к тестированию; 	9	тестирование, устный опрос, экзамен

		<ul style="list-style-type: none"> • Подготовка к сдаче экзамена 		
Тема 8. Основы радиационной генетики		<ul style="list-style-type: none"> • Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины; • Подготовка к тестированию; • Подготовка к сдаче экзамена 	9	тестирование, устный опрос, экзамен
Тема 9. Молекулярная радиобиология		<ul style="list-style-type: none"> • Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины; • Подготовка к тестированию; • Подготовка к сдаче экзамена 	9	тестирование, устный опрос, экзамен
Тема 10. Гигиеническое нормирование радиационных воздействий		<ul style="list-style-type: none"> • Проработка учебного материала с использованием ресурсов учебно-методического и информационного обеспечения дисциплины; • Подготовка к 	9	тестирование, устный опрос, экзамен

	тестированию; <ul style="list-style-type: none"> • Подготовка к сдаче экзамена 		
--	--	--	--

11.УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ И ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

а) Список рекомендованной литературы

основная:

1.Осовская И. И. Синтетические и природные полимеры в биоинженерии: учебное пособие / И. И. Осовская, С. А. Горбачев. - Москва: Инфра-Инженерия, 2023. - 100 с. - ISBN 978-5-9729-1363-3. - Текст: электронный // ЭБС "Консультант студента": [сайт]. - URL: <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785972913633.html>

2.Якупов, Т. Р. Молекулярная биотехнология. Биоинженерия: учебное пособие / Т. Р. Якупов. - Казань: КГАВМ им. Баумана, 2018. - 157 с. - Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/122951>

дополнительная литература:

1.Бекман, И. Н. Ядерная медицина: физические и химические основы: учебник для вузов / И. Н. Бекман. - 2-е изд., испр. и доп. - Москва: Издательство Юрайт, 2024. - 400 с. - (Высшее образование). - ISBN 978-5-534-00691-9. - Текст: электронный // Образовательная платформа Юрайт [сайт]. - URL: <https://urait.ru/bcode/538211>

2.Куцев, М. Г. Биоинженерия растений. Основные методы: учебное пособие / М. Г. Куцев, М. В. Скапцов, И. Е. Ямских. - Красноярск: СФУ, 2020. - 80 с. - ISBN 978-5-7638-4321-7. - Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. - URL: <https://e.lanbook.com/book/181629>

3.Методы и технологии получения фармсубстанций растительного и минерального происхождения: монография / О. В. Астафьева, С. К.

Касимова, Н. А. Ломтева, Е. И. Кондратенко. - Астрахань: Астраханский государственный университет, Издательский дом «Астраханский университет», 2020. — 66 с. — ISBN 978-5-9926-1183-0. - Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. - URL: <https://www.iprbookshop.ru/108842.html>

4.Молекулярная и клеточная радиационная биология: учебное пособие / А. Н. Батян, И. Э. Бученков, Н. Г. Власова [и др.]; А. Н. Батян, И. Э. Бученков, Н. Г. Власова [и др.]. - Минск: Вышэйшая школа, 2021. - 240 с. - Книга находится в премиум-версии IPR SMART. - Текст. - Гарантированный срок размещения в ЭБС до 22.03.2027 (автопродлонгация). - электронный. - Электрон. дан. (1 файл). - URL: <https://www.iprbookshop.ru/120002.html>

5.Химическая технология фармацевтических субстанций: учебное пособие для вузов / А. А. Иозеп, Б. В. Пассет, В. Я. Самаренко, О. Б. Щенникова. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2022. — 384 с. — ISBN 978-5-8114-9937-3. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/201629>

б) программное обеспечение

1. ОС MicrosoftWindows
2. MicrosoftOffice 2016
3. «МойОфис Стандартный»

в) Профессиональные базы данных, информационно-справочные системы

1. Электронно-библиотечные системы:

1.1. Цифровой образовательный ресурс IPRsmart: электронно-библиотечная система : сайт / ООО Компания «Ай Пи Ар Медиа». - Саратов, [2022]. – URL: <http://www.iprbookshop.ru>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. - Текст : электронный.

1.2. Образовательная платформа ЮРАЙТ: образовательный ресурс, электронная библиотека: сайт / ООО Электронное издательство ЮРАЙТ. –

Москва, [2022]. - URL: <https://urait.ru>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. - Текст : электронный.

1.3. База данных «Электронная библиотека технического ВУЗа (ЭБС «Консультант студента»): электронно-библиотечная система : сайт / ООО Политехресурс. – Москва, [2022]. – URL: <https://www.studentlibrary.ru/cgi-bin/mb4x>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст : электронный.

1.4. Консультант врача. Электронная медицинская библиотека: база данных: сайт / ООО Высшая школа организации и управления здравоохранением-Комплексный медицинский консалтинг. – Москва, [2022]. – URL: <https://www.rosmedlib.ru>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст: электронный.

1.5. Большая медицинская библиотека: электронно-библиотечная система: сайт / ООО Букап. – Томск, [2022]. – URL: <https://www.books-up.ru/ru/library/>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст: электронный.

1.6. ЭБС Лань: электронно-библиотечная система: сайт / ООО ЭБС Лань. – Санкт-Петербург, [2022]. – URL: <https://e.lanbook.com>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст: электронный.

1.7. ЭБС Znanium.com: электронно-библиотечная система: сайт / ООО Знаниум. - Москва, [2022]. - URL: <http://znanium.com>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. - Текст: электронный.

2. КонсультантПлюс [Электронный ресурс]: справочная правовая система. /ООО «Консультант Плюс» - Электрон. дан. - Москва: КонсультантПлюс, [2022].

3. eLIBRARY.RU: научная электронная библиотека: сайт / ООО Научная Электронная Библиотека. – Москва, [2022]. – URL: <http://elibrary.ru>. – Режим доступа: для авториз. пользователей. – Текст: электронный

4. Федеральная государственная информационная система «Национальная электронная библиотека»: электронная библиотека: сайт /

ФГБУ РГБ. – Москва, [2022]. – URL: <https://нэб.рф>. – Режим доступа: для пользователей научной библиотеки. – Текст: электронный.

5. Российское образование: федеральный портал / учредитель ФГАУ «ФИЦТО». – URL: <http://www.edu.ru>. – Текст: электронный.

6. Электронная библиотечная система УлГУ: модуль «Электронная библиотека» АБИС Мега-ПРО / ООО «Дата Экспресс». – URL: <http://lib.ulsu.ru/MegaPro/Web>. – Режим доступа: для пользователей научной библиотеки. – Текст: электронный.

12. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Аудитории для проведения лекций, практических занятий, лабораторных занятий, для проведения текущего контроля и промежуточной аттестации.

Аудитории укомплектованы специализированной мебелью, учебной доской. Аудитории для проведения лекций оборудованы мультимедийным оборудованием для предоставления информации большой аудитории. Помещения для самостоятельной работы оснащены компьютерной техникой с возможностью подключения к сети «Интернет» и обеспечением доступа к электронной информационно-образовательной среде, электронно-библиотечной системе.

Перечень оборудования, используемого в учебном процессе: микроскопы, термостат, центрифуга, лабораторная мебель и посуда.

13. СПЕЦИАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ С ОГРАНИЧЕННЫМИ ВОЗМОЖНОСТЯМИ ЗДОРОВЬЯ

В случае необходимости, обучающимся из числа лиц с ограниченными возможностями здоровья (по заявлению обучающегося) могут предлагаться одни из следующих вариантов восприятия информации с учетом их индивидуальных психофизических особенностей:

– для лиц с нарушениями зрения: в печатной форме увеличенным шрифтом; в форме электронного документа; в форме аудиофайла (перевод учебных материалов в аудиоформат); в печатной форме на языке Брайля; индивидуальные консультации с привлечением тифлосурдопереводчика; индивидуальные задания и консультации;

– для лиц с нарушениями слуха: в печатной форме; в форме электронного документа; видеоматериалы с субтитрами; индивидуальные консультации с привлечением сурдопереводчика; индивидуальные задания и консультации;

– для лиц с нарушениями опорно-двигательного аппарата: в печатной форме; в форме электронного документа; в форме аудиофайла; индивидуальные задания и консультации;

- в случае необходимости использования в учебном процессе частично/исключительно дистанционных образовательных технологий, организация работы ППС с обучающимися с ОВЗ и инвалидами предусматривается в электронной информационно-образовательной среде с учетом их индивидуальных психофизических особенностей.