

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

**Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького**

Кафедра біотехнології та радіології

**МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ ТА
ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Методичні вказівки для лабораторних робіт

**здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої
освіти**

спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

ОП «Біотехнології та біоінженерія»

Львів – 2025

Молекулярно-біологічні та генетичні методи дослідження : методичні вказівки для лабораторних робіт здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія ОП «Біотехнології та біоінженерія» / уклад. О. З. Сварчевська, С. О. Слободян. Львів : Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2025. 57°с.

Рецензент : Двилюк І. І. — кандидат сільськогосподарських наук, старший викладач кафедри технології м'яса, м'ясних та олійно-жирових виробів Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького.

Рекомендовано навчально-методичною радою факультету харчових технологій та біотехнології ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького.

Протокол № 2 від 13 березня 2025 р.

ЗМІСТ

Вступ.....	2
Лабораторна робота № 1. Ознайомлення з правилами роботи в лабораторії, охорона праці	3
Лабораторна робота № 2. Кількісний та якісний аналіз зразків нуклеїнових кислот за допомогою гель-електрофорезу.....	15
Лабораторна робота № 3. Кількісний аналіз експресії мРНК певного гена за допомогою ПЛР у реальному часі.....	19
Лабораторна робота № 4. Трансформація бактерій плазмідною ДНК.....	29
Лабораторна робота № 5. Перенесення білків на мембрани.....	32
Лабораторна робота № 6. Очищення реактивів методом перекристалізації...	37
Лабораторна робота № 7. Техніка хроматографування на папері та у тонкому шарі.....	39
Лабораторна робота № 8. Елементний аналіз органічних сполук	41
Лабораторна робота № 9. Загальні методи введення функціональних груп, зміни будови скелету вуглеводнів. Окиснення органічних сполук	44
Лабораторна робота № 10. Відновлення та галогенування органічних сполук	47
Лабораторна робота № 11. Нітрування, алкілування й ацилювання органічних сполук	50
Лабораторна робота № 12. Сульфування, гідроліз та конденсація органічних сполук..	53
Використана література	56

Вступ

Дисципліна пов'язана з молекулярною біотехнологією, молекулярною генетикою та методами органічного синтезу у біотехнології. Ця навчальна дисципліна є основою молекулярно-біологічних та генетичних досліджень в біотехнології. Вона необхідна для розуміння першопричин існування й життєдіяльності природних та штучних форм життя, нормальності та аномальності молекул нуклеїнових кислот.

Головною метою вивчення дисципліни є засвоєння молекулярно-біологічних та генетичних методів діагностики, їх специфіки, різноманітності, галузей використання, а також сформувати навички виконання досліджень шляхом запровадження комплексу методів під час конкретних обставин.

У системі підготовки бакалаврів зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія «Молекулярно-біологічні та генетичні методи дослідження» є основою для розв'язання практичних задач з діагностики, встановлення та ідентифікації ознак, властивостей, функцій різних форм життя.

Виконувати лабораторні завдання доцільно тільки після ґрунтовного ознайомлення з матеріалом, який передбачено програмою, використовуючи рекомендовані підручники і посібники, допоміжну літературу. Бажано повністю записувати хід робіт, посилюючи їх таблицями та малюнками. Під час складання висновків необхідно звертати увагу не тільки на мету роботи, а й визначити практичну значимість процесу, явища для галузі біотехнології — тобто мати узагальнюючий вигляд.

Лабораторна робота № 1

Ознайомлення з правилами роботи в лабораторії, охорона праці

При нагріванні або проколюванні речовин, які можуть розбризкуватися, обов'язково слід користуватися захисними окулярами.

Зберігання і використання у приміщенні лабораторії хімічних сполук повинно відповідати відповідним вимогам:

- У лабораторії мають бути банки для відходів хімічних речовин, які не можна виливати у раковину чи викидати у загальний смітник. Такі банки слід щільно закривати кришками.
- У раковину не можна виливати концентровані розчини кислот і лугів, хромову суміш, ефіри, бензин, хлороформ, отруйні речовини, викидати металеву ртуть, металевий натрій тощо.
- Концентровані кислоти й луги перед тим, як вилити, потрібно попередньо розбавляти водою або, ще краще, нейтралізувати.
- Отруйні речовини необхідно теж нейтралізувати тим або іншим способом, оскільки їхні випари можуть отруїти повітря лабораторії.
- Органічні отруйні речовини досить зручно нейтралізувати хромовою сумішшю.
- Якщо нейтралізувати отруйні речовини немає можливості, то їх можна виливати у раковину лише під витяжкою.

Посуд з хімічними речовинами та їх розчини повинні мати відповідну етикетку або напис олівцем по склу.

Робота з вогнебезпечними і легкозаймистими речовинами

Легкозаймисті речовини повинні зберігатися в спеціальному для цього приміщенні.

Забороняється зберігати в лабораторному приміщенні легкозаймисті леткі горючі речовини (петролейний ефір, сірчаний ефір, ацетон, метиловий і етиловий спирти, бензол, толуол і т. п.) у кількості, яка перевищує добову потребу.

Загальна кількість горючих речовин у лабораторному приміщенні з одною витяжною шафою не повинна перевищувати 5 л. Ці речовини необхідно зберігати у спеціальних залізних скринях. На внутрішній стороні дверцят скрині роблять чіткий надпис з вказівкою найменувань та загальнодопустимої норми зберігання горючих і легкозаймистих рідин у конкретному приміщенні.

Діетиловий ефір необхідно зберігати ізольовано від інших речовин у холодному і темному приміщенні; зберігання його при світлі приводить до утворення вибухової речовини — перекису етилу.

Знаходження горючих речовин на робочому столі при відкритому вогні *категорично забороняється*.

Забороняється зберігати горючі рідини в тонкостінних колбах ємністю більше 200 мл. *Забороняється* тримати горючі речовини у витяжних шафах, де проводиться робота з відкритим вогнем або приладами, включення яких може викликати іскру. *Забороняється* зберігати легкозаймисті рідини разом з

сильними окислювачами (азотна кислота, бром, перекис водню, перекис натрію, чотириокис калію, перекис магнію, ртутне срібло).

Всі роботи, пов'язані навіть з невеликим випаровуванням в атмосферу лабораторії сильнопахучих токсичних речовин (бензол, нітробензол, толуол, ксилол, хлороформ, діетиловий ефір, різні спирти, ефіри органічних кислот, сірчаний вуглець), необхідно проводити тільки у витяжній шафі. З метою запобігання вибуху *забороняється* випаровувати діетиловий ефір досуха. *Забороняється* нагрівання або перегонка легкозаймистих речовин об'єм, яких перевищує один літр.

При роботах з перегонки легкозаймистих рідин необхідно спочатку наповнити водою холодильник, а потім включити нагрівальний прилад із закритим нагрівачем. При збиранні відгонного апарату необхідно особливо ретельно підбирати корки для з'єднання відгонної колби з холодильником.

Для попередження викиду рідини з відгонної колби на плитку або в приймальник необхідно наповнювати колбу лише на 2/3 її об'єму і класти туди 2–3 тонких скляних капіляри, які сприяють нормальному режиму кипіння рідини у відгонній колбі.

Забороняється відкривати вже нагріту відгонну колбу з легкозаймистою рідиною і кидати туди скляні капіляри, пемзу і т. п.

При очистці перегонкою великої кількості легкозаймистих рідин необхідно перегонну апаратуру ставити на великі підставки з піском.

Дерев'яні частини витяжних шаф, в яких проводиться робота з легкозаймистими речовинами, повинні бути пофарбовані вогнетривким лаком або покриті азбестовим картоном.

Категорично забороняється зливати горючі рідини в раковину. Їх зливають у спеціально пристосовану тару, звідки вони вивозяться для знешкодження.

Якщо випадково розіб'ється ємність з легкозаймистою речовиною, необхідно негайно виключити всі нагрівальні прилади, включити витяжну вентиляцію, засипати піском розливу рідину і зібрати її віником на дерев'яну лопаточку або фанерку. Застосовувати металічну лопаточку, якщо підлога плиточна, кам'яна або цементна, *категорично забороняється*, так як може утворитися іскра і відбутися вибух.

У приміщенні, де проводять роботу з ефіром, застосовувати переносні електричні лампи *категорично забороняється*.

Робота з кислотами і лугами

У випадку попадання на шкіру кислоти або лугу можуть виникати тяжкі опіки, а при попаданні в очі — втрата зору.

Концентровані нітратна, сульфатна і хлоридна кислоти повинні зберігатися в товстостінному скляному посуді. Посуд повинен бути захищений від випадкових ударів. *Забороняється* зберігання великої кількості азотної та соляної кислот поза витяжною шафою та в тонкостінному посуді.

Розливання концентрованих кислот повинно проводитися тільки під тягою при максимально прикритих дверцятах витяжної шафи. Тримати склянку необхідно обережно за горловину і дно. Стікаючі по горловині краплі знімають

шматочком азбесту, а потім витирають насухо це місце папером або ганчіркою. Необхідно також обережно поводитися з концентрованими розчинами лугів (їдкого натрію і калію, аміаком). Якщо вони будуть пролиті на підлогу, це місце необхідно засипати піском і після прибирання, злити слабим розчином оцтової кислоти.

Робота з плавиковою (фтористоводневою) кислотою потребує особливої обережності. Попадання її на шкіру, викликає сильний біль і важкозагоювані рани. Вдихання пари плавикової кислоти викликає запалення верхніх дихальних шляхів і псування зубів. При попаданні плавикової кислоти на шкіру — це місце необхідно промити водою і прикласти компрес із 5% розчину соди (бікарбонату натрію).

Хромова суміш також викликає сильні опіки, а тому при митті посуду цією сумішшю необхідно остерігатися попадання її на шкіру, одержу і взуття.

При перенесенні кислот і лугів необхідно виконувати наступні правила:

а) одна людина може переносити не більше 5 кг кислоти або лугу. При цьому, посудина з цими рідинами, повинна знаходитися в плетеному кошику або ящику з міцними ручками (вільні місця між стінками корзини і бутеля заповнюють соломною або стружкою);

б) бутелі більшої місткості переносять два чоловіки також в кошику або ящику з міцними ручками і дном.

Необхідно пам'ятати, що питома вага сірчаної кислоти приблизно вдвічі більша, ніж води, і що бутель на 10 л важить приблизно 20 кг. А тому при транспортуванні більшої кількості концентрованої сірчаної кислоти необхідно приділяти увагу до міцності корзин і ящиків, які використовують в якості тари.

У місцях зберігання азотної кислоти не повинно бути соломи, стружок та інших легкозаймистих речовин. Необхідно пам'ятати, що азотна кислота виділяє газ NO_2 , який є сильним окислювачем органічних речовин.

Бутелі з концентрованими кислотами не можна закривати гумовими корками, а лише керамічними, скляними або пластмасовими. Посуд з концентрованими лугами закривають гумовими корками.

Розливати концентровані кислоти і луги необхідно дуже обережно. Очі працюючого повинні бути захищені окулярами, руки — гумовими рукавичками. Виконання робіт з кислотами і лугами без захисних окулярів *забороняється*.

При роботі з азотною кислотою (питома вага 1,51–1,52), крім захисних окулярів і гумових рукавичок, необхідно одягати довгий фартух з прогумованої тканини або поліетиленової плівки. Зберігати таку кислоту необхідно у скляній, щільно закритій посудині.

При розколюванні великих шматків лугів необхідно обгорнути їх тканиною або папером, одягнути захисні окуляри, рукавички, пов'язати голову захисною хустиною.

При насипанні великої кількості гранульованого лугу в невелику тару (з великої тари) необхідно стати біля витяжної шафи, аби пил не потрапляв до лабораторної кімнати, одягнути окуляри, а ніс зав'язати марлею в 3–4 шари.

Руки після роботи необхідно добре вимити водою. Обличчя обтерти спочатку сухим тампоном вати, а потім умитися.

При розведенні сірчаної кислоти необхідно кислоту лити у воду, а не навпаки! Цю операцію проводять тільки в термотривкій посуді.

Застосування гумових і полімерних шлангів для переливання концентрованих кислот *забороняється*.

Забороняється набирати концентровані луги і кислоти піпеткою, ротом. Для цього необхідно використовувати гумову грушу або автоматичні піпетки. Застосовувати сірчану кислоту у вакуум-ексикаторах, як водопоглинаючий засіб, *забороняється*.

Для зливу відходів концентрованих кислот і лугів у лабораторії повинні бути спеціальні керамічні або скляні товстостінні, термотривкі ємності з кришками (окремо для кислот і лугів).

Правила роботи зі скляним посудом

З метою запобігання травмування при розрізанні скляних трубок, збиранні та розбиранні приладів і деталей, виготовлених зі скла, необхідно дотримуватись відповідних правил безпеки. Скляні трубки невеликого діаметру ламають після підрізання їх напильником або спеціальним ножом для різки скла, попередньо захистивши руки рушником.

При вставленні скляних трубок у гумові корки або гумові трубки, надяганні гумових трубок на скляні трубки (при збиранні приладів) необхідно попередньо змочувати ззовні скляну трубку і внутрішні краї гумові трубки або отвір у корку водою, гліцерином, вазеліновою оливою. Гострі краї скляних трубок необхідно оплавляти.

Збирати скляні прилади або окремі їх частини необхідно обережно, застосовуючи, де це потрібно, еластичні з'єднувачі та прокладки. Особливо необхідно захищати прилади і скляні деталі в місцях їх кріплення на металевих кільцях штативів або утримувачах пружинними прокладками з азбесту, гуми, шкіри і т. п.

При вставленні скляних трубок у просвердлений корок, останній не слід вpirати в долоню, а тримати за бокові сторони. Трубки тримати як можна ближче за кінчик, який вставляється в корок. При закриванні тонкостінного посуду корком необхідно тримати його за верхню частину горловини і як можна ближче до корка. Руки при цьому повинні бути захищені рушником. Нагрітий скляний посуд не можна закривати притертим корком.

ПІДГОТОВКА ДО ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Класифікація основних хімічних реактивів

У залежності від вмісту основної речовини і допустимих домішок для хімічних реактивів встановлена наступна класифікація:

— чистий (ч.) — нижча класифікація реактиву. Вміст основної речовини — 98%, вміст домішок — 0,01–0,5, залишки після прокалювання — до 0,5%;

— хімічно чистий (х. ч.) — вищий ступінь чистоти реактиву. Вміст окремих домішок $1 \cdot 10^{-3}$ – $1 \cdot 10^{-5}\%$, залишки після прокалювання — 0,1%;

– чистий для аналізу (ч. д. а.) — ця класифікація характеризує аналітичне застосування реактиву. Вміст основної речовини — 99%;

– високочисті реактиви — поділяють на спектрально чисті (сп. ч.), еталонної чистоти (е. ч.) і особливо чисті (ос. ч.). Вміст основної речовини та небажаних домішок у цих реактивах повинні відповідати марці еталону.

Реактиви повинні бути герметично упаковані у відповідну тару з відповідною стандартною етикеткою. Етикетка на тарі для реактиву кожної класифікації має відповідний колір або на ній повинна бути кольорова смуга:

Класифікація реактиву:	Колір етикетки:
Чистий (ч.)	Зелений
Хімічно чистий (х. ч.)	Червоний
Чистий для аналізу (ч. д. а.)	Синій
Особливо чистий (ос. ч.)	Жовтий
Інші	Фіолетово-коричневий

Вогненебезпечні, отруйні, вибухонебезпечні реактиви або реактиви з іншими властивостями маркерують етикетками різного кольору: «Вогненебезпечно» — чорна; «Отрута» — жовта; «Вибухонебезпечно» — голуба; «Берегти від води» — зелена.

2. Загальні правила виготовлення розчинів. Виготовляти розчини можна тільки після попередньо проведених відповідних розрахунків. Усі розрахунки виконують заздалегідь і тільки у спеціальному журналі.

При виготовленні розчинів потрібно дотримуватися чистоти. Весь посуд має бути завчасно ретельно вимитий і висушений. Готувати розчини потрібно з чистих реактивів і бідистильованої води.

Для прискорення розчинення твердих речовин їх потрібно спочатку подрібнити.

Для подрібнення речовин не рекомендують використовувати металеві шпателі, а також фарфорові ступки, оскільки вони самі можуть стати джерелом забруднення цих речовин.

Для виготовлення розчинів не рекомендують використовувати гарячу воду, тому що при цьому змінюється співвідношення між розчиною речовиною й розчинником за рахунок його випаровування або, при використанні мірного посуду, об'єму.

Доливати розчинник до необхідної позначки мірного посуду потрібно при тій температурі, при якій він проградуваний, і лише після повного розчинення речовин.

Легкорозчинні речовини й рідини змішують із розчинником вручну, закривши посуд корком. Пухирці повітря досить ефективно розбивають частинки твердих речовин. Якщо розчинення йде повільно, то можна використовувати електромеханічні (електромагнітні) мішалки.

Використовуючи розчини кислот або лугів, наливайте їх тільки у скляний посуд.

Розчиняючи сильні кислоти, особливо сульфатну й нітратну, потрібно доливати кислоту у воду, а не навпаки!

Зважувати хімічні речовини треба лише у скляному або фарфоровому посуді чи на листку кальки, дотримуючись правил зважування.

Зважувати рідкі кислоти, а також леткі рідини можна лише у герметично закритому посуді. Краще відмірювати необхідну кількість рідини мірним посудом. Знаючи густину рідини (вимірюють денсиметром або ареометром), можна завжди розрахувати її масу. Для цього відміряють рідину при тій же температурі, при якій виміряна її густина. Розчиняють сухі луги, додаючи луг у воду невеликими порціями й обережно перемішуючи. Якщо залишити гранульований луг у невеликій кількості води на деякий час, то він злипнеться в одну суцільну масу.

Не можна зберігати розчин лугу у скляній банці з притертим корком.

Зберігати розчини у мірних циліндрах, колбах чи хімічних склянках не можна — їх використовують лише для виготовлення розчинів.

Розчини, які підлягають зберіганню, потрібно зразу ж перелити у товстостінний посуд, який надійно закривається, і написати етикетку.

На етикетці має бути зазначено точна назва розчину (якщо це складний розчин) або формула розчиненої речовини і її концентрація, а також дата виготовлення і прізвище виготовлювача. Рецепт розчину під відповідною назвою потрібно записати у спеціальному журналі.

Банки з розчинами мають бути щільно закриті. Зберігати виготовлені розчини потрібно холодильнику.

Перед використанням потрібно переконатися, чи у розчині не з'явилося помутніння, осаду чи колоній мікроорганізмів. Використовувати такі розчини не можна.

Перед використанням розчини підігрівають до потрібної температури.

Щоб зберегти чистоту розчинів, потрібно корки, відкриваючи банки чи склянки, тримати у руці або класти на стіл зовнішньою поверхнею.

Закривати банки з розчинами потрібно одними і тими ж самими корками; для цього їх також зручно підписати, як і банки.

Набирати розчини потрібно чистою піпеткою або наливати у циліндр або хімічну склянку, попередньо сполоснувши їх цим розчином.

Для розчинів реактивів, які часто використовують, бажано мати підписану окрему піпетку, мірний циліндр тощо.

Найчастіше у фізіологічних дослідженнях для позначення концентрації певної речовини використовують мольно-об'ємну концентрацію або молярність. *Молярність* — це кількість молів розчиненої речовини в 1 л розчину. Позначають найчастіше *моль/л* (або *M*). На практиці у фізіологічних дослідженнях використовують мілімолярні концентрації (0,001 моль/л). Моль — це така кількість речовини, яка містить стільки частинок (атомів, молекул, йонів та ін.), скільки міститься атомів у Карбоні масою 0,012 кг (12 г).

Масу одного моля речовини називають *молярною масою* і виражають її у грамах на моль (*г/моль*). Молярна маса речовини, виражена у грамах, має те

саме числове значення, що і її відносна молекулярна (атомна) маса, виражена в а. о. м.

Види розчинів:

Молярний розчин — це розчин, в якому число грамів розчиненої речовини, що припадає на один літр розчину, збігається з його молекулярної масою, тобто розчин, молярність якого дорівнює 1 М.

Розчин нормальний — розчин, що містить в 1 л 1 г/екв розчиненої речовини. Якщо в 1 л розчину міститься 0,05 грам-еквівалентарозчиненої речовини, то розчин 0,05 н або 1/20 н і т.д.

Насичений розчин — розчин, в якому розчинена речовина за даних умов досягла максимальної концентрації і більше не розчиняється. Осад даної речовини знаходиться в рівноважному стані з речовиною в розчині.

При виготовленні насиченого розчину до розчинника додають звичайно таку кількість розчинюваної речовини, щоб частина її залишалася нерозчинною, скільки б розчин не розмішували і не збовтували. Однак у практиці звичайно користуються ненасиченими розчинами, тобто такими, в яких при даній температурі розчинювана речовина може ще розчинятися (до утворення насиченого розчину).

Буферні розчини — це суміші слабкої кислоти і її солі, утвореної сильною основою або слабкого лугу і його солі. Вони містять певну концентрацію іонів водню H^+ , яка майже не залежить від розведення і мало змінюється при додаванні деякої кількості вільної кислоти чи лугу.

Для виготовлення певного розчину зручно використовувати *маточні* розчини відповідного реактиву. Здебільшого, це одномолярний розчин реактиву, виготовлений на бідистильованій воді. Маточні розчини меншої молярності виготовляють для реактивів, які погано розчиняються у воді (наприклад, 0,5-молярний маточний розчин $CaCl_2$). Для виготовлення одномолярного маточного розчину зважують стільки реактиву, скільки становить його молекулярна маса в грамах, і розчиняють бідистильованою водою в однілітровій мірній колбі при кімнатній температурі, фільтрують і переливають у посуд для зберігання. Такий розчин може тривалий час зберігатися у холодильнику.

Відсоткова концентрація (за масою), або масова частка — це певна кількість грам речовини в 100 г (а не мл!) розчину. Для виготовлення розчину відповідної відсоткової концентрації зважують потрібну кількість реактиву і, зазвичай, доводять об'єм водою до 100 мл. У цей спосіб виготовлені розчини є приблизними, тому для зважування використовують технічні ваги.

Більш точними є відсоткові розчини, виготовлені з урахуванням їхньої густини.

Приклад 1. Потрібно приготувати 100 мл 4% розчину Na_2HPO_4 , густина якого 1,05 г/мл.

100 мл цього розчину має важити:

$$100 \text{ мл} \times 1,05 \text{ г / мл} = 105 \text{ г}$$

Потрібно вагу Na_2HPO_4 знаходимо за пропорцією:

$$100 \text{ г} — 4 \text{ г}$$

$$105z - x$$

Звідси

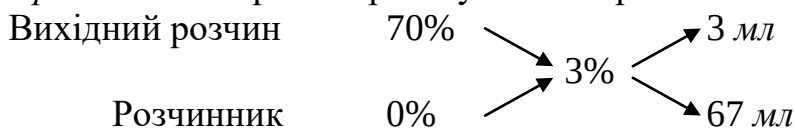
$$x = \frac{105z \times 4z}{100z} = 4,2z \text{ Na}_2\text{HPO}_4$$

Іноді відсоткові розчини готують методом змішування або розбавлення. Суть розрахунку у цьому випадку полягає в тому, що у лівому верхньому кутку пишуть концентрацію у відсотках першого вихідного розчину, у лівому нижньому кутку — концентрацію другого вихідного розчину, розчинника («0%») чи сухої речовини («100%»), а посередині — відсоткову концентрацію потрібного розчину.

Об'єм першого вихідного розчину, який необхідно взяти для змішування, — різницю між концентраціями другого розчину (розчинника чи сухої речовини) і потрібного розчину — записують у верхньому правому кутку. У правому нижньому кутку записують об'єм другого розчину (розчинника або масу сухої речовини), який відповідає різниці між концентрацією першого і потрібного розчинів.

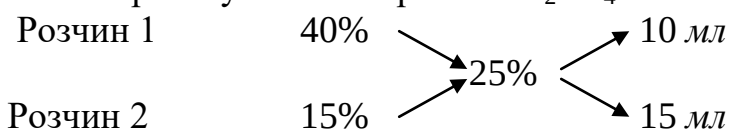
Розраховані таким чином об'єми вихідних розчинів, необхідні для змішування і отримані шляхом віднімання по діагоналі, у схемі знаходяться справа.

Приклад 2. Потрібно приготувати 3% розчин NaOH з 70%.



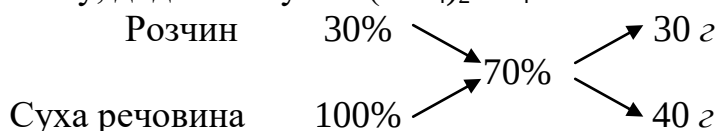
Отже, на кожні 3 мл 70% розчину NaOH потрібно взяти 67 мл H₂O.

Приклад 3. Приготувати 25% розчин H₂SO₄ з 40% і 15% розчинів.



На кожні 10 об'ємів 40% розчину треба взяти 15 об'ємів 15% розчину.

Приклад 4. Маємо 30% розчин (NH₄)₂SO₄. Треба приготувати 70% розчин цього реактиву, додаючи сухий (NH₄)₂SO₄.



На кожні 30 г 30% розчину (NH₄)₂SO₄ треба додати 40 г сухої речовини.

Такий розрахунок називають «правилом павука» або «правилом хреста».

3. Підготовка посуду, приладів і лабораторного обладнання

Скляний посуд. За призначенням хімічний скляний посуд можна поділити на посуд загального, спеціального призначення та мірний посуд.

Посудом спеціального призначення вважають тільки той, який використовують лише з певною метою, наприклад, для визначення молекулярної маси речовини. Його розглядати не будемо.

Посуд загального призначення. Пробірки — вузькі циліндри з заокругленим дном. Можуть мати різну величину і діаметр та бути виготовлені з різного скла. Крім звичайних пробірок, є ще центрифужні, в т. ч. і градуйовані.

Для зберігання пробірок і роботи з ними використовують *штатив*, здебільшого пластмасовий. Використовують пробірки для аналітичних і мікрохімічних робіт, а також для інкубування невеликої кількості тканини.

Наповнювати пробірки потрібно на $1/8$ – $1/4$ об'єму, перемішувати струшуванням. Для струшування рідини *не можна пробірку закривати пальцем*, а слід використовувати гумовий або пластмасовий корок.

Мірний посуд. Мірний посуд використовують для вимірювання об'єму рідин.

Мірні циліндри — товстостінні циліндри з нанесеними на них поділками для позначення об'єму у мілілітрах. Вони можуть бути ємністю від 5–10 мл до 1 л і більше. Здебільшого встановлюють об'єм рідини за нижнім її меніском. Мірні циліндри (як і колби) можуть бути двох типів — калібровані на наливання або виливання.

Мензурки — те ж саме, що і мірні циліндри, але конічної форми (звуженою частиною донизу).

Піпетки використовують для точного вимірювання рідин. Звичайні піпетки — скляні трубки невеликого діаметра із звуженим нижнім кінцем і нанесеними поділками. *Не можна набирати ротом розчини кислот і лугів!*

Розрізняють піпетки *незливні* і *зливні*. У незливних піпетках цифрові позначення поділок починаються зверху, а поділки не захоплюють носик. У зливних — поділки досить часто починаються знизу, від носика.

Із зливних піпеток залишки рідини з носика не потрібно видувати — їхній об'єм не враховує ту кількість рідини, що залишається у носіку. Після зливання потрібно торкатися кінчиком піпетки стінок посудини, щоб рідина повністю витекла. Залишається лише невелика кількість у самому кінчику носика. Кінчиком піпетки можна доторкатися до стінки посудини (*але не занурювати його в розчин*) і під час зливання рідини; тоді вона не буде розбризкуватися.

На стінці колби обов'язково зазначено об'єм і температуру, при якій вона калібрована (найчастіше 20°C). Це означає, що об'єм розчину, налитого у колбу до мітки, відповідає зазначеному об'єму тільки при 20°C . При вищій температурі об'єм колби внаслідок термічного розширення скла стає трохи більшим від зазначеного. Ще більшого розширення внаслідок підвищення температури зазнає рідина. Тому вимірювати об'єм рідини потрібно лише при тій температурі, при якій колба є калібрована. Правда, зміна температури у межах 3 – 4°C мало впливає на зміну об'єму колби і тому при звичайних вимірюваннях цією похибкою нехтують.

Миття й сушіння скляного хімічного посуду. Хімічний посуд завжди має бути абсолютно чистий. Мити посуд потрібно зразу ж після досліду.

Очищувати посуд можна різними методами: фізичними, механічними, хімічними чи їхніми комбінаціями.

Фізичні й механічні методи очищення. Миття водою. Якщо скляний посуд незабруднений смолою, жирами чи іншими нерозчинними у воді речовинами, його можна мити теплою водою, використовуючи при цьому різні мийні засоби: звичайне мило, кальциновану соду або синтетичні мийні засоби. *Скляний посуд вважається чистим, якщо на його стінках не утворюються окремі краплі й вода залишає тоненьку плівку.*

Якщо на стінках є наліт будь-яких солей або осад, то змочений водою посуд чистять щіткою або йоржем, а потім домивають водою.

Працюючи йоржем, потрібно слідкувати, щоб нижній його кінець не вдарявся до дна або стінок, оскільки при цьому досить легко можна розбити посуд. Щоб запобігти цьому, на металевий кінець йоржа натягають шматок гумової трубки відповідного розміру.

Добре вимитий у теплій мильній воді посуд обов'язково потрібно два-три рази прополоскати проточною водою, а потім дистильованою для того, щоб відмити його від солей, які є у водопровідній воді.

Не можна використовувати для очищення скляного посуду пісок, наждачний папір чи сталевий дріт, оскільки вони дряпають його поверхню. Посуд, який має подряпану поверхню, при нагріванні зазвичай тріскає.

Крім зазначених способів, часто використовують спеціальні пристрої для миття посуду (зокрема, пробірок) парою, мийні машини, а також пристрої для механізованого очищення посуду щітками.

Миття органічними розчинниками. До органічних розчинників відносять діетиловий ефір, ацетон, спирти, петролейний ефір, бензин, скипидар, чотирихлористий вуглець та інші речовини. Їх використовують для відмивання посуду від смоли речовин або інших органічних речовин, які не розчиняються у воді. Деколи для ліпшого відмивання використовують їхню пару, але робити це потрібно дуже обережно і з використанням спеціальних пристроїв, оскільки всі органічні розчинники є вогнебезпечні. Використані розчинники зливають у спеціальний посуд, а потім регенерують (за допомогою перегонки) або утилізують.

Застереження. Зберігати органічні розчинники під прямим сонячним світлом, біля нагрівних і електричних приладів, а також у тонкостінному скляному посуді заборонено. Не можна працювати з органічними розчинниками поблизу відкритого вогню та електроплит. Органічні розчинники категорично заборонено виливати у раковину.

Хімічні методи очищення. Хромова суміш. Досить часто у лабораторіях для очищення хімічного посуду використовують хромову суміш — суміш концентрованої сульфатної кислоти з водним розчином калію або натрію дихромату (біхромату), оскільки ці речовини в кислому середовищі є сильними окиснювачами. Окиснення часто супроводжується зміною забарвлення суміші: дихромати мають оранжевий колір, а продукти їхнього відновлення — солі хрому (III) — зелений або зеленувато-фіолетовий.

Для приготування хромової суміші у концентровану сульфатну кислоту додають приблизно 5% від її маси (9 г на 100 мл кислоти) подрібненого порошку кристалічного калію дихромату (калію двохромовокислого) і обережно

нагрівають на водяній бані або електроплиті до повного його розчинення. Кислоту можна розігрівати також, додаючи обережно до неї невелику кількість води (приблизно 50 мл на 1 л кислоти).

Коли для виготовлення хромової суміші використовують *натрію дихромат*, то його розчиняють спочатку у воді, а потім у розчин обережно додають сульфатну кислоту. Суміш готують за пропорцією: вода — 100 мл, натрію дихромат — 6 г, сульфатна кислота (питома вага = 1,84) — 100 мл.

Хромово суміш служить досить довго. Після тривалого використання її колір із темно-оранжевого переходить у темно-зелений, що сигналізує про її непридатність для миття.

Застереження. Хромово суміш досить сильно діє на шкіру й одяг, тому працювати з нею треба обережно.

- Крім повсякденного халата, потрібно використовувати прогумовані фартухи, а також гумові рукавички.

- Якщо ж хромово суміш все-таки потрапляє на шкіру рук або одяг, їх потрібно насамперед обмити великою кількістю води, а потім розчином соди (натрію двовуглекислого) або аміаку.

- При митті піпеток у них не можна набирати хромову суміш ротом, а лише грушею (з отвором).

- Усі солі хромових кислот отруйні!

Зручною у використанні є суміш Комаровського — *суміш 6 н. розчину хлоридної кислоти і 5–6% розчину пероксиду водню*. Ця суміш діє досить енергійно навіть при невеликому підігріванні і не псує скло, що не можна сказати про хромову суміш і перманганат калію. Її можна використовувати кількаразово.

Коли немає хромової суміші, можна використовувати концентровану сульфатну кислоту або концентровані (до 40%) луги. Смоли розчиняються або в кислоті, або у лузі. Після використання лужних мийних засобів, а особливо концентрованих лугів, посуд потрібно добре сполоскати гарячою водою, а ще краще — розбавленою соляною кислотою, оскільки луги добре адсорбуються поверхнею скла і погано відмиваються холодною водою.

Застереження. Зливати в один посуд кислоту і луг заборонено!

Очищення посуду для особливо точних робіт. Скло і кварц, з яких виготовляють лабораторний посуд, мають здатність адсорбувати багато іонів. Зокрема, після миття хромовою сумішшю на стінках посуду залишаються іони хромової кислоти, а також катіони таких важких металів, як Pb, Cu, Zn, Cd, наявність яких може суттєво позначатися на результатах аналітичних досліджень. Особливо це стосується робіт, коли визначають концентрацію Ca^{2+} . Тому такий посуд після полоскання дистильованою водою ополіскують 5% розчином ЕДТА (етилендіамінтетраацетату) для зв'язування солей важких металів і Ca^{2+} або сильно розбавленим розчином *щавлевої кислоти* (0,01 н.) для знешкодження хромат-йонів. Після цього посуд ще раз добре ополіскують водою, бажано бідистильованою.

Сушіння хімічного посуду. Посуд має бути добре висушений.

Методи холодного сушіння (без нагрівання). Посуд можна сушити *на кілках*, які розміщують над раковиною (щоб стікала вода). Залишають посуд на кілках до тих пір, поки він не висохне. Але їх потрібно спеціально обробити, щоб не забруднити посуд. З цієї ж причини їх потрібно завжди витирати (мокрі швидше заповнюються), а також рекомендується обгортати їх фільтрувальним папером. Найкращими є кілки, виготовлені з пластмаси. Зручно також використовувати для сушіння посуду спеціальні решітки.

Недоліком сушіння на кілках є все-таки висока ймовірність забруднення посуду. Тому краще його сушити на столі покритому лінолеумом і застеленому фільтрувальним папером. Сушити так зручно посуд із широкими горловинами, оскільки його можна перевернути. Поставити догори дном мірні колби неможливо, тому їх обов'язково накривають листком фільтрувального паперу або використовують спеціальні штативи з відповідними решітками.

Можна використовувати для сушіння етиловий спирт і діетиловий ефір, якими послідовно ополіскують посуд. Залишки ефіру швидко вивітрюються і посуд залишається чистим.

Застереження. Виливати спирт і ефір у раковину не можна. Їх зливають в окремий посуд для регенерування.

Якщо посуд має бути дуже чистим і не забруднюватися речовинами, що є у повітрі, його можна сушити в ексикаторах, найкраще — у вакуумних, наповнених силікагелем, який адсорбує воду.

Методи сушіння нагріванням. Для прискорення сушіння посуд можна обдувати гарячим повітрям. Деколи його сушать над електроплиткою або «холодним» полум'ям газового пальника. Правда, останній спосіб у сучасних фізіологічних дослідженнях практично не використовують, оскільки посуд забруднюється продуктами горіння.

Нагрівати потрібно обережно, оскільки у випадку нерівномірного нагрівання посуд може тріснути через місцеве охолодження краплями води, які є на його стінках. Посуд слід увесь час повертати і після висушування витерти кіптяву. Мірний посуд (піпетки, колби) не можна нагрівати на полум'ї.

Сушильна шафа. Найкраще сушити посуд у сушильній шафі. Сушити потрібно при температурі 80–120°C. Поличку шафи потрібно застелити фільтрувальним папером. Посуд не можна ставити догори дном, оскільки це сповільнює випаровування води. Після вимкнення сушильної шафи йому потрібно дати вистигнути у ній.

Застереження. Сушильна шафа має бути обов'язково заземленою. Не залишайте сушильну шафу без нагляду!

Після сушіння посуд потрібно покласти у відповідні ящики або шафи тощо. Мірні колби закрити корками або ватними тампонами, мірні піпетки на спеціальних підставках накрити фільтрувальним папером або поліетиленовим мішечком.

Лабораторна робота № 2

Кількісний та якісний аналіз зразків нуклеїнових кислот за допомогою гелі-електрофорезу

Електрофорез — це електрокінетичне явище переміщення частинок дисперсної фази (колоїдних розчинів) в рідкому середовищі під впливом електричного поля. Вперше це явище було відкрито професорами Московського університету П. А. Страховим і Ф. Ф. Рейссом в 1809 році.

Електрофорез в агарозному гелі є стандартним методом для розділення, ідентифікації та очищення інтактних молекул ДНК та їх фрагментів (високомолекулярна хромосомна ДНК завжди фрагментується при ізоляції з клітини). Агароза — фракція природного полісахариду агару.

ДНК — це слабка кислота, тому вона рухається до анода («+») за рахунок негативно заряджених фосфатних груп. За рухом ДНК (РНК) в пластині гелю можна стежити, оскільки смуги забарвленої флуоресцентними барвниками ДНК, що формуються молекулами одного розміру при просуванні через пори гелю, видно в УФ світлі. Для фарбування ДНК застосовують барвник бромистий етидій EtBr ($\lambda_{\max} = 590$ нм). Молекули EtBr інтеркалюють в молекули ДНК, тобто вбудовуються між сусідніми парами нуклеотидів. Інтенсивність флуоресценції зв'язаного EtBr в 20 разів вище, ніж вільного. Таке забарвлення забезпечує високу чутливість: від 10 нг ДНК можна побачити у вигляді смужки оранжевого кольору. Застосовують і інші барвники, зокрема SYBR Green ($\lambda_{\max} = 497$ нм). Довжина хвилі приладу для візуалізації ДНК УФтрансілюмінатора — 305–320 нм.

Швидкість руху ДНК (РНК) через пори агарозного гелю при електрофорезі визначається розміром молекул і їх конформацією. Молекули лінійної двохланцюгової ДНК переміщуються в товщі гелю зі швидкостями обернено пропорційними десятковому логарифму їх молекулярних мас. Попереду мігрують низькомолекулярні фрагменти, великі молекули рухаються повільніше внаслідок більшого опору. З нативних молекул НК швидше за все рухається тРНК розміром 70–90 нуклеотидів і 5S рРНК розміром 120 нуклеотидів. Найбільш великі фрагменти геномної (хромосомної, ядерної) ДНК можуть досягати розмірів 100000 пар основ. Для визначення розміру фрагментів використовують маркери молекулярної ваги (DNA Ladder), які наносять в сусідні лунки гелю.

1. Приготування агарозного гелю

Заливка гелю. Агароза легко плавиться при нагріванні до 95°C (в електрофорезному буфері). При виливанні розплаву в форму і його застиганні виходять прозорі пружні гелі. Лунки (кишені) для внесення ДНК на геліелектрофорез формуються шляхом вставки гребінки з зубцями в незастиглий гель і її вилученням після полімеризації пластини гелю.

Концентрація агарози в гелі. Швидкість руху ДНК в порах гелю залежить від концентрації агарози. Знаючи розміри молекул ДНК в суміші, можна підбором концентрації домогтися їх найкращого розділення (табл. 1).

Таблиця 1

Залежність ефективності розділення фрагментів ДНК від кількості агарози в гелі

Концентрація агарози в гелі, %	Межі ефективного розділення молекул ДНК, kb
0,3	5–60
0,6	1–20
0,7	0,8–10
0,9	0,5–7
1,2	0,4–6
1,5	0,2–4
2,0	0,1–3

Забарвлення ДНК в агарозних гелях. Для візуалізації ДНК застосовують її фарбування бромистим етидієм EtBr (3,8-діаміно-5-етил-6-феніл-фенантрідіум бромід). Молекули барвника інтеркалюють (вбудовуються) між сусідніми парами нуклеотидів ДНК. Етидіум бромід додають зазвичай в розплав агарози до полімеризації гелю пластини. Максимум поглинання EtBr спостерігається при довжинах хвиль 300 і 360 нм, а емісія відбувається в червоно-помаранчевій області видимого спектру при 590 нм.

Матеріали та обладнання: Агароза, гребінка, форма для заливки горизонтального гелю (т.зв. «плашка», можна використовувати кришку від імунологічного планшета).

Розчини

– 5× електрофорезний буфер TBE. На приготування 1 л буфера: Tris-ОН (основа) – 54 г; борна кислота – 27,5 г; 0,5М ЕДТА, рН 8,0 – 20 мл.

– EtBr. Розчин 10 мг / мл у воді. Зберігати в темряві в холодильнику. Тріс-ацетатний буфер (ТАЕ) — буферний розчин, що містить трис, оцтову кислоту і ЕДТА (етилендіамінтетраоцтової кислоти).

Таблиця 2

Компоненти для приготування 50-кратного ТАЕ буфера

Компонент	Кількість для приготування 100 мл розчину
Тріс (основа)	24,22 г
ЕДТА (динатрієва сіль)	1,862 г
Оцтова кислота (льодяна)	8,96 мл
H ₂ O (деіонізована)	73,3 г

Для отримання робочої концентрації 50-кратний буфер розводять в дистильованій воді в співвідношенні 1:49.

Тріс (англ. Tris, THAM) — скорочена назва хімічної сполуки тріс (гідроксиметил) амінометана (HOCH₂)₃CNH₂. Тріс широко використовується в

біохімії і молекулярній біології в якості буферного розчину, наприклад, в буферних системах TAE і TBE, для розчинення нуклеїнових кислот.

Методика:

1. Зважити розраховану кількість порошку агарози (1 г для підготовки 100 мл 1% гелю) і висипати в хімічний термостійкий стакан. Налити в стакан 20 мл 5× електрофорезного буфера TBE і довести до 100 мл водою.

2. Нагріти суміш на електроплитці або СВЧ-печі до повного розплавлення.

3. Охолодити розплав до 50–60°C (стакан можна тримати в руках). Додати EtBr до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл: лаборанту слід взяти 5 мкл зі стокового розчину EtBr з концентрацією 10 мг/мл на 100 мл розплаву.

4. Встановити гребінку $\approx$ в 1 см від краю форми. Вилити розплав, перемішавши.

5. Після того як гель повністю полімеризується (30 хв) обережно видалити гребінку, похитавши її з боку в бік і потягнувши вгору.

2. Гель-електрофорез ДНК

Буфер для нанесення зразків на гель. Розчин ДНК в лунки гелю вносять в буфері, що містить гліцерин або сахарозу, щоб ДНК відразу опустилася на дно лунки, а не розчинилася в електрофорезному буфері ще до вмикання струму і входження в гель. Щоб стежити за проходженням фронту фореа в буфер додають спеціальні барвники. Електрофоретична рухливість бромфенолового синього (БФС) лежить в районі 100 основ. Синя пляма БФС рухається на рівні тРНК, це лідируючий барвник. Рухливість ксіленціанола (КЦ, зеленого кольору) перебуває на рівні 460 нуклеотидів.

Кількість ДНК на доріжку гелю. Нижня межа візуалізації ДНК визначається використанням методом її детекції. Якщо застосовується фарбування EtBr, то можна побачити від 10 нг ДНК в смужці шириною 5 мм. Занадто велика кількість ДНК на доріжці гелю («перевантаження», >1 мкг) призводить до зміни рухливості смуги, яка рухається швидше, і до розмивання смуг. Кількість ДНК, яку можна внести в лунку, залежить від кількості і розміру фрагментів ДНК. Зазвичай вносять 0,2–0,5 мкг ДНК в лунку.

Геномна ДНК на відміну від плазмідної і фагової завжди дає шлейф з фрагментів різного розміру. В УФ світлі спостерігається рівномірне фарбування по всій довжині гелю, так званий «шмер» (від англ. Smear – пляма, мазок).

Електрофорезні буфери. Зазвичай застосовують буфери, що містять 50 мМ Tris-ацетат, Tris-борат або Tris-фосфат з рН 7,5–8,0. Найчастіше їх готують концентрованими і зберігають при кімнатній температурі. Trisборатний і Tris-фосфатний буфери мають велику ємність і дають більш гарне розрішення, але

якщо далі потрібно проводити ДНК-гібридизацію або секвенування використовується Tris-ацетатний буфер.

Напруженість поля. Ефективне розділення фрагментів ДНК відбувається при напруженості, що не перевищує 5 В/см гелю. Зі збільшенням напруженості ефективність розділення ДНК погіршується.

При підвищеній температурі молекули ДНК особливо легко втрачають барвник EtBr, що відбувається, якщо проводити електрофорез при високій напрузі. Етідіум бромід при електрофорезі рухається від «+» до «-», тобто в напрямку, протилежному руху ДНК. Щоб він не йшов з гелю, коли, наприклад, ДНК внесена в малій кількості, потрібно ввести його прямо в буфер.

Рухливість різних форм ДНК. Дволанцюжкові молекули ДНК, що мають однакову молекулярну масу, але різні конформації будуть рухатися з різною швидкістю. Так, кільцева суперспіралізована форма плазмід, кільцева з одноланцюговим розривом і лінійна форма плазмід рухаються в агарозному гелі з різними швидкостями.

В 1% агарозному гелі одноланцюгова ДНК (іРНК) рухається приблизно на 10% швидше, ніж двохланцюгова ДНК того ж розміру. Ця ДНК (РНК) забарвлюється бромистим етидієм приблизно в 4–5 разів слабкіше, що необхідно враховувати при візуальній оцінці результатів електрофорезу.

Матеріали та обладнання

Агарозний гель, розчин ДНК бактеріального, рослинного або тваринного походження, маркер молекулярної ваги (комерційний препарат) або ДНК фага λ , рестрикована HindIII, джерело струму, камера для електрофореза, УФтрансілюмінатор.

Розчини

– 10× буфер для нанесення зразків: 0,025 г бромфенолового синього БФС; 4 мл гліцерину; 5 мл 0,5 М ЕДТА, рН 8,0; довести до 10 мл бідистилятом.

Методика

1. Помістити плашку з гелем в електрофорезну камеру, залити 1× буфер ТВЕ так, щоб він повністю покрив агарозу. Шар буфера над агарозою повинен бути до 5 мм, інакше гель може «обсохнути».

2. Змішати 10 мкл розчину ДНК і 1 мкл 10× буфера для нанесення зразків на гель в пробірці, в лунці малого імунологічного планшета або просто на поверхні тефлонової гребінки. Ретельно піпетувати.

3. Нанести зразок(и) мікропіпеткою в лунку гелю.

4. Нанести маркер молекулярної ваги в сусідню лунку гелю.

5. Увімкнути джерело струму і провести електрофорез при напрузі 100 В протягом 1,5–2 год. (до виходу лідируючого барвника БФС з гелю).

6. Відключити струм, вийняти плашку і переглянути гель в УФ світлі.

7. Сфотографувати гель цифровою фотокамерою. Агарозні гелі з ДНК, на відміну від поліакриламідних з білками, слід фотографувати відразу, оскільки при зберіганні смуги ДНК (ДНК-бенд) стають розмитими внаслідок дифузії. Як показує досвід, на наступний ранок смуги нечіткі.

Лабораторна робота № 3

Кількісний аналіз експресії мРНК певного гена за допомогою ПЛР у реальному часі

Мета роботи. Визначити рівень експресії певного гена за допомогою ПЛР у реальному часі.

ПЛР в реальному часі (англ. real-time PCR – RT-PCR) або кількісна ПЛР (англ. quantitative PCR – qPCR) — ще один різновид ПЛР, який використовується для одночасної ампліфікації та вимірювання кількості даної молекули ДНК. Метод ПЛР в режимі реального часу включає в себе одночасно детекцію та кількісне визначення (вимірювання безпосередньо кількості копій, або вимір копій щодо внесеної ДНК або додаткових калібрувальних генів) специфічної послідовності ДНК у зразку. Метод використовує загальні принципи ПЛР, основна відмінність полягає в тому, що вимірюється кількість ампліфікованої ДНК в реальному часі після кожного циклу ампліфікації.

Для кількісного визначення використовують два методи — флюоресцентні барвники, інтеркалюючі в дволанцюгові молекули ДНК і модифіковані дезоксинуклеотиди, які флюорисцюють після гібридизації з комплементарними ділянками ДНК. Компанія «Applied Biosystems by Life Technologies» розробила технологію ПЛР, засновану на застосуванні OpenArray-пластин.

Останньою розробкою у методі кількісної ПЛР є *цифрова ПЛР* (англ. digital PCR – dPCR, dePCR), яка є абсолютним методом вимірювання. Цифрова ПЛР проводиться в тому разі, коли є необхідність у вкрай високій чутливості і точності у кількісній оцінці нуклеїнових кислот. Для проведення кількісної ПЛР застосовують нанофлуїдні чіпи, які проходять етап завантаження. Після завершення завантаження чіпу, проводять процедуру ампліфікації. Концентрація ДНК-мішені визначається в початковому зразку у вигляді числа копій в мікролітрі з чутливістю до 1 молекули. Реакційна суміш з досліджуваним матеріалом розділяється на безліч мікрореакторів, в кожному з яких проходить індивідуальна ПЛР. Розподіл молекул ДНК по краплях (або лунках мікрочіпа) відбувається випадковим чином. Певна лунка може містити або не містити молекулу ДНК. Після ампліфікації оцінюється кількість позитивних (містять молекулу нуклеїнової кислоти) і негативних (що не містять молекул нуклеїнової кислоти) реакцій. Оцінка кількості молекул нуклеїнових кислот в початковому зразку проводиться на підставі розподілу Пуассона. Число позитивних крапель безпосередньо залежить від вихідної концентрації мішені в зразку.

Обладнання. Самплери від 2 до 20 мкл та від 20 мкл до 200 мкл, одноразові еппендорфи на 1,5 мл та «наконечники», штативи для еппендорфів,

перманентний маркер, ПЛР-бокс під УФ-лампю (бажано), центрифуга для еппендорфів, стріпи (специфічні, з'єднані одна з одною мікропробірки з оптично прозорими плоскими кришками для ЗТ-ПЛР), програмований детектуючий ампліфікатор (термоциклер), комп'ютер із входом до мережі інтернет, одноразові рукавички без пудри, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи. Перед кількісним аналізом експресії мРНК певного гена за допомогою ПЛР у реальному часі необхідно підібрати праймери, які будуть специфічними до послідовності гена, який буде аналізуватися.

При підборі оптимальної пари праймерів (прямого й зворотного) зручно використовувати програмне забезпечення, наприклад, «GeneRunner» від «Hastings Software Inc.», «Primer-BLAST» (також за її допомогою можна перевірити специфічність обраної пари праймерів до заданої послідовності), доступний на сайті NCBI. Дуже хороші праймери підбирає програма «Primer Express» («Applied Biosystems»), якщо ставити температуру плавлення 58–60°C. Однак ця програма задає дуже високі критерії пошуку, в результаті чого вона часто не може підібрати жодної пари до заданої послідовності. Гарні результати виходять також із праймерами, підібраними за допомогою «Vector NTI». Однак працювати має сенс тільки з праймерами, яким програма присвоює максимальний рейтинг (при стандартних умовах пошуку він дорівнює 171). Програму «Primer3» використовувати не рекомендується — у неї занадто м'які критерії відбору.

Підбір послідовностей праймерів для кількісного аналізу експресії мРНК гена *Ptgs2* (COX2 – циклооксигеназа 2) за допомогою ПЛР у реальному часі. Перш за все, на сайті NCBI знайти послідовність гена *Ptgs2* для щура (*Rattus norvegicus*) (рис. 1).

Ptgs2 prostaglandin-endoperoxide synthase 2 [*Rattus norvegicus* (Norway rat)]

Gene ID: 29527, updated on 4-Mar-2017

Summary

Official Symbol	Ptgs2 provided by RGD
Official Full Name	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 provided by RGD
Primary source	RGD:620349
See related	Ensembl:ENSRNOG00000003525
Gene type	protein coding
RefSeq status	PROVISIONAL
Organism	<i>Rattus norvegicus</i>
Lineage	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muridae; Muridae; Murinae; Rattus
Also known as	Cox2; COX-2

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29527#genomic-region-transcripts-products> of arachidonic acid products to

Table of contents

- Summary
- Genomic context
- Genomic regions, transcripts, and products
- Expression
- Bibliography
- Variation
- Pathways from BioSystems
- Interactions
- General gene information
 - Markers, Homology, Gene Ontology
- General protein information
- NCBI Reference Sequences

Рис. 1. Вікно з інформацією про послідовність гена *Ptgs2* щура на сайті NCBI. Пояснення в тексті

Ретельно проглянути інформацію стосовно гена на сторінці (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29527>), поки не буде знайдено підзаголовок: «mRNA and Protein(s)» (рис. 2).



Рис. 2. Вікно з інформацією про мРНК гена Ptgs2 щура на сайті NCBI. Пояснення в тексті

Натиснути мишкою на напис на сторінці — NM_017232.3 і перейти до послідовності мРНК цього гена. Продивитись інформацію про мРНК гена і в правому верхньому куті сторінки у меню — «Analyze this sequence» натиснути мишкою на — «Pick Primers» (рис. 3).

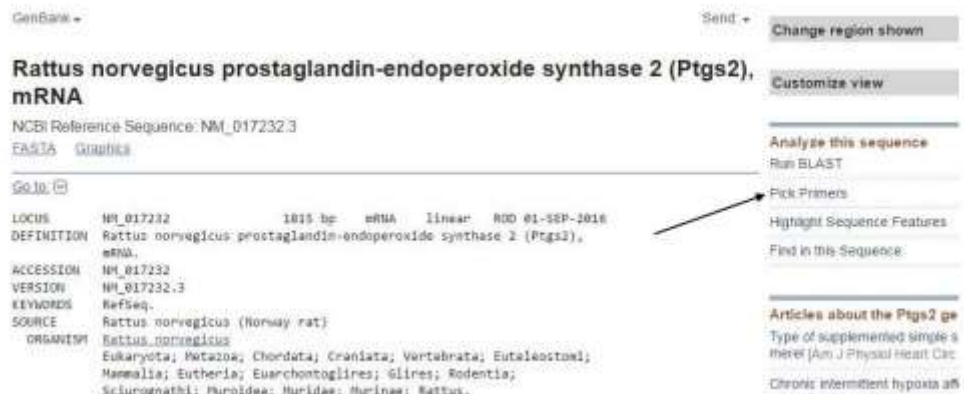


Рис. 3. Вікно з інформацією про послідовність мРНК гена Ptgs2 щура на сайті NCBI. Пояснення в тексті.

У вікні, яке відкриється (рис. 4), обрати чи вписати відповідні критерії підбору праймерів.

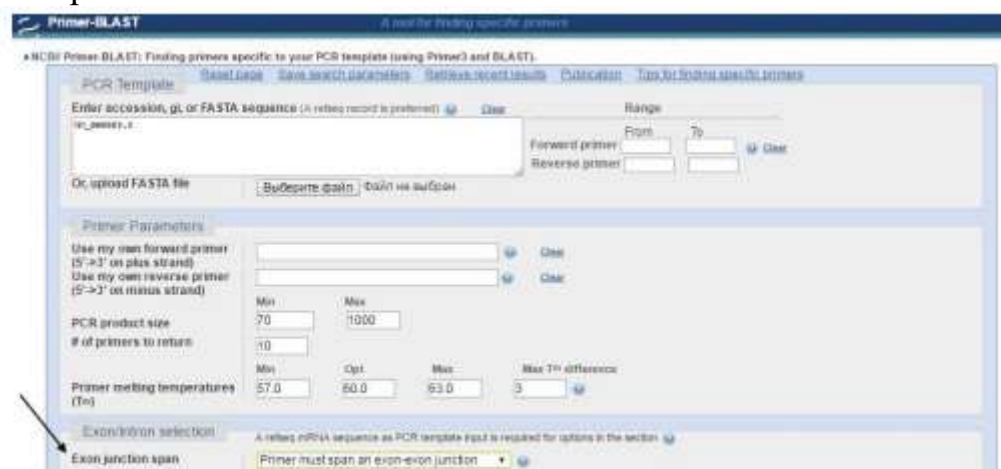


Рис. 4. Вікно з інформацією про критерії підбору праймерів на сайті NCBI. Пояснення в тексті.

Звернути увагу на те, що рівень експресії гена *Ptgs2* буде аналізуватися за допомогою ПЛР саме у реальному часі, тому критерії наступні:

- 1) довжина 18–30 нуклеотидів;
- 2) розмір продукту ПЛР — 70–150 п.н.;
- 3) ГЦ вміст: 30 – 60%;
- 4) концентрація праймерів: 0,1–0,5 мкМ; оптимальна концентрація — 0,3 мкМ у більшості випадків;
- 5) три і більше 3'-нуклеотида не повинні бути комплементарними самому праймеру, праймеру в парі, пробі тощо задля уникнення формування «шпильок» і димерів праймерів;
- 6) не має бути більше 2 гуанінів чи цитозинів серед останніх п'яти нуклеотидів 3'-кінця праймера задля уникнення формування петель, «шпильок» і димерів праймерів; в ідеалі всі 4 нуклеотида мають бути більш менш рівномірно розподілені по всій довжині праймера;
- 7) T_m (температура плавлення - melting) праймерів, які працюють у парі, у більшості випадків має бути подібною (не повинна відрізнятися більше ніж на 2°C), крім певних випадків; оптимальна T_m — 60°C;
- 8) T_a (температура відпалу (annealing temperature) вибирається в діапазоні 55–70°C (як правило, $T_a \approx T_m - 5$); не повинна відрізнятися у праймерів, що становлять пару для ПЛР, більш ніж на 2°C;
- 9) уникати появи вторинної структури в ампліконі;
- 10) у меню «Exon/intron selection» знайти підменю — «Exon junction span» і обрати — «Primer must span an exon-exon junction» (праймери мають охоплювати місце з'єднання екзонів для того, щоб уникнути можливої ампліфікації ДНК, яка містить інтрони);
- 11) у меню «Primer specificity stringency» обрати відповідні значення стосовно розбіжностей праймерів, які будуть підбиратися, з неспецифічною матрицею, у нашому випадку — з будь-якою послідовністю мРНК, окрім мРНК гена *Ptgs2* задля уникнення неспецифічної ампліфікації;
- 12) для підвищення специфічності праймерів, які обираються, у меню «Advanced parameters» зазначити відповідні критерії, зокрема обрати моделі (термодинамічну тощо) для уникнення формування «шпильок» і димерів праймерів; опція «Internal hybridization oligo parameters» обирається для створення гібридизаційного зонда для подальшого детектування майбутнього ПЛР-продукту та перевірки його специфічності; тощо;
- 13) Натиснути «Get primers».

У вікні, яке з'явилося, розглянути інформацію стосовно обраної пари чи обраних пар праймерів (довжина, температура плавлення, ГЦ вміст, чи три і більше 3'-нуклеотида не комплементарні самому праймеру тощо), обрати одну з них. Також перевірити, чи підібрано праймери саме до мРНК гена *Ptgs2* (чи є напис — «Products on intended target») (рис. 5).

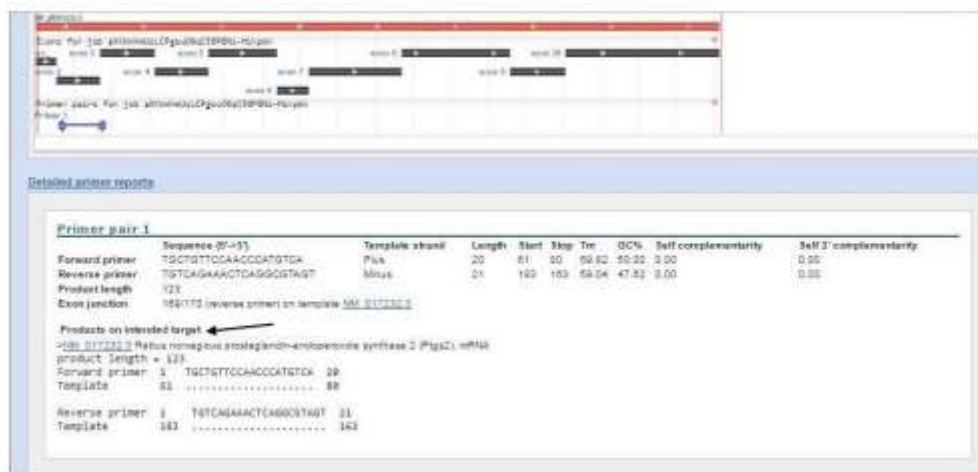


Рис. 5. Вікно з інформацією про підібрані специфічні праймери для послідовності мРНК гена Ptgs2 щура на сайті NCBI. Пояснення в тексті

Якщо замість зазначено напису, є напис — «Products on inintended target», це свідчить про неспецифічність праймерів до мРНК гена Ptgs2, потрібно потворити процедуру підбору, надавши більш високі критерії відбору праймерів. Якщо підбрано специфічні праймери (див. рис. 5), їх синтезують у певній фірмі-виробнику та використовують для визначення експресії гена Ptgs2 за допомогою ПЛР у реальному часі.

Двостадійна кількісна ЗТ-ПЛР. 1) По 100 мкг виділених зразків РНК (2 мкл), що зберігаються в 2,5 об'ємах 96% етанолу, переосадити, а)) у стерильних еппендорфах, додавши 0,1 мкл CH_3COONa до 0,15 М (по 2 мкл РНК + 5 мкл 96% етанолу = 7 мкл). Центрифугувати 7 хв на мікроцентрифузі при 10000 g, при кімнатній температурі, промити осад 100 мкл 96% етанолу, центрифугувати 2 хв на мікроцентрифузі, висушити, розчинити в 2 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist та помістити проби РНК на лід.

Синтез кДНК. Вийняти реактиви (окрім ферментів — дотримуватись правил зберігання!) із морозильної камери (-20°C), помістити їх на лід, розморозити й обережно перемішати. У стерильний еппендорф послідовно додати на льоду наступні компоненти: 0,5 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist, 4 мкл відповідного 5-кратного буферного розчину (250 мМ трис- HCl (рН 8,3 при 25°C), 250 мМ KCl , 25 мМ MgCl_2 , 50 мМ ДТТ — дітіотреїтол), 10 мкл 2 мМ dNTP (1 мМ), 2 мкл (1 мкмоль/л) зворотного праймеру, 0,5 мкл (20 од.) рибонуклеазного інгібітору, 1 мкл зворотної транскриптази (200 од.), 2 мкл РНК (2 мкг), обережно перемішати суспендуванням. Фінальний об'єм реакційної суміші — 20 мкл. Як варіант, синтез кДНК проводити за допомогою комерційного набору.

Синтез проводити за таких умов: 65°C — 5 хв., 45°C — 60 хв на ампліфікаторі.

Кількісна ПЛР у реальному часі. Кількісну ПЛР у реальному часі проводити за допомогою комерційного набору.

Вийняти реактиви (окрім ферментів — дотримуватись правил зберігання!) із морозильної камери (-20°C), помістити їх на лід, розморозити й обережно перемішати. У стерильний еппендорф (у ньому буде стоковий

розчин) послідовно додати на льоду наступні компоненти (кількість кожного з них помножити на кількість різних проб РНК, що будуть у ЗТ-ПЛР, наприклад, якщо 4 проби, кожен компонент множити на 4): 10,5 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist, 12,5 мкл (2X) суміші, яка містить буферний розчин для ПЛР як із KCl (100 mM трис–HCl, pH 8,8 при 25°C, 500 mM KCl, 0,8% нонідет P40), так і з $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (750 mM трис–HCl, pH 8,8, 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% твін 20), 1 од. Таq ДНК полімерази, по 200 mM кожного дНТФ, до 2,5 mM MgCl_2 , флуоресцентний барвник — SYBR Green I, пасивний референсний барвник — ROX; по 1 мкл прямого й зворотного праймерів (0,4 мкмоль/л). 23 мкл суміші (або по 23 мкл суміші у випадку декількох проб РНК) додати в стріп/стріпи. У кожен стріп додати 2 мкл (200 нг) синтезованої кДНК (не більше 10% від фінального об'єму реакційної суміші), а у випадку негативного контролю реакції — 2 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist, обережно перемішати суспендуванням, запобігаючи утворенню бульбашок. Кінцевий об'єм реакційної суміші — 25 мкл.

ЗТ-ПЛР проводити за таких, рекомендованих фірмою-виробником, температурних умов: синтез кДНК 50°C — 30 хв; ініціююча денатурація 95°C — 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95°C — 15 с; гібридизація праймерів 50°C — 35 с; добудова ланцюга 72°C — 30 с.; елонгація ампліфікатів 72°C — 5 хв на ампліфікаторі.

Одностадійна кількісна ЗТ-ПЛР. Синтез кДНК і кількісну ПЛР у реальному часі проводити в тій же самій пробірці за допомогою комерційного набору.

Переосадити по 100 мкг (2 мкл) виділених зразків РНК (як описано вище). Вийняти реактиви (окрім ферментів — дотримуватись правил зберігання! Їх не розморожувати заздалегідь, а виймати з морозильної камери безпосередньо перед внесенням у реакційну суміш!) із морозильної камери (-20°C), помістити їх на лід, розморозити й обережно перемішати. У стерильний еппендорф (у ньому буде стоковий розчин) послідовно додати на льоду наступні компоненти (кількість кожного з них помножити на кількість різних проб РНК, що будуть у ЗТ-ПЛР, наприклад, якщо 4 проби, кожен компонент множити на 4): 7 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist, 12,5 мкл 2x суміші, яка містить буферний розчин для ЗТ-ПЛР, 1 од. Таq ДНК полімерази, по 1 mM кожного дНТФ, до 3 mM MgCl_2 , флуоресцентний барвник — SYBR Green I, пасивний референсний барвник — ROX (фінальна концентрація — 500 nM); 1,25 мкл RT Enhancer (стабілізує ревертазу й підвищує її чутливість); по 1 мкл прямого й зворотного праймерів (0,4 мкмоль/л); 0,25 мкл суміші ферментів (містить ревертазу і рибонуклеазний інгібітор). 23 мкл суміші (або по 23 мкл суміші у випадку декількох проб РНК) додати в стріп/стріпи (специфічні з'єднані одна з одною мікропробірки з оптично прозорими плоскими кришками для ЗТ-ПЛР). У кожен стріп додати 2 мкл (від 1 пг до 100 нг) певної проби РНК (у випадку негативного контролю реакції — 2 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist). Фінальний об'єм реакційної суміші — 25 мкл. ПЛР у реальному часі проводити за таких, рекомендованих фірмою-виробником, температурних умов: синтез кДНК 50°C — 30 хв, ініціююча денатурація 95°C — 15 хв; далі 40

циклів: денатурація ДНК 95°C — 15 с; гібридизація праймерів 50°C — 35 с; добування ланцюга 72°C — 30 с.; елонгація ампліфікатів 72°C — 5 хв на ампліфікаторі.

У реакціях використовувати, наприклад, такі послідовності праймерів: для Ptg2 (COX2–циклооксигеназа 2) — прямий — TGCTGTTCCAACCCATGTCA та зворотний — TGTCAGAAACTCAGGCGTAGT; Slc9a3 (NHE₃ – електронейтральний натрій–водневий транспортер 3) — прямий — CCTGATGGGCGAACTGAAGA та зворотний — GCAGTGACTCCCCAAAAACA; для Actb (ген β-актину, що використовується в якості внутрішнього (ендогенного) контролю реакції завдяки конститутивній експресії) — прямий — TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний — ATTGCCGATAGTGATGACCT.

Відтворюваність результатів ампліфікації перевірити в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів. Після кожного циклу ампліфікації зчитується флуоресценція барвника SYBR Green I, а по закінченні реакції будується крива плавлення (25–95°C) для контролю утворення димерів праймерів та специфічності реакції.

Специфічність отриманих продуктів ПЛР також перевірити за допомогою горизонтального гель-електрофорезу в 2% агарозному гелі, в 0,5 кратному TBE буферному розчині 1,5 год при 5 В/см.

Оформлення результатів експерименту: у зошиті зробити висновок про успішність отримання ПЛР-продукту (чи було отримано після реакції значення порогових циклів — СТ тощо); після аналізу кривих плавлення (відсутність додаткових піків із неспецифічною температурою плавлення) та гелелектрофорезу (відсутність неспецифічних додаткових смуг в гелі, димерів праймерів тощо) зробити висновок про специфічність отриманих продуктів ПЛР.

Аналіз даних ПЛР у реальному часі. Порівняльний метод СТ (ΔΔСТ метод). Відкрити файли з описом проведеної ПЛР у реальному часі на приладі «StepOne™», зокрема вкладку — «Analysis», «Amplification Plot» (рис. 6).

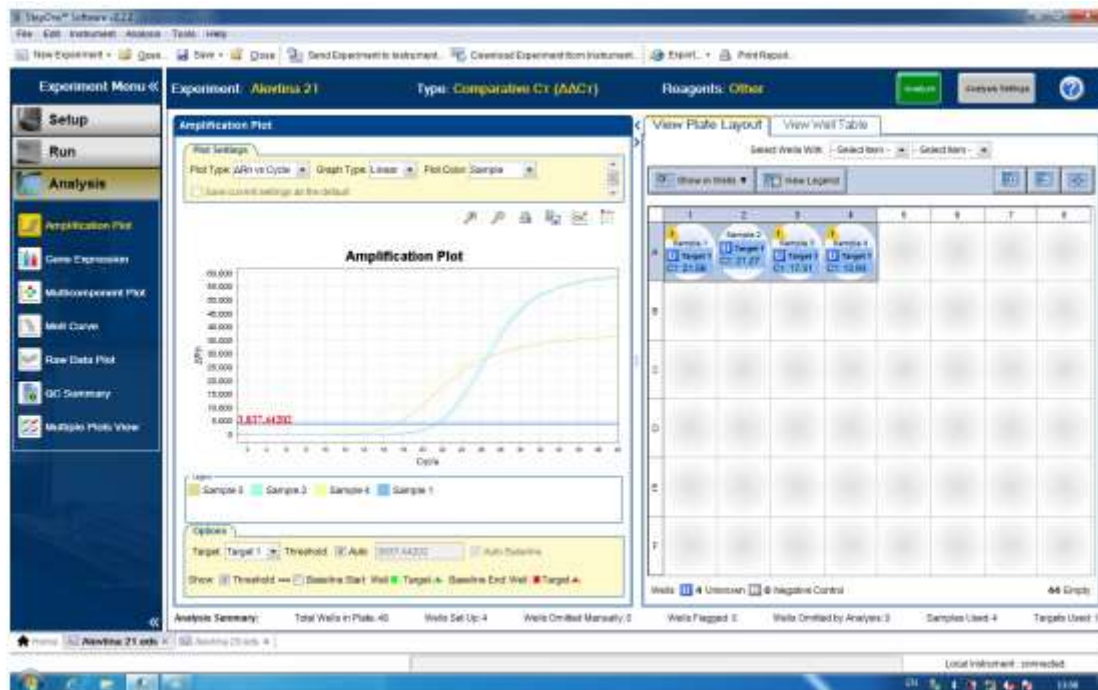


Рис. 6. Програмне вікно з певними результатами ПЛР у реальному часі (прилад «StepOne™»). Пояснення в тексті

Порівняти значення порогових циклів — СТ для проб із геном-мішенню (наприклад, Ptg2) і геном внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії (ендогенний контроль, наприклад, Actb). Перейти до вкладки — «Analysis», «Melt Curve» (рис. 7).

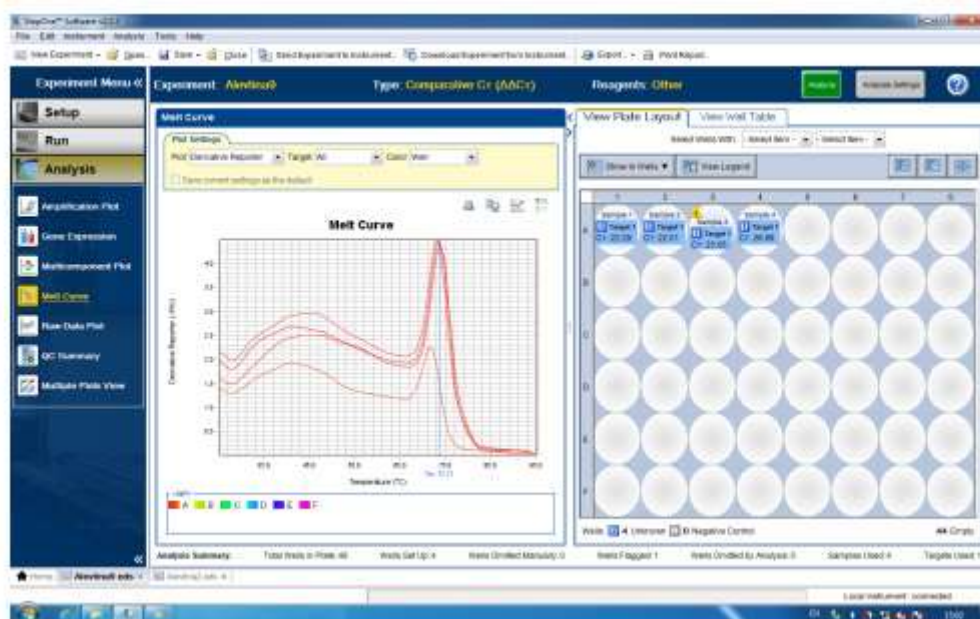


Рис. 7. Програмне вікно з кривими плавлення після ПЛР у реальному часі (прилад «StepOne™»). Пояснення в тексті

Розглянути криві плавлення й зробити висновок про специфічність отриманих продуктів реакції. Визначити ефективність ПЛР у реальному часі при використанні неспецифічної системи детекції (SYBR Green). Для цього у програмі, наприклад, «GraphPad Prism 5.04; 6; 7» («GraphPad Software Inc.», США) обрати регресійний аналіз, ввести по осі X логарифми значень

концентрації РНК (наприклад, нг), яку аналізували в ПЛР у реальному часі; по осі Y — різницю CT між досліджуваним геном-мішенню (наприклад, *Ptgs2*) і геном внутрішнього контролю реакції (наприклад, *Actb*) - ΔCT (рис. 8).

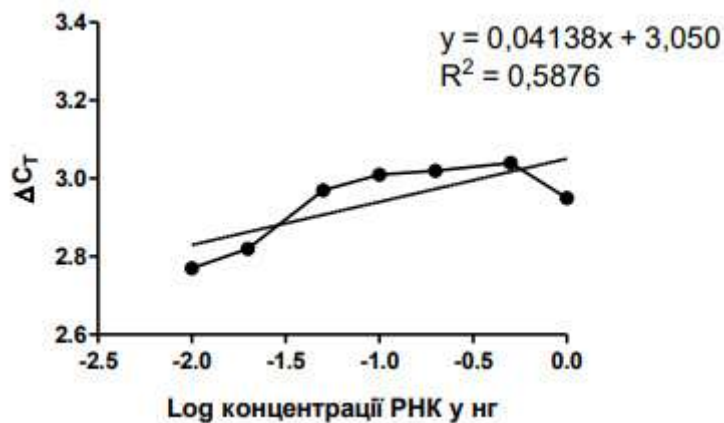


Рис. 8. Залежність різниці порогових циклів між геном — мішенню та геном внутрішнього контролю реакції від вихідної концентрації РНК у реакції

Якщо ефективність однакова, у рівнянні $y = ax + b$ коефіцієнт a (slope) < 0,1 — близько нуля), наприклад: $y = 0,04138x + 3,050$, ($a = 0,04138$). У такому випадку початкову кількість мРНК обраховувати за порівняльним CT методом « $\Delta\Delta CT$ Method». Також ефективність ПЛР у реальному часі для кожної реакції обраховують: $E_x = (10^{-1/\text{slope}}) - 1 \times 100\%$. Відносну кількість мРНК зазначених генів нормалізувати до мРНК *Actb*.

1) Обраховувати референсне (контрольна група тварин) значення ΔCT для ампліфікованого фрагмента гена-мішені (наприклад, *Ptgs2*) наступним чином:

$\Delta CT = CT \text{ гена-мішені} - CT \text{ гена ендogenousного (внутрішнього) контролю}$;

Наприклад, для *Actb* середнє $CT = 23,63$, а середнє значення для *Ptgs2* $CT = 30,49$, тоді ΔCT можна обраховувати: $\Delta CT = 30,49 - 23,63 = 6,86$;

2) Обчислити **стандартне відхилення (SD)** для значення ΔCT контрольної групи тварин. Стандартне відхилення ΔCT розраховується, виходячи зі стандартних відхилень ампліфікованого фрагмента гена-мішені та ендogenousного контролю, і використовуючи формулу:

$SD = (SD_1^2 + SD_2^2)^{1/2}$, де $X^{1/2}$ — це квадратний корінь із X і SD = стандартне відхилення.

Наприклад, обрахуємо стандартне відхилення:

$$SD_1 = 0,15, \text{ тоді } SD_1^2 = 0,022,$$

$$SD_2 = 0,09, \text{ тоді } SD_2^2 = 0,008,$$

$$SD = (0,022 + 0,008)^{1/2} = 0,17.$$

Таким чином, ΔCT_{Ptgs2} (референсне) = $(30,49 \pm 0,15) - (23,63 \pm 0,09) = 6,86 \pm 0,17$.

Так само розрахувати ΔCT і SD для групи тварин, на яких діяв певний чинник.

3) Розрахувати значення $\Delta\Delta CT$. $\Delta\Delta CT$ обраховується за формулою:

$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ гена-мішені (група тварин, на яких діяв певний чинник)} - \Delta CT \text{ гена-мішені (референсні)}$.

Наприклад, якщо ΔC_T Ptgs2 (група тварин, на яких діяв певний чинник) 4,37, а ΔC_T Ptgs2 (референсне) 6,86, то $\Delta\Delta C_T$ дорівнює $-2,5$:

$$\Delta\Delta C_T = 4,37 - 6,86 = -2,5.$$

4) Обчислити **стандартне відхилення (SD)** для значення $\Delta\Delta C_T$. При розрахуванні $\Delta\Delta C_T$ від ΔC_T ампліфікованого фрагмента гена-мішені групи тварин, на яких діяв певний чинник, віднімають ΔC_T ампліфікованого фрагмента гена-мішені (референсне). Це віднімання довільної сталої, тому SD значення $\Delta\Delta C_T$ є тією самою величиною, що і для ΔC_T :

$$\Delta\Delta C_T = 4,37 \pm 0,10 - 6,86 \pm 0,17 = -2,5 \pm 0,10$$

5) Перевести стандартне відхилення в кратну різницю. Кратні різниці, розраховані з використанням $\Delta\Delta C_T$ методу зазвичай виражаються у вигляді діапазону, який є результатом включення значень SD величини $\Delta\Delta C_T$ у розрахунок кратної різниці. Так, діапазон для ампліфікованого фрагмента гена-мішені по відношенню до референсного зразка розраховується наступним чином:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} \text{ із } \Delta\Delta C_T + SD \text{ і } \Delta\Delta C_T - SD$$

Наприклад, у групі тварин, які зазнали впливу певного чинника, ген-мішень має від 5,3 до 6,0-кратну відмінність в експресії по відношенню до контрольних тварин, як показано нижче:

$$\Delta\Delta C_T + SD = -2,5 + 0,1 = -2,4, \text{ тоді } 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(-2,4)} = 5,3 \text{ і}$$

$$\Delta\Delta C_T - SD = -2,5 - 0,1 = -2,6, \text{ тоді } 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(-2,6)} = 6,0.$$

У цьому прикладі тестовий зразок має 0,25 або 1/4 кількості РНК-мішені відносно зразка контрольної групи.

Статистична обробка результатів досліджень. Отримані дані тестують на нормальний розподіл за допомогою тесту Шапіро-Вілка з використанням програмного пакету «GraphPad Prism 5.04; 6; 7». У випадку нормального розподілу подальший обрахунок результатів провести за допомогою односпрямованого дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) із пост-хок тестом Тукея або двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) із пост-хок тестом із використанням поправки Бонферонні. У випадку розподілу, відмінного від нормального, обрахунок результатів провести за допомогою непараметричних аналогів: тесту Крускал-Валіса, критерія Дани Квейд тощо. Отримані результати навести у вигляді середнього арифметичного $\pm$ середньоквадратичне відхилення (дисперсія) — SD. Результати вважати значущими, коли $p \leq 0,05$. На основі отриманих даних побудувати графік, наприклад, як наведено на рисунку 9.

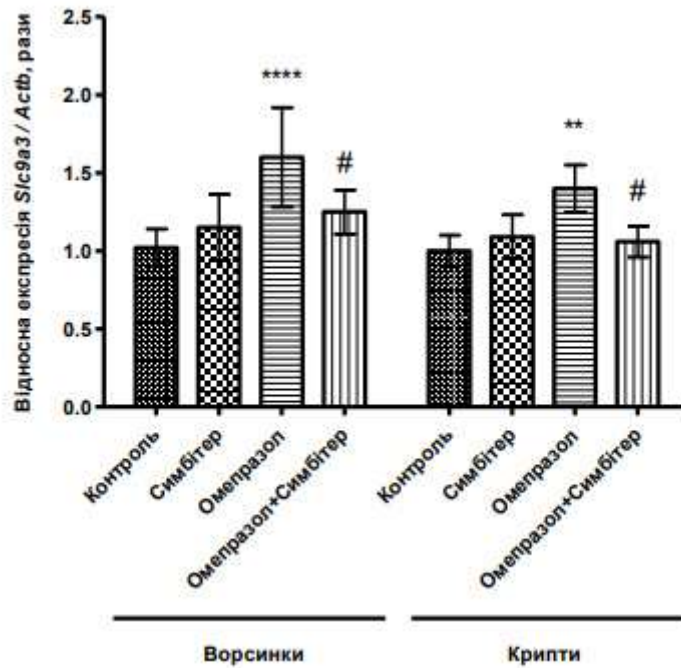


Рис. 9. Рівень експресії мРНК гена Slc9a3 в різних типах епітеліальних клітин дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика Симбітер. **** – $p \leq 0,0001$, ** – $p \leq 0,01$ відносно контролю; # - $p \leq 0,05$ відносно тварин, яким вводили лише омепразол.

Примітка. Отримані результати наведено у вигляді середнього арифметичного $\pm$ середньоквадратичне відхилення (дисперсія) — SD

Оформлення результатів експерименту: у зошиті на основі отриманих значень: $\Delta\Delta C_T$, кратної різниці зробити висновок про відносну кількість мРНК певного гена, а також про достовірність зміни рівня експресії ампліфікованого фрагмента гена-мішені в досліджуваному біологічному матеріалі.

Лабораторна робота № 4

Трансформація бактерій плазмідною ДНК

Виділення плазмідної ДНК із бактерій *E. coli*

Для виділення плазмідної ДНК користуються багатьма методами. Всі вони включають три основних етапи: ріст бактерій й ампліфікацію плазміди; збір бактерій й їхній лізис; очищення плазмідної ДНК.

Ампліфікація в середовищі

Ампліфікацію плазмід здійснюють при вирощуванні бактерії-хазяїна в середовищі в присутності хлорамфеніколу. Нічну культуру (10 мл LB з додаванням антибіотика) пересівають у свіже середовище LB (0,2 мл н.к. в 25 мл LB з антибіотиком) і інкубують поки культура не досягне пізньої логарифмічної фази ($D_{600}=0,6$). Переносять культуру у свіже середовище LB з антибіотиком (500 мл), інкубують 2,5 години (при цьому титр подвоюється), додають антибіотик до концентрації 170 мкг/мл й інкубують ще 12–16 год.

Лізис клітин

Руйнування бактерій для наступного виділення біологічно активної ДНК можна домогтися різними способами.

– Механічні. При цьому відбуваються численні розриви ДНК.

– У багатьох бактерій настає лізис після додавання аніонного детергенту додецилсульфату (або лаурилсульфату). Зокрема, так можна зруйнувати бактерії кишкової групи, пневмококи й гемофільні бактерії. Додецилсульфат не тільки руйнує клітини, але й денатурує деякі білки. Однак потім він повинен бути повністю вилучений з лізату (що й досягається при наступних обробках), тому що його наявність в ДНК, яка трансформується, заважає самому процесу трансформації.

– Деякі грампозитивні бактерії не можна зруйнувати тільки додецилсульфатом або іншими поверхнево-активними речовинами. Спочатку потрібно видалити клітинну стінку й потім застосувати той або інший детергент. Для руйнування клітинної стінки найчастіше застосовують лізоцим. При концентраціях, які найчастіше застосовуються для руйнування бактеріальних клітин (50–500 мкг/мл), функції лізоциму зводяться до руйнування клітинної стінки, у результаті чого утворюються тендітні протопласти, які легко руйнуються детергентами. При більших концентраціях лізоцим може, напевно, впливати на зв'язок ДНК із цитоплазматичною мембраною й навіть зв'язуватися із ДНК, осаджуючи її. Крім лізоциму, для тієї ж мети використовують проназу. Проназа сприяє більш повному гідролізу білка й тому кращій наступній депротеїнізації ДНК.

При руйнуванні бактерій у лізаті в числі інших ферментів з'являються дезоксирибонуклеази. Вони, якщо дія їх чим-небудь не блокована, можуть відразу зруйнувати ДНК. Звичайно від них захищаються, додаючи речовини, які зв'язують іони магнію, які необхідні для роботи більшості ДНК-аз.

Речовини, що зв'язують іони магнію (ЕДТА, цитрат), які додають при лізисі клітин для інактивації дезоксирибонуклеаз і запобігання виділеній ДНК, придушують поглинання ДНК компетентними клітинами. Додецилсульфат і дезоксихолат також придушують трансформацію. Лізоцим і проназа, що залишаються в лізаті, самі можуть лізувати компетентні клітини. У ряді випадків від небажаних домішок, що заважають трансформації, можна позбутися за рахунок його розведення.

Для депротеїнізації лізату при виділенні ДНК використовують обробку фенолом, що осаджує додецилсульфат й інактивує усі білки, у тому числі й дезоксирибонуклеази.

ЕДТА — розпушує зовнішню мембрану, інгібує нуклеази; лізоцим — руйнує клітинну стінку;

SDS — руйнує цитоплазматичну мембрану, денатурує білки, інгібує нуклеази.

Існують різні методики лізису. Лізис кип'ятінням (Holmes, Quigley, 1981) і лізис лугом (Birnboim, Doly, 1979), відрізняються високою ефективністю й у випадку малих плазмід (≤ 10 kb) дають вихід 2–3 мг/л. Лізис під дією SDS (Godson, Varnek, 1973) порівняно більш м'який, і ним варто користуватися у випадку більших плазмід (≥ 10 kb).

Очищення ДНК

У цих методах очищення так чи інакше використовують дві основних

відмінності між ДНК *Escherichia coli* і плазмідною ДНК: 1) хромосома *E. coli* за розміром набагато більша ДНК плазмід, які зазвичай використовуються як вектори; 2) основна маса ДНК *E. coli* виділяється із клітин у вигляді фрагментованих лінійних молекул, тоді як більшість плазмідних ДНК екстрагується у вигляді ковалентно замкнутих кільцевих молекул.

Тому більшість методів очищення включають осадження, при якому із препарату видаляються переважно довгі ланцюги ДНК *E. coli*, випадково захоплені уламки лізованих клітин. Методики ці засновані також на використанні властивостей кільцевої замкнутої ДНК. Кожен з комплементарних ланцюгів плазмідної ДНК являє собою ковалентно замкнуте кільце, тому ланцюг не можна відокремити один від одного (не розірвавши один з них) у тих умовах, при яких відбувається розрив більшості водневих зв'язків у ДНК, наприклад при нагріванні або при витримуванні в помірно лужних розчинах (до рН 12,5). При охолодженні або поверненні до нейтрального рН замкнуті кільцеві молекули знову набувають нативної конформації, тоді як ДНК *E. coli* залишається денатурованою.

Плазмідна ДНК поводить себе на відміну від ДНК *E. coli* також і при рівноважному центрифугуванні в градієнті хлористого цезію, що містять який-небудь інтеркалюючий барвник що насичує концентрації, наприклад бромистий етидій або дийодистий пропідій. Ковалентно замкнуті кільцеві ДНК зв'язують менше такого барвника, ніж лінійна ДНК, і тому в градієнтах хлористого цезію, що містять інтеркалюючий агент, виявляються в зонах з більш високою щільністю. Цю методику використовують, якщо необхідний високий ступінь очищення плазмідної ДНК. Однак у міру розвитку методів роботи з рекомбінантною ДНК для багатьох цілей стало вже не обов'язковим проводити очищення великих кількостей плазмідної ДНК настільки, щоб препарат був гомогенним. Наприклад, розщеплення рестрикуючими ендонуклеазами, лігування, трансформація й навіть секвенування ДНК можна проводити тепер, використовуючи відносно малоочищені препарати плазмідної ДНК, отримані з невеликих об'ємів культури (близько 10 мл). Плазмідну ДНК виділяють із великих об'ємів культури лише в тих випадках, коли потрібні значні її препарати (наприклад, у дослідках по гібридизації для добору специфічних мРНК або коли потрібно позначити 5-кінці фрагментів ДНК за допомогою полінуклеотидкінази).

Описані нижче методики можна успішно використовувати для виділення різноманітних плазмід з різних штамів бактерій. Загалом, чим менша плазміда, тим досягнені результати кращі. Зі збільшенням молекулярної маси плазміди її властивості стають усе ближче до властивостей ДНК-хазяїна. Виділення плазмід, розмір яких перевищує 25 kb, дуже ускладнюється й вихід виявляється невисоким. Однак всі плазміди, що зазвичай використовуються при клонуванні, відносно невеликі й наведені нижче методи дають гарні результати.

Виділення препаративних кількостей плазмідної ДНК лужним методом із клітин бактерій *E. coli*

Розчини:

Розчин для лізису I:

50 mM глюкози
25 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
2 мг/мл лізоциму

на 5 мл:

112,6 мкл 40% глюкози
125 мкл 1M Трис, pH 8.0
100 мкл 0,5 M EDTA
10 мг лізоциму
4,66 мл H₂O

Лужний розчин II:

0,2 н NaOH
1% SDS

на 10 мл:

200 мкл 40% NaOH
1 мл 10% SDS
8,8 мл H₂O

Розчин III:

3 M CH₃COONa (pH 4.8)

1. Нарощуємо культуру в 150 мл середовища LB+Amp при 37° С (20–24 години).
2. Осаджуємо клітини (4000 про/хв, 15 хв).
3. Ресуспендуємо клітини в 2,4 мл розчину I, що містить 2 мг/мл лізоциму (лізоцим не працює, якщо pH <8,0).
4. Витримуємо 15 хв у льоді.
5. Додаємо 4,8 мл свіжовиготовленого розчину II. Пробірку закриваємо парафіном і перевертаємо кілька разів **обережно!**
6. Витримуємо 5–10 хв у крижаній бані.
7. Додаємо 7,2 мл охолодженого розчину III. Різно перевертаємо пробірку, заклеєну парафіном.
8. Витримуємо 30–60 хв у крижаній бані.
9. Центрифугуємо 20 хв при 6000 об/хв при 4°С.
10. До супернатанту додаємо 2 об'єми етанолу й витримуємо 1 годину в морозильнику (-20°С).
11. Центрифугуємо 30 хв при 6000 об/хв при 4°С.
12. Осад розчиняємо в 1 мл ТЕ-буферу.

Лабораторна робота № 5 **Перенесення білків на мембрани**

Гібридизація широко використовується для виявлення певних нуклеотидних послідовностей в суміші рестрикційних фрагментів. Такий

прийом носить назву "блоттинг" (від англ, blot – промокати). З цією метою рестрикційні фрагменти фракціонують методом електрофорезу в 0,8% агарозі, що дозволяє розділити до 500 фрагментів, які відрізняються за розміром всього на один нуклеотид. Потім гель поєднують з аркушем паперу нітроцелюлози.

В результаті дифузії фрагменти частково переходять на цей лист (blot), і таким чином, виходить реплікат (відбиток) з гелю. Потім методом радіоавтографії з використанням радіоактивного ДНК-зонду і рентгенівської плівки визначають на репліці положення фрагментів, які гібридизуються із зондом. Виявлення фрагментів ДНК з використанням ДНКзондів, що призводить до утворення гібридів ДНК:ДНК, носить назву саузерн- блоттингу.

За методом нозерн-блоттингу ДНК-зонди гібридизують з реплікатами гелю, в якому фракціонують РНК, що призводить до утворення гібридів ДНК:РНК. Гібридизацію (блоттинг) зондів можна здійснювати на цілих хромосомах, які вдається фракціонувати величезні молекули ДНК.

Блот-гібридизація — високочутливий метод ідентифікації специфічних послідовностей ДНК. Гібридизація ДНК ґрунтується на утворенні водневих зв'язків між двома комплементарними ланцюгами ДНК, що призводить до їх з'єднання. Залежно від типу речовини, що вивчається, способів його попередньої обробки і перенесення (блоттинга) розрізняють декілька різновидів цього методу. Саузерн-блот, або блот-гібридизація по Саузерну — найбільш ефективний метод ідентифікації певних молекул ДНК серед фрагментів розділених електрофорезом (запропонований в 1975 р. Едвардом Саузерном). Для виявлення певної послідовності ДНК в суміші за допомогою Саузерн блоттингу ДНК обробляють однією або декількома рестриктазами і фрагменти, що утворилися, розділяють по відносній молекулярній масі в агарозному або акриламідному гелі. Далі фрагменти ДНК піддають денатурації *in situ* і переносять з гелю на щільний носій. Блоттинг (перенесення) здійснюється за рахунок дії капілярних сил, електричного поля або вакууму. Далі фіксовану на цьому носії ДНК гібридизують з радіоактивно міченим ДНК- або РНКзондом. Потім положення фрагмента ДНК генома на електрофореграмі визначають методом радіоавтографії. При тривалій експозиції (протягом декількох днів) і при високій питомій радіоактивності ДНК-зонду цей метод дозволяє виявляти менш ніж 0,1 пг ДНК. Етапи блотгібридизації схематично представлені на рисунку. За допомогою електрофорезу можна визначити тільки розмір молекул ДНК в розчині. Методом гібридизації ДНК можна визначити, яка із смуг містить фрагмент із визначеною послідовністю нуклеотидів. Для проведення гібридизації синтезують *ДНК-зонд* (одноланцюгова молекула ДНК), комплементарний потрібній послідовності нуклеотидів. Зонд гібридизується тільки з комплементарною послідовністю, а за рахунок флуоресцентної мітки або радіоіотопів, вбудованих в зонд, його можна побачити.

Методи дот- і слот-гібридизації дістали свої назви залежно від форми плями ДНК на фільтрі — округлої або довгастої, відповідно. На тверду матрицю препарати ДНК і РНК наносяться краплинно. Принципова відмінність цих методів в тому, що з міченим ДНКзондом гібридизуються молекули ДНК або РНК без попередньої обробки рестриктазами і електрофорезу. Адаптація

цієї методики для визначення специфічних послідовностей РНК називається нозерн-блоттингом (*northern blotting*: *southern* – «південний», а *northern* – «північний»). В цьому випадку проводять електрофорез в гелі з молекулами мРНК, а в якості зонду використовують одноланцюгові молекули ДНК або С. Блот-гібридизація — високочутливий, але дорогий і трудомісткий метод виявлення специфічних послідовностей ДНК. Метод нозерн-блот-гібридизації — *Northern-blot* використовується для визначення рівня експресії гена шляхом кількісної оцінки іРНК. Метод складний і тривалий за виконанням (5–7 діб). Труднощі пов'язані з блокуванням РНКаз, які надзвичайно стабільні і стійкі до багатьох хімічних процедур, що використовуються при екстракції РНК. Ці методи також використовуються в дослідженнях геномної структури ДНК (РНК) та для виявлення точкових мутацій. Метод вестерн-блот-гібридизації (*Western-blot*) або імуноблот — це зв'язування білків розділених електрофорезом, які зафіксовані на фільтрах, з міченими антитілами.

Перераховані види блот-гібридизації мають ряд недоліків: необхідність використання добре очищених препаратів ДНК і радіоактивних зондів, тривалість і трудомісткість процедури. Усе це робить ці методи дуже дорогими. Проте, блот-гібридизація не втратила свого значення і нині. Використання різних варіантів нерадіоактивного мічення (біотин- або флуоресцентномічені ДНК-зонди, ДНК, що забарвлені нітратом срібла) дозволяє застосовувати цей метод для діагностики генних хвороб. З виростанням цих методів можна клонувати ділянку генома (напр., певний ген). У геномі будь-який ген займає певний локус — ділянку ДНК. Клонування ДНК — ампліфікація — це створення великого числа копій її фрагмента для отримання в достатній для вивчення кількості. Існує два основні варіанта клонування: використання організмів (зазвичай бактерій *Escherichia coli* — кишкової палички, або дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*), які швидко діляться, або клонувати *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Гібридизація *in situ*. Метод гібридизації з ДНК-зондами на гістологічних або хромосомних препаратах, який не вимагає попереднього виділення і очищення ДНК. Найширше використовується FISH (від англ. *fluorescent in situ hybridization*) — варіант методу, при якому в якості зондів використовують препарати ДНК або РНК, які мічені флуорохромами. Мічений ДНК-зонд наносять на препарати диференціально забарвлених і підготовлених для гібридизації (денатурованих) метафазних хромосом. Після видалення молекул ДНК і специфічної обробки, яка залежить від типу використаного зонду, місця хромосомної локалізації послідовностей ДНК, комплементарної відповідним ДНК-зондам, спостерігають в мікроскоп характерні точки, що світяться.

Гібридизація *in situ* — один з найбільш ефективних методів картування послідовностей ДНК на хромосомах за допомогою комплементарних ДНК-зондів. Його застосовують при дослідженні послідовностей геному, що повторюються; ДНК клонованих послідовностей, ДНК невідомого походження; при визначенні хромосомної належності і внутрішньохромосомної локалізації унікальних генів, взаємного розташування клонованих фрагментів ДНК навіть

в межах одного хромосомного локуса. Роздільна здатність FISHметоду досягає декількох хромосомних бендів: при проведенні гібридизації *in situ* на інтерфазних хромосомах людини вона може досягати 50 тис. п.н., що складає близько 5% величини середнього хромосомного бенда. Гібридизація *in situ* молекул РНК з кДНК-зондами, що проводиться на гістологічних препаратах, ефективно використовується для аналізу тканинноспецифічного розподілу і внутрішньоклітинної локалізації мРНК.

ДНК-ДНК-гібридизація за Саузерном

Метод гібридизації нуклеїнових кислот дає змогу виявити ділянки гомології нуклеотидних послідовностей у ДНК- чи РНК-мішені (нею, наприклад, може бути сумарна ДНК чи РНК) до певного фрагмента ДНК або РНК (зонда). В основі методу лежить принцип комплементарності азотистих основ нуклеїнових кислот. Для виявлення факту гібридизації використовують ДНК (РНК)-зонди, що синтезуються з радіоактивних нуклеотидів чи нуклеотидів, до яких приєднаний певний гаптен (дигоксигенін, біотин). Візуалізують сигнали гібридизації за допомогою радіоавтографії або імунохімічно, залежно від вибраного способу мічення зонда.

ДНК-ДНК-гібридизацію використовують тоді, коли потрібно встановити факт наявності у геномі певних нуклеотидних послідовностей (генів). Наприклад, гібридизація хромосомної ДНК штаму актиноміцета, що, ймовірно, несе інтегровану в хромосому рекомбінантну плазмиду з послідовностями цієї плазмиди (які використані як мічений зонд), дасть змогу недвозначно підтвердити факт інтеграції та визначити кількість і локалізацію сайтів інтеграції.

У цій лабораторній буде проведено аналіз інтеграції плазмиди pSET152 в геном *S. lividans* методом Саузерн-аналізу із використанням зонда, міченого дигоксигеніном (DIG). Зазвичай як зонд використовують невеликий (0,2-10 т.п.н.) фрагмент ДНК. Його денатурують і використовують у полімеразній реакції з випадковими гексануклеотидними праймерами та сумішшю чотирьох нуклеотидів — дАТФ, дГТФ, дЦТФ, DIG реакції добудовується друга мічена нитка ДНК.

Процедура складається з таких етапів:

1. виділення та розщеплення рестриктазами ДНК;
2. фракціонування рестриктів за допомогою гелю;
3. перенесення фрагментів ДНК з гелю на фільтр;
4. гібридизація ДНК;
5. виявлення сигналів гібридизації.

Для фракціонування рестриктів ДНК, які будуть перенесені на гібридизаційний фільтр, готують 0,6–0,8% агарозний гель. Електрофорез виконують при низькій напруженості електричного поля — 2–5 В/см. Цим досягається добре розділення рестриктів сумарної ДНК актиноміцетів.

Більшість гібридизаційних фільтрів виготовлено на основі нейлону, що стійкий до високих температур та механічних стресів. Нейлонові фільтри мають позитивний заряд на своїй поверхні, що полегшує зв'язування з ним ДНК.

ДНК переносять з гелю на гібридизаційний фільтр, використовуючи ефект капілярних сил. Стос паперових серветок або клаптиків фільтрувального паперу, накладений на гібридизаційний фільтр, “висмоктує” розчин із гелю, водночас з потоком рідини ДНК потрапляє на фільтр. Зверху на стос паперу кладуть вантаж. Його вага залежить від розміру гелю — 1,2 кг для гелів 20×20 см, для мінігелів — 0,5 кг. Щоб полегшити перенесення з гелю великих фрагментів ДНК (більше 10 т.п.н.), виконують її депуринізацію (обробляють гель 0,1N розчином HCl, що спричиняє видалення пуринів і розривів ниток ДНК). Якщо для перенесення ДНК використовують розчин 0,4N NaOH, то на фільтрі вона знаходиться вже в денатурованому стані. Якщо ж ДНК переносили в сольовому розчині, то після закінчення перенесення її слід денатурувати шляхом інкубації в розчині NaOH.

Після денатурації ДНК на фільтрі фіксують. Існує два способи фіксації — за допомогою оброблення фільтра ультрафіолетовими променями чи тривалого (2 год) нагрівання у печі при температурі 80°C. В обох випадках оброблення стає причиною виникнення поперечних зшивок між ДНК та нейлоновим фільтром.

Фільтр з ДНК, підготований у такий спосіб, промивають у буфері. Фільтр може зберігатися при температурі 4°C щонайменше 6–8 місяців, або ж бути безпосередньо використаним в експериментах ДНК-ДНК-гібридизації. Спочатку фільтр інкубують у передгібридизаційному розчині, що містить детергенти та блокуючий реагент. По-перше, це нейтралізує дію денатуруючого розчину. По-друге, детергенти сприяють змиванню з фільтра непотрібних домішок білків, агарози тощо, а блокуючий реагент (реагент Денхардта — білок молока — казеїн) блокує позитивно заряджені ділянки фільтру, з якими не зв'язалася ДНК. Потім до передгібридизаційного розчину додають денатурований зонд. Протягом 8–16 год його гібридизують із зафіксованою на фільтрі ДНК при температурі на 2–3 градуси нижчій від температури плавлення ймовірного дуплекса, що утвориться між ланцюгами зонда та комплементарними ланцюгами на фільтрі. Температура плавлення залежить від ГЦ складу ДНК та очікуваної гомології між зондом та ДНК-мішенню, складу гібридизаційного буфера (якщо до нього входять денатуруючі агенти диметилформамід, глутаральдегід, то температура плавлення ДНК значно знижується).

Після гібридизації фільтр відмивають від зонда, що неспецифічно зв'язався із фільтром, та виявляють сигнали гібридизації. Ці заключні етапи виконують по-різному, залежно від вибраного методу гібридизації. У практикумі використано імуноферментний метод детекції сигналів гібридизації. Застосовують кон'югат анти-DIG-антитіл з лужною фосфатазою та хромогенний субстрат: 5-бром-4-хлор-3-індоліл-фосфат (Х-фосфат), а також нітроголубий тетразолій (НГТ) — стабілізатор продуктів розщеплення Х-фосфату. Кон'югат специфічно зв'язується з гаптенем (дигоксигеніном), потім фільтр відмивають від залишків кон'югату, що не зв'язався, і заливають сумішшю Х-фосфату та НГТ.

Реакція „проявлення” фільтра може тривати протягом 16 годин — саме

стільки часу лужна фосфатаза у розчині виявляє ферментативну активність та розщеплює X-фосфат з утворенням 5-бромо-4-хлоро-3-індиго. У місцях фільтра, де відбулася реакція ДНК-ДНК-гібридизації, з'являються фіолетові смуги. Їхнє положення порівнюють з положенням фракцій рестриктів ДНК-мішені в гелі. Це дає змогу визначити, з якими фрагментами сумарної ДНК гібридизувався зонд.

Усі операції виконують у рукавичках, щоб уникнути забруднення гібридизаційного фільтра та розчинів нуклеазами, та в хімічно чистому посуді.

Лабораторна робота № 6

Очищення реактивів методом перекристалізації

Методика перекристалізації. Попередньо в пробірках з мікрокількостями речовини проводять дослідження її розчинності та кристалізації із різних розчинників та сумішей розчинників. Потім збирають прилад. У круглодонну колбу поміщають речовину, що підлягає очищенню, «кип'ятильник», вливають розчинник і нагрівають на азбестовій сітці до кипіння, заздалегідь з'єднавши колбу з холодильником. Якщо речовина не розчиняється у вказаній кількості розчинника, його поступово додають з мірного циліндра (можна через холодильник, але слід виконати протипожежні заходи) до тих пір, поки речовина під час кипіння не розчиниться. Потім розчин дещо охолоджують, додають активоване вугілля (або інший сорбент), знову нагрівають та кип'ятять протягом декількох хвилин.

Потім киплячий розчин швидко фільтрують у колбу Ерленмейєра через складчастий фільтр, вставлений у лійку з коротко обрізаною трубкою. Фільтрат поступово охолоджують (повітряне охолодження, охолодження водою, охолоджувальними сумішами тощо). Прискорене охолодження колби водою шляхом помішування розчину скляною паличкою небажане. Цю операцію проводять тільки для скорочення часу виконання лабораторної роботи. Слід пам'ятати, що прискорення випадіння кристалів таким чином спричинює до зменшення ступеня їх чистоти.). Кристали, які утворились після охолодження розчину, фільтрують і віджимають на лійці Бюхнера, вставленій у склянку Бунзена). Речовину висушують на повітрі (у разі необхідності у сушарці), а потім визначають температуру її плавлення. Якщо точка плавлення відповідають даним довідника, можна вважати речовину чистою. Інакше перекристалізацію слід повторити.

2. Методика перекристалізації напівмікрокількостей речовини. У плоскодонну конічну колбу місткістю 50–100 мл вставляють невелику конічну лійку так, щоб її вінець виступав над горловиною колби, і наливають 3–5 мл вибраного для перекристалізації розчинника.

У лійку кладуть складчастий фільтр, колбу закріплюють у лапці штатива й нагрівають до кипіння на гарячій водяній або піщаній бані. При цьому лійку знизу обігрівають пари киплячого розчинника. В іншій колбі (з приладу для перекристалізації із зворотним холодильником) під час кипіння розчинюють речовину у вибраному розчиннику. В разі необхідності використовують

активоване вугілля або інший сорбент для домішок. Гарячий розчин очищеної речовини виливають по паличці, як при звичайній кристалізації, маленькими порціями на фільтр. Лійка й частково фільтр омиваються парами киплячого розчинника, що перебуває в колбі. Якщо використовувати такий спосіб фільтрування, не відбувається часткової кристалізації речовини на фільтрі. Але якщо все-таки на фільтрі випадає осад речовини, то його змивають невеликою кількістю киплячого розчинника. Колбу з розчином охолоджують, а осад, який випав по охолодженні, фільтрують під вакуумом.

Для фільтрування під вакуумом малих кількостей речовин використовують звичайну конічну лійку зі вставленим у неї скляним «цвяхом» і покритим кружком фільтрувального паперу за діаметром дещо більшим, ніж капелюшок «цвяха». По краю фільтра роблять невеликі надрізи. Лійку вставляють на гумовій пробці в товстостінну пробірку з відведенням — «пальчик» або маленьку колбу Бунзена чи Вюрца і, змочивши фільтр розчинником, присмоктують його до «цвяха», підключивши до приладу водоструминний насос, та фільтрують. В особливих випадках замість фільтрувального паперу використовують азбест, вату (звичайну або скляну), склотканину та інші матеріали.

3. Методика перекристалізації напівмікрокількостей речовин із застосуванням ампули. Кристалізацію напівмікрокількостей речовин можна проводити із застосуванням ампули, виготовленої з легкоплавкої пробірки діаметром 10–12 мм і завдовжки 70–80 мм. Діаметр відтягнутого кінця ампули складає 2–3 мм, а довжина — 80–100 мм. Відтягнуту частину дугоподібно згинають під кутом 45–60°. Як фільтрувальний матеріал використовують ватяний тампон, вставлений у кінчик ампули. Ампулу з тампоном обережно нагрівають, а потім, не охолоджуючи її, вузький кінець опускають у пробірку з 1–2 мл чистого розчинника, що вибрали для перекристалізації.

Під час охолодження в ампулу затягується розчинник. В іншу пробірку поміщають 0,1–0,2 г речовини й розчинник, закривають пробкою з трубкою, що служить повітряним холодильником, і розчиняють речовину під час нагрівання. Одночасно ампулу з розчинником обережно нагрівають до кипіння (при цьому розчинник випаровується та витісняє з неї повітря) і потім відтягнутим кінцем ампули з ватяним тампоном опускають у гарячий розчин очищеної речовини. Після цього ампулу охолоджують шматочками мокрого фільтрувального паперу. Ампула повільно охолоджується, розчин затягується в неї (у результаті конденсації парів розчинника і, як наслідок, зниження внутрішнього тиску в ампулі) і, проходячи через ватяний тампон, очищується від великих нерозчинних домішок. Під час охолодження ампули в ній випадають кристали. На відтягнутій частині ампули роблять надріз, відламують її і кристали фільтрують на мікролійці з «цвяхом».

Замість ампули можна використовувати пробірку, закриту гумовою пробкою зі вставленою в неї капілярною трубкою з внутрішнім діаметром 2–3 мм і зігнутою під кутом 40–60°. Ампулу можна замінити пробіркою з пришліфованою або гумовою пробкою, спорядженою капілярною трубкою з внутрішнім діаметром 2–3 мм та зігнутою під кутом 40–60° і трубкою з

медичним шприцем. Під час такої перекристалізації в пробірку розчинник не поміщають – її не нагрівають, а вакуум створюють шприцем.

Методика сублімації бензойної кислоти або нафталіну. Хімічний стакан встановлюють на азбестовій сітці, насипають туди небагато забрудненої бензойної кислоти або нафталіну. Зверху стакан закривають колбою з холодною водою.

За слабого нагрівання на невеликому полум'ї пальника (електричній плитці, пісковій бані) відбувається сублімація, пари очищеної речовини конденсуються на дні колби у вигляді блискучих кристалів.

Дослід можна провести в спрощеному варіанті. Випробовувану речовину поміщають у фарфорову чашку, накривають її хімічною лійкою, кінець якої закривають ватою. Можна між фарфоровою чашкою і хімічною лійкою додатково покласти фільтрувальний папір із зробленими в ньому отворами. Чашку встановлюють на сітку й обережно нагрівають на невеликому полум'ї, не допускаючи плавлення речовини. Пари сублімованої речовини конденсуються на холодних стінках лійки. По закінченні досліду чисту речовину переносять з поверхні лійки на папір або чашку Петрі.

Лабораторна робота № 7

Техніка хроматографування на папері та у тонкому шарі

1. Техніка хроматографування на папері або у тонкому шарі. Розчин органічної речовини тонким капіляром наносять у певній точці від краю паперу (пластинки), яку відмічають як точку або лінію старту. Просушують папір (пластинку) і вносять у посудину з тонким шаром елюенту. Під час руху елюенту по нерухомій фазі відбувається розподіл компонентів суміші. Не допускаючи виходу елюенту на край паперу (пластинки), виймають, відмічають кінець руху рухової фази (фінішну лінію), сушать та розглядають під ультрафіолетовим промінням або, за необхідності (у разі відсутності кольору органічної речовини або люмінесценції), проявляють, зрошуючи розчинами реагентів, концентрованою сульфатною кислотою чи вносять на декілька секунд у пари йоду (закритий посуд із кристаликами йоду на дні).

Положення плям речовин по закінченні хроматографування характеризується значеннями R_f (Ratio of fronts – відношення фронтів):

$$R_f = L : L_s,$$

де L – відстань від лінії (точки) старту речовини до середини плями після хроматографування та проявлення, а L_s – відстань, яку пройшов фронт розчинника від лінії старту до фінішної лінії.

Незважаючи на той факт, що R_f суттєво залежить від підібраної пари рухомої та нерухомої фази, температури та ін., якщо стандартизувати умови підготовки та проведення хроматографії речовини, то R_f – характеристична величина для даної речовини. Тому цю величину досить часто наводять як довідкову з метою ідентифікації. Хроматографування невідомої речовини часто проводять з паралельним нанесенням сполуки відомої будови зі встановленим значенням R_f (сполука-свідок) — з метою коригування R_f до стандартних умов.

Хроматографування реакційних сумішей виконують зі свідками — вихідними реагентами.

2. Хроматографічний аналіз модельної суміші водорозчинних вітамінів на пластинках із закріпленням шаром «Silufol».

Реактиви та матеріали: розчин модельної суміші вітамінів (тіамін, піридоксол, аскорбінова кислота, рибофлавін, нікотинова кислота) по 2,5–3 мг/мл у 50 %-му етиловому спирту, розчинник I: суміш бензол–метанол–ацетон–оцтова кислота (14 : 4 : 1 : 1), розчинник II: суміш бензол–метанол–ацетон–оцтова кислота (11 : 7 : 1 : 1), пластинки «Silufol» (розміром 150 × 150 мм).

Устаткування: мікропіпетки, камера для хроматографування, джерело УФ-променів.

У разі хроматографічного аналізу водорозчинних вітамінів бажано провести двомірне хроматографування. Для цього в одному із кутів пластинки «Silufol» на відстані 15–20 мм від кожного боку мікропіпеткою наносять краплю (близько 4–5 мкл) розчину суміші вітамінів, дають розчиннику випаруватися і хроматографують у розчиннику I, зупиняючи переміщення розчинника на відстані 15–20 мм від верху пластинки (пластинку опускають у розчинник одним боком, біля якої була нанесена крапля). Пластинку сушать і проводять хроматографування з використанням розчинника II (пластинку опускають у розчинник суміжним боком до попереднього). Закінчивши хроматографування, пластинку сушать і в УФ-променях виявляють плями вітамінів, використовуючи значення R_f вітамінів — тіаміну, піридоксолу, аскорбінової кислоти, рибофлавіну, нікотинової кислоти (розчинник I – 0; 0,17; 0,48; 0,53; 0,68 відповідно; розчинник II – 0; 0,60; 0,16; 0,22; 0,44 відповідно).

3. Хроматографічний поділ суміші речовин на колонці з оксидом алюмінію або силікагелем

У колонку одномоментно наливають суспензію сорбенту у вибраному для хроматографування елюенті. Дають осісти частинкам сорбенту (для більш щільного осідання нерухомої фази постукують по колонці паличкою). Потім відкривають кран для витікання зайвого розчинника. Рідина повинна витікати з колонки зі швидкістю 1–2 краплі в секунду. Коли рівень елюента досягне верхнього тампону, у колонку вливають насичений розчин суміші речовин, які необхідно поділити.

Речовини фіксуються на сорбенті у верхній частині колонки; потім, по мірі витікання елюента, у колонці створюються забарвлені зони, в яких сконцентровані речовини, які поділяють (для безколірних, але люмінесцируючих речовин з метою контролю за зонами використовують УФ-освітлення). Коли рівень елюента опуститься до верхнього тампону, у колонку доливають невеликими порціями (по 5–10 мл) чистий елюент (бажано використовувати прилад для дозованого додавання розчинника, наприклад, бюретку). Після того як забарвлений розчин першої речовини перейде у приймач, а із колонки почне витікати чистий елюент, приймач замінюють і хроматографування продовжують з метою виділення іншої речовини, яка утворила другу зону. З метою прискорення хроматографування та економії

елюента можна замінити його на більш активний, але сумісний з першим. Заміну елюента проводять коли рівень першого елюента опуститься до верхнього тампон і потім продовжують промивати останнім розчинником. Новий елюат збирають в окремий приймач. Розхід елюентів залежить від будови органічних речовин, які розділяють, від активності сорбенту тощо.

Розчини із приймачів випарюють до сухого залишку, визначають масу виділених речовин та температуру топлення або інші фізико-хімічні характеристики речовин.

Лабораторна робота № 8

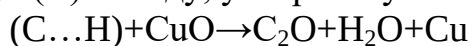
Елементний аналіз органічних сполук

Реактиви та прилади: органічні речовини, які містять Карбон, Гідроген, Нітроген, Сульфур та галогени; купрум(II) оксид, зневоднений купрум(II) сульфат, вапняна (або баритова вода), металевий натрій, водні розчини (відповідних концентрацій) ферум(II) сульфату, ферум(III) хлориду, натрій нітропрусиду, плюмбум(II) ацетату, натрій нітриту, аргентум нітрату, оцтова кислота, хлоридна кислота, нітратна кислота, сульфатна кислота, хлороформ; мідна спіраль, фарфорові ступки, пробірки, газовідвідні трубки та ін.

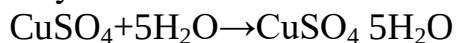
1. Виявлення Карбону та Гідрогену. Для виявлення Карбону та Гідрогену досліджувану органічну речовину нагрівають у пробірці з сухим купрум(II) оксидом. При цьому із Карбону органічної речовини і кисню реагенту утворюється карбон(IV) оксид, а із Гідрогену речовини і Оксигену купрум(II) оксиду утворюється вода. Купрум(II) оксид відновлюється до металевієї міді. Для виконання досліду збирають прилад із трьох пробірок.

У суху пробірку кладуть добре перемішану суміш сухого порошкоподібного купрум(II) оксиду та досліджуваної органічної речовини (рекомендуємо в співвідношенні за масою приблизно 10:1). Пробірку щільно закривають пробкою із вставленою в неї газовідвідною трубкою, закріплюють на штативі. Інший кінець газовідвідної трубки через гумову пробку вводять в пробірку. До цього в пробірку насипають близько 2 г купрум(II) сульфату, зневодненого шляхом нагрівання мідного купоросу, а в пробірку наливають 4–5 мл вапняної або баритової води і з'єднують її через газовідвідну трубку з пробіркою.

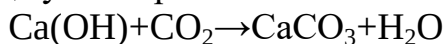
Пробірку із сумішшю, спочатку всю, обережно нагрівають на легкому полум'ї пальника, а потім сильно прогрівають її нижню частину. Під час нагрівання органічна речовина руйнується. Карбон, з'єднуючись з Оксигеном купрум(II) оксиду, утворює вуглекислий газ, а Гідроген — воду:



Поява крапель води на стінках пробірок, а також забарвлення у синій колір купрум(II) сульфату, свідчить про присутність в органічній сполуці Гідрогену:



Скаламучення вапняної (або баритової) води у пробірці від вуглекислого газу, який утворюється в пробірці, свідчить про присутність Карбону в досліджуваній речовині:

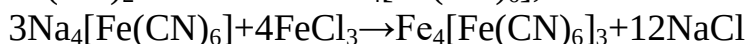
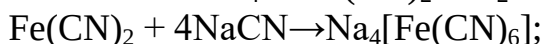
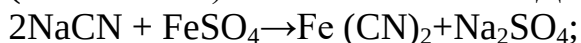
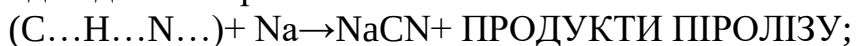


2. Виявлення Нітрогену реакцією Лассеня. Загальноприйнятим методом виявлення Нітрогену в органічних сполуках є нагрівання досліджуваної речовини зі шматочком металевого натрію. Під час сплавлення Нітроген переходить у NaCN, Сульфур — у Na₂S, Хлор — у NaCl, Бром — у NaBr, Йод — у NaI. Таким чином, із проби Лассеня (з упередженням використовуючи тільки дистильовану воду в подальших операціях) можливо визначити означені вище елементи.

Заходи безпеки. Дослід проводити у витяжній шафі за склом та в захисних окулярах.

У суху пробірку поміщають 0,2–0,3 г досліджуваної речовини та шматочок металевого натрію (калію) розміром з горошину, віджатого між листками фільтрувального паперу та очищеного від оксидної плівки. При цьому натрій слід помістити в середину проби речовини. Пробірку беруть у дерев'яний затискач та обережно нагрівають полум'ям газового пальника до утворення однорідного сплаву. Унаслідок відбувається піроліз речовини, нерідко зі спалахом залишків натрію, обвуглювання. Пробірку обережно нагрівають до появи червоного забарвлення пробірки. Досліджувана речовина розкладається таким чином, що Нітроген та Карбон з'єднуються з Натрієм і при цьому утворюється ціанід натрію.

Нагрітий кінець пробірки, не допускаючи його охолодження, різко опускають у фарфорову ступку з невеликою кількістю дистильованої води (рекомендуємо до 10 мл). Пробірка руйнується (*будьте готові до спалаху залишків натрію*), залишки з розплавом обережно подрібнюють та ретельно перетирають. Утворений натрій ціанід розчиняється у воді, суміш фільтрують від шматочків вугілля та скла. До фільтрату послідовно додають 2–3 мл щойно приготовленого концентрованого розчину ферум(II) сульфату, декілька крапель розчину ферум(III) хлориду та підкислюють 1%-им розчином хлоридної кислоти до слабо кислої реакції. Утворений синій осад берлінської лазурі свідчить про присутність Нітрогену в досліджуваній речовині. Реакція протікає відповідно до таких рівнянь:



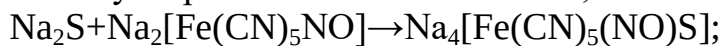
Для безпечнішого завершення процесу потрібно після піролізу речовини охолодити пробірку, додати невелику кількість спирту (0,5–1 мл), обережно нагріти (можлива реакція з залишками натрію), охолодити, додати 1–2 мл води, прокип'ятити й профільтрувати. Фільтрат використовують для виявлення Нітрогену, Сульфуру та Галогенів.

3. Виявлення Сульфуру. Дослідження органічних речовин на вміст Сульфуру проводять аналогічно до проби на Нітроген. Речовину також

мінералізують з металевим натрієм, при цьому зразок, що містить Сульфур, у процесі розкладання утворює натрій сульфід, наявність якого виявляють за допомогою звичайних реакцій на сульфід-йон S^{2-} .

У суху пробірку вміщують 0,3–0,5 г сульфанілової кислоти (або іншої сірковмісної речовини), додають шматочок металевого натрію розміром з горошину, підготовленого, як вказано вище, і обережно нагрівають газовим пальником до червоного розжарювання. Гарячу пробірку негайно та різко (дотримуючись правила безпеки) опускають у фарфорову чашку з 10–15 мл води. Пробірка від різкого охолодження тріскається, її вміст після ретельного подрібнення частково розчиняється у воді. Отриману суміш фільтрують, фільтрат поділяють на три пробірки для проведення таких дослідів:

а) до однієї частини фільтрату додають декілька крапель щойно приготовленого розчину натрій нітропрусиду. Поява червоно-фіолетового забарвлення свідчить про присутність Сульфору в речовині. Забарвлення, обумовлене утворенням комплексної солі, напевно, такої будови:



б) до другої частини фільтрату додають трішки 5%-го водного розчину плюмбум(II) ацетату та підкислюють розбавленою оцтовою кислотою. У результаті утворюється осад плюмбум(II) сульфід PbS чорного кольору, а у разі низького вмісту Сульфору — коричневого кольору;

в) до третьої частини фільтрату додають розведену хлоридну кислоту до явно вираженої кислої реакції. При цьому виділяється дигідроген сульфід, який легко виявити за його характерним запахом.

4. Виявлення галогенів:

а) проба Бельштейна. Для виявлення галогенів (окрім Фтору) нерідко використовують реакцію забарвлення полум'я леткими солями галогенідів міді, яку запропонував Ф. Ф. Бельштейн.

Із тонкої мідної проволочки виготовляють невелику спіраль з вільним кінцем, довжина якого повинна бути не більше 15–20 см. Спіраль нагрівають в окислювальному полум'ї пальника до зникнення зеленого забарвлення полум'я й утворення на поверхні спіралі плівки купрум(II) оксиду. Після охолодження окислену спіраль змочують або посипають невеликою кількістю досліджуваної речовини і знову нагрівають у полум'ї пальника. Органічна речовина окиснюється (утворюються, здебільшого, вуглекислий газ, вода та галогенводневі сполуки, які реагують з плівкою купрум(II) оксиду). При цьому, деякий час через неповне окиснення, полум'я є кіптявим, а потім, якщо у речовини міститься галоген, забарвлюється парами купрум(II) галогенідів в яскраво-зелений колір різних відтінків (наприклад, синювато-зелений).

б) виявлення галогенів у фільтраті розчину плаву за Лассенем. Виявленню галогенів у фільтраті розчину плаву за Лассенем з допомогою аргентум нітрату заважають натрій сульфід та ціанід, а тому потрібно провести операції з їх перетворення.

Варіант 1. У пробірку до декількох (4–6) крапель фільтрату з проби Лассеня додають 2–3 краплі розведеної нітратної кислоти і кип'ятять протягом 1–2 хвилин для видалення дигідроген сульфід та гідроген ціанід (**тяга!**).

Розчин охолоджують і додають до нього 1–2 краплини розчину аргентум нітрату. Поява білого осаду свідчить про присутність у пробі хлору, блідо-жовтого — бром, а жовтого — йоду. Для уточнення необхідно провести досліди за варіантом 2 та 3.

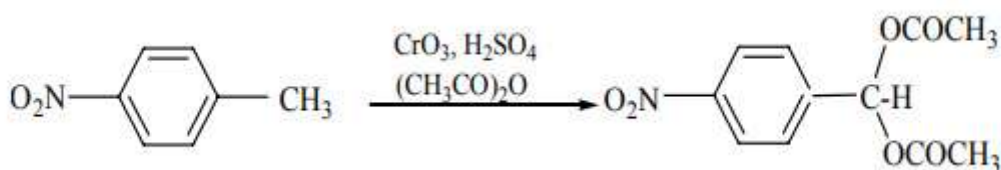
Варіант 2. У пробірку до 4–6 крапель фільтрату з проби Лассеня додають 1–2 краплі розведеної сульфатної кислоти, 1 краплю розчину натрій нітриту або розчину ферум(III) хлориду та 1 мл хлороформу і перемішують. Відстоявши вміст пробірки, спостерігають за кольором хлороформного розчину. За наявності фіолетового забарвлення роблять висновок про присутність у речовині йоду.

Варіант 3. У пробірку з 4–6 краплями фільтрату з проби Лассеня додають 2–3 краплі розведеної хлоридної кислоти, 1–2 краплі розчину хлораміну та 1 мл хлороформу. За наявності у вихідній речовині бром хлороформний шар набуває жовто-бурого забарвлення.

Лабораторна робота № 9

Загальні методи введення функціональних груп, зміни будови скелету вуглеводнів. Окиснення органічних сполук

Синтез 4-нітробензиліденацетату



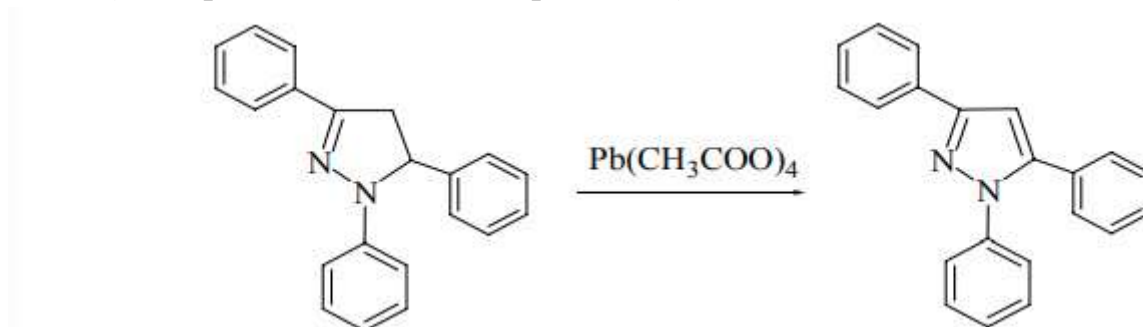
У тригорлу колбу місткістю 200 мл, споряджену мішалкою, краплинною лійкою та термометром, яка міститься в охолоджуючій бані зі сумішшю льоду та солі, поміщають оцтовий ангідрид (40 мл) і пара-нітротолуол та, повільно (краплинно) і інтенсивно перемішуючи, додають концентровану сульфатну кислоту (80 мл). Після того, як вміст колби охолоне до 0°C, до нього повільно додають протягом 1,5–2 годин розчин хром(VI) оксиду (10 г, 0,1 моля) в оцтовому ангідриді (45 мл), з такою швидкістю, щоб температура реакційної суміші не перевищувала 10°C. Цей розчин одержують додаючи до попередньо охолодженого оцтового ангідриду малими порціями хром(VI) оксид (обов'язкове перемішування!), також не допускаючи різких підвищень температури. Після додавання окислювача реакційну суміш продовжують перемішувати при температурі 5–10°C ще близько 2-х годин. По завершенню процесу реакційну суміш виливають на колотий лід (200–300 г) і розбавляють водою до об'єму 0,5–0,6 л. Осад, що утворився, фільтрують, промивають великою кількістю води (доки фільтрат буде знебарвленим), потім при інтенсивному перемішуванні переносять у 2%-ий водний розчин натрій

карбонату (0,3 л) і після нейтралізації кислот повторно фільтрують, промивають водою, спиртом (2 мл) і сушать у вакуумексикаторі.

Вихід 4-нітробензиліденацетату близько 6 г (65 %). $T_{пл} = 121 - 124 ^\circ C$.

Синтез 1,3,5-трифенілпіразолу

(І-й варіант окислення 2-піразолінів)

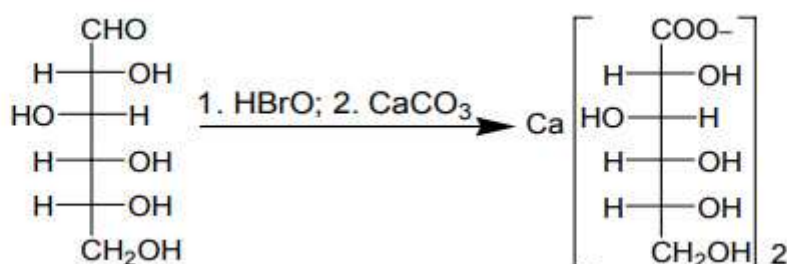


У двогорлу колбу, яка має механічну мішалку, зворотній холодильник, поміщають розчин 1,3,5-трифеніл-2-піразоліну (13,6 г, 0,046 моля) у дихлорметані (400 мл) та додають розчин плюмбум(IV) ацетату (24 г, 0,054 моля) у дихлорметані (200 мл). Після витримки реакційної суміші протягом 24 годин за кімнатної температури сполуки Плюмбуму видаляють, додаючи при перемішуванні розбавлену оцтову кислоту, а потім по краплям — гідразину-гідрату до зникнення коричневого кольору плюмбум(II) оксиду. Розчин висушують поташом, розчинник відганяють у вакуумі, а залишок розчиняють у суміші діетиловий ефір — легкий петролейний ефір (об'ємне співвідношення 1:19), розчин пропускають через колонку з діалюміній триоксидом (оксидом алюмінію для хроматографії).

Вихід 1,3,5-трифенілпіразолу близько 12 г (89%).

$T_{пл} = 139 - 140 ^\circ C$ (із метанолу).

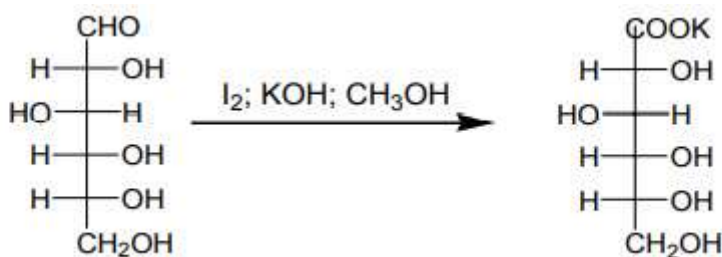
Синтез кальцій D-глюконату



У колбі Вюрца місткістю 200 мл, в якій основне горло використовують для встановлення механічної мішалки (в затворі рідина, яка не реагує з бромом та бромідною кислотою), а газовідвідна трубка закрита хлоркальцієвою трубкою, поміщають розчин 5,0 г глюкози в 30 мл воді та додають 10 г бром. Реакційну суміш залишають при кімнатній температурі на 2–3 доби, періодично перемішуючи її до повного розчинення бром. По завершенню реакції бромідну кислоту та надлишок бром відганяють (під витяжною шафою) за зниженого тиску, використовуючи водоструминний насос, нагріваючи вміст

колби на водяній бані. Контроль погону проводять за допомогою універсального індикатору та шляхом титрування натрій тіосульфатом. Одержаний розчин розбавляють водою до об'єму 50 мл, переносять його в велику фарфорову чашку і для гарантованого видалення залишків бромідної кислоти нейтралізують, додаючи невеликими порціями, $\text{Pb}(\text{OH}) \cdot 2\text{PbCO}_3$ (свинцеві білила). Осад солей плюмбуму фільтрують, промиваючи їх невеликою кількістю води. Солі плюмбуму, які залишились у фільтраті, осаджують у вигляді сульфідів, пропускаючи гідроген сульфід (робота під витяжною шафою). Осад плюмбум(II) сульфідів фільтрують, до маточного розчину додають 3 г кальцій карбонату, кип'ятять протягом 30 хвилин, фільтрують і фільтрат випаровують (у фарфоровій чашці спочатку на азбестовій сітці на відкритому полум'ї або електричній пічці, а потім на водяній бані) до об'єму близько 10 мл і, вносячи затравку кальцій глюконату та невелику кількість спирту для прискорення кристалізації, залишають у холодильнику на 24 години. Потім кристали кальцій глюконату фільтрують, розчиняють їх у мінімальній кількості гарячої води, кип'ятять з 0,05 г активованого вугілля, фільтрують та залишають фільтрат у холодильнику знову на 24 години. Кристали солі кальцій глюконату фільтрують, промивають невеликою кількістю води і сушать на повітрі. Вихід складає близько 3 г.

Загальна методика синтезу калієвих солей альдонових кислот



У тригорлу колбу місткістю 500 мл, обладнану механічною мішалкою, термометром та крапельною лійкою, вносять 5,7 г сублімованого йоду та 80 мл абсолютного метилового спирту. Вміст колби нагрівають до 40°C, а потім, перемішуючи та підтримуючи цю температуру протягом всього часу окиснення, до одержаного розчину додають водно-метанольний розчин 0,01 моль відновлюючого цукру (готують шляхом повного розчинення альдози в 3 мл води і наступного добавлення 25 мл спирту), і протягом 15 хвилин додають по краплям 65 мл 4%-го розчину калій гідроксиду в абсолютному метанолі і, витримавши реакційну суміш з перемішуванням 10 хвилин, додають ще 50 мл 4%-го розчину калій гідроксиду. Вміст колби стає солом'яно-жовтим і, якщо колір зберігається, потрібно додати ще 1–2 мл розчину КОН. Після завершення реакції суміш витримують, перемішуючи ще 10 хвилин, охолоджують до 0°C, калійну сіль відділяють на лійці Бюхнера, двічі промивають метиловим спиртом, діетиловим ефіром і висушують на повітрі.

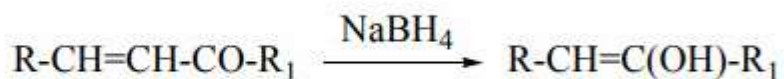
* 1. Зазначеним методом отримують калійні солі альдонових кислот з наступними виходами: калій D-глюконат – 2,2 г (92 %); калій D-галактонат – 2 г (85 %); калій L-арабонат – 1,6–1,7 г (80–85 %); калій D-манонат – 0,8 г (30 %).

2. У зв'язку з тим, що калійні солі D-ліксонової, D-ксилонової, L-рамнонової і D-манонової кислот легкокорозчинні у метанолі, їх виділяють у вигляді малорозчинних барієвих солей, для чого до реакційної суміші або фільтрату, одержаного після відділення калійної солі, додають розчин 5 г $\text{BaI}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ в 25 мл метанолу. Барієву сіль центрифугують, двічі промивають у пробірці для центрифугування водою, ефіром та сушать на повітрі. Вихід барієвих солей майже кількісний.

Лабораторна робота № 10

Відновлення та галогенування органічних сполук

Загальна методика синтезу α,β -ненасичених спиртів (халколів та дихалколів)

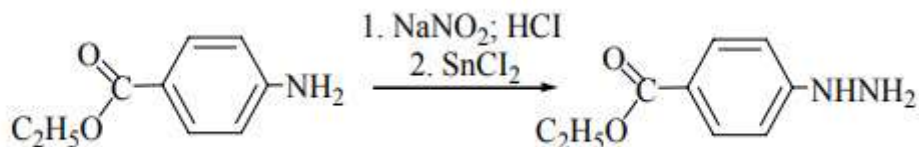


До суміші 0,5 г α,β -ненасичених кетонів (халконів або дихалконів), 40 мл діоксану (у випадку легкокорозчинних сполук можна брати меншу кількість діоксану або проводити реакцію без нього) і 10 мл метанолу (або етанолу) при перемішуванні на магнітному перемішувачі однократно додають 0,13 г (для халконів) або 0,25 г (для дихалконів) натрій борогідриду. Спостерігаючи поступове знебарвлення розчину, перемішування продовжують ще 1,5–2 години, потім додають ще близько 50% від попередньої кількості відновника і суміш залишають на декілька годин. До розчину комплексу додають 100 мл 5%-го водного розчину натрій гідроксиду і знову залишають на декілька годин. Осад, що випав із розчину, фільтрують, промивають на фільтрі 5%-им розчином натрій гідроксиду, потім водою до нейтральної реакції і сушать. Продукт суспендують у невеликій кількості бензолу, нагрівають із зворотним холодильником, у гарячому стані фільтрують та додають н-гексан. Після охолодження розчину кристали спирту (чи діолу) фільтрують, сушать.

Вихід продукту майже кількісний.

Температури топлення, °C: 56 (R, R₁ = феніл), 49 (R – феніл, R₁ – 4-анізил), 54 (R – 4-анізил, R₁ – феніл), 46 (R – феніл, R₁ – 4-хлорфеніл), 52 (R – 4-хлорфеніл, R₁ – феніл), 70 (R – феніл, R₁ – стирил), 113 [1,4-біс(α -оксицинаміл)бензол].

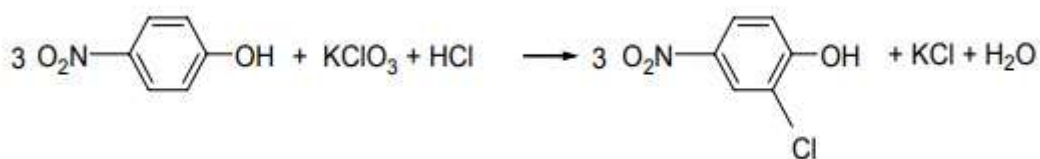
Синтез 4-карбоксиетилфенілгідразину



В хімічній склянці місткістю 100 мл обережно розтирають 1,7 г етилового ефіру пара-амінобензойної кислоти в 15 мл розчину хлоридної кислоти (10 мл концентрованої кислоти і 5 мл води). Отриману суспензію охолоджують до 0–5°C (баня — лід–сіль) і діазотують шляхом додавання 35%-го водного розчину натрій нітриту. По закінченню стадії діазотування (обов'язково контроль йодкрохмальним папірцем), реакційну суміш фільтрують, підтримуючи температуру фільтрату на попередньому рівні, і фільтрат крапельно додають з перемішуванням, підтримуючи температуру реакційної суміші не вище 5°C, протягом 30 хвилин до розчину 6 г станум(II) хлориду в 20 мл концентрованої хлоридної кислоти. Утворений осад фільтрують і сушать в інертній атмосфері. Сухий продукт кип'ятять із зворотним холодильником в 20 мл бензолу, розчин у гарячому стані фільтрують, а кристали, що випали після охолодження фільтрату, фільтрують і сушать.

Вихід 1–1,1 г. $T_{\text{пл}} = 118^\circ\text{C}$.

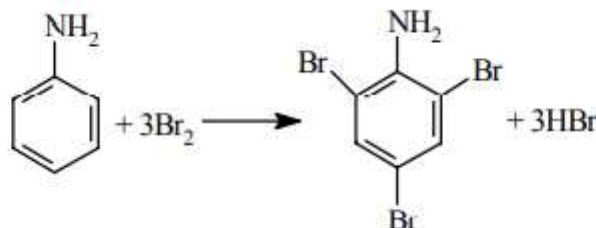
Синтез 2-хлор-4-нітрофенолу



У колбу Ерленмейєра вносять 2,5 г 4-нітрофенолу, 100 мл концентрованої хлоридної кислоти, суміш нагрівають (витяжна шафа) до утворення розчину, потім охолоджують, додають 15 мл водного розчину 0,74 г калій хлорату (бертолетової солі) і залишають реакційну суміш на 24 години. Білий кристалічний осад фільтрують, перекристалізують із води та отримують готовий продукт з $T_{\text{пл}} = 111^\circ\text{C}$. Вихід 2,6 г.

*Продукт використовують для виготовлення препарату „Нітрофунгін”.

Синтез 2,4,6-триброманіліну



У двогорлій колбі місткістю 100 мл, спорядженій магнітним перемішувачем, краплинною лійкою і трубкою для відводу HBr та подальшого його поглинання, розчиняють 1,25 мл аніліну в 40 мл води, що містить 1,3 мл концентрованої хлоридної кислоти (розчин 1).

Окремо розчиняють у 25 мл води при перемішуванні 4,5 г калій броміду і 7,5 г бром у (розчин 2). Розчин 2 виливають у краплинну лійку і по краплях

протягом 30 хвилин, енергійно помішуючи, додають його до розчину 1 (температура реакційної суміші 20–25°C). Після закінчення реакції забарвлення брому зникає і випадає осад 2,4,6-триброманіліну. Осад фільтрують на лійці Бюхнера, промивають 10%-им розчином натрій гідроксиду, а потім великою кількістю води.

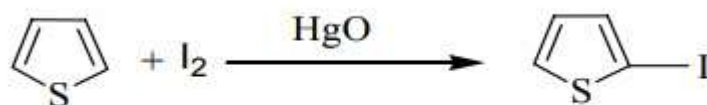
2,4,6-триброманілін очищають кристалізацією з етанолу (~75 мл). Для повнішої кристалізації розчин охолоджують до 0–5°C. Осад фільтрують і сушать.

Вихід 7 г (77% від теоретичного). $T_{\text{пл}} = 119\text{--}120^\circ\text{C}$.

2,4,6-триброманілін – безбарвна кристалічна речовина, розчинна в ефірі, хлороформі, важкорозчинна в етиловому спирті, не розчинна у воді.

Синтез 2-йодтіофену

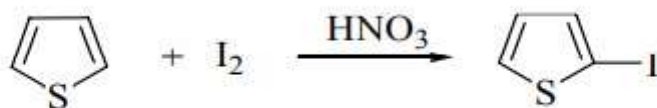
I варіант синтезу:



У колбу Ерленмейера, встановленій у водяній бані з льодом на магнітному перемішувачі, вносять 35 г тіофену, додають 50 мл бензолу і при постійному охолодженні та перемішуванні, по черзі вносять протягом 30 хвилин 75 г жовтого меркурій(II) оксиду і 109 г подрібненого кристалічного йоду. Потім осад фільтрують на лійці Бюхнера, ретельно промиваючи його на фільтрі бензолом або ефіром (краще осад перенести у колбу, провести екстрагування 2–3 рази, а потім профільтрувати). Органічні фази об'єднують, промивають розчином натрій тіосульфату, сушать кальцій хлоридом, розчинник (бензол, ефір) відганяють, а маслянистий залишок переганяють за зниженим тиском.

Вихід 50 г. $T_{\text{кип}} = 73^\circ\text{C}/15 \text{ мм рт.ст.}; 80^\circ\text{C}/20 \text{ мм рт.ст.}$

II варіант синтезу:

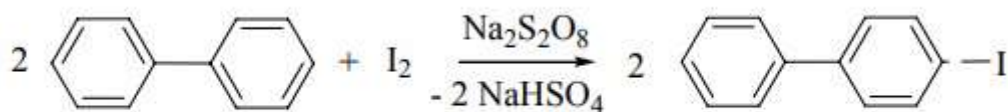


У тригорлу колбу місткістю 100 мл, яка споряджена механічною мішалкою, зворотним холодильником і краплинною лійкою та встановлена на водяній бані, вносять 19 г (0,075 моль) йоду та 20 мл (0,25 моль) тіофену і за умов слабого нагрівання та ефективного перемішування по краплинам додають 14 мл нітратної кислоти ($d=1,42$), попередньо розбавленої водою (1:1). Температуру реакційної суміші регулюють температурою бані. Після додавання всього об'єму нітратної кислоти реакційну суміш нагрівають ще близько 30 хвилин, потім органічний шар відділяють, промивають 20 мл 10%-го розчину

натрій гідроксиду і переганяють з водяним паром. Маслоподібну речовину жовтого кольору відділяють, сушать магній сульфатом і переганяють за зниженого тиску.

Вихід 22 г. $T_{\text{кип}} = 73^{\circ}\text{C}/15 \text{ мм рт.ст.}; 80^{\circ}\text{C}/20 \text{ мм рт.ст.}$

Синтез 4-йоддифенілу



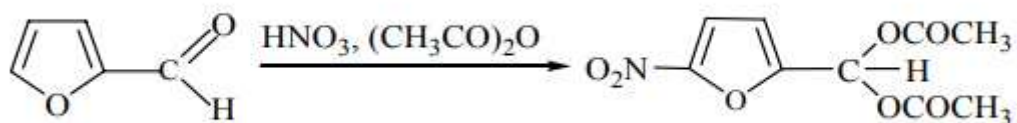
У колбу Ерленмейєра, встановленій на магнітному перемішувачі, вносять 1,5 г дифенілу, додають 10 мл крижаної оцтової кислоти і, перемішуючи та нагріваючи до 80°C , досягають повного розчинення дифенілу, потім додають близько 2,5 мл води (до легкого помутніння розчину), вносять 1,3 г подрібненого кристалічного йоду, 1,25 г натрій пероксодисульфату ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) та 1 мл CCl_4 і приєднують зворотний холодильник. Реакційну суміш інтенсивно перемішують за вище вказаної температури 3 години (до повного використання йоду) і після зникнення забарвлення додають 30 мл води, осад фільтрують, ретельно промивають водою і сушать. Йоддифеніл, що міститься в осаді, можна перегнати за зниженого тиску ($T_{\text{кип}} = 118\text{--}125^{\circ}\text{C}/0,05 \text{ мм рт. ст.}$), але краще екстрагувати бензолом або CCl_4 . Розчинник відганяють, а сухий залишок два рази перекристалізують із метанолу.

Вихід 1,7 г. $T_{\text{пл}} = 112^{\circ}\text{C}$.

Лабораторна робота № 11

Нітрування, алкілювання й ацилювання органічних сполук

Синтез 5-нітрофурфуролдіацетату

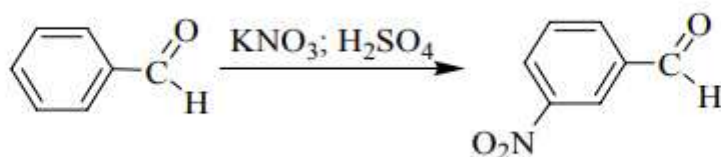


У тригорлу колбу місткістю 250 мл із зовнішнім охолодженням, яка має механічну мішалку, краплинну лійку і термометр з довгою ніжкою (встановленим так, щоб реєструвати температуру біля дна колби), поміщають 36 мл оцтового ангідриду і, витримуючи температуру всередині колби близько 0°C , додають 5,1 г (3,6 мл) концентрованої нітратної кислоти ($\rho = 1,42$) та 0,33 г концентрованої сірчаної кислоти. До створеної нітруючої суміші краплинно (витримуючи температуру не вище 10°C протягом 15–20 хвилин) додають 4,8 г свіжоочищеного фурфуролу, дають піднятись температурі до $15\text{--}18^{\circ}\text{C}$ і при цих умовах реакційну суміш зеленуватого кольору витримують ще 1,5 години,

потім обережно приливають 30 мл охолодженої води так, щоб суміш не нагрівалась вище 10°C. Зберігаючи охолодження, до світло-помаранчевої емульсії, інтенсивно перемішуючи, додають 6,0 мл 20%-го розчину натрій фосфату, не допускаючи розігріву вище 50–55°C. Перемішування реакційної суміші з охолодженням (10–15°C) продовжують близько 1 години. Нітрофурфуролдіацетат, що виділяється у вигляді світло-коричневих кристалів, відділяють фільтруванням, промивають водою та сушать.

Вихід сирого продукту, який має температуру топлення 87–89°C, близько 60–70%. Перекристалізація продукту зі спирту дає злегка жовтуваті кристали з температурою топлення 91–92°C.

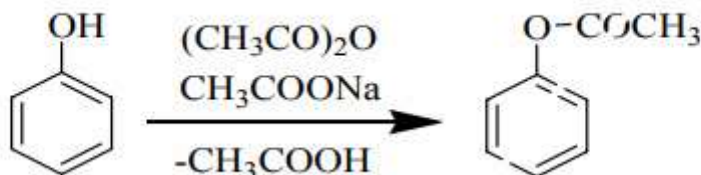
Синтез 3-нітробензальдегіду



У круглодонну колбу місткістю 250 мл, споряджену крапельною лійкою, механічною мішалкою та зовнішнім охолодженням поміщають 45 г калій нітрату, додають 130 г сульфатної кислоти і, підтримуючи температуру на рівні 25–35°C, додають протягом 4 годин 43 г свіжоочищеного бензальдегіду, витримують 0,5–1 годину, виливають при перемішуванні в 0,5 л холодної води і залишають для формування осаду на декілька годин. Кристалічний продукт фільтрують на лійці Бюхнера, використовуючи склотканину, промивають водою і, після висушування, перекристалізують із бензолу.

Вихід 35–37 г. $T_{\text{пл}} = 54\text{--}56^\circ\text{C}$.

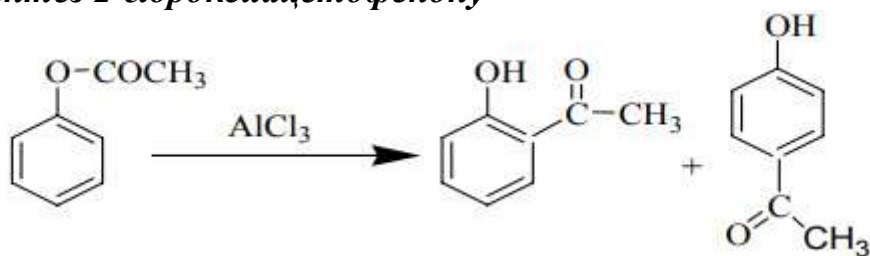
Синтез феніл ацетату



У круглодонну одnogорлу колбу, споряджену механічною мішалкою і зворотним холодильником, поміщають 28,2 г (0,3 моля) фенолу, 33,7 г (0,33 моля) оцтового ангідриду і 15–20 г зневодненого натрій ацетату. Реакційну суміш за інтенсивного перемішування обережно повільно нагрівають до кипіння, кип'ятять протягом 20–30 хвилин, потім охолоджують, виливають на лід або у 0,5 л води і протягом 2-х годин перемішують. Органічний шар відділяють, додають до нього 50 мл бензолу і проводять його зневоднення (шляхом відгонки на роторному випарювачі азеотропу бензол–вода). До залишку додають 30–50 мл бензолу, сушать його зневодненим магній(II) сульфатом або натрій сульфатом. Розчин продукту реакції переносять у перегінну колбу, відганяють бензол, а залишок фракціонують за зниженого тиску.

Вихід очищеного цільового продукту складає близько 36–38 г. $T_{\text{кип}} = 195,5^{\circ}\text{C}$.

Синтез 2-гідроксиацетофенону

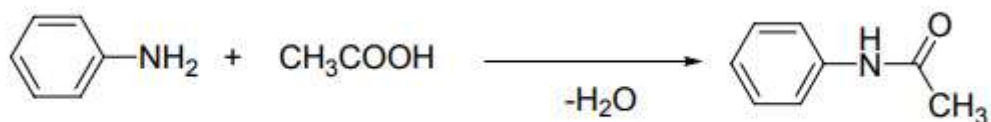


У тригорлу колбу місткістю 500 мл, споряджену механічною мішалкою з гліцериновим затвором, термометром і зворотним холодильником з відвідною трубкою для поглинання хлороводню, що виділяється у процесі реакції, поміщають очищений і висушений фенілацетат (1 моль), додають при помірному перемішуванні та охолодженні невеликими порціями (по 5–7 г) безводного алюміній(III) хлориду (2 моля). Після додавання всього каталізатору реакційну суміш установлюють на масляну баню і температуру повільно піднімають (швидкість визначає інтенсивність виділення HCl) до 175°C і за цієї температури витримують близько 2–2,5 годин — до закінчення виділення HCl (або за температури не вище 120°C протягом 5 годин). Після охолодження реакційну суміш гідролізують шляхом додавання холодної води і хлоридної кислоти, утворений 2-гідроксиацетофенон відганяють з перегрітим 144 водяним паром. Масло відділяють на ділильній лійці, із води бензолом екстрагують цільовий продукт, органічні фази об'єднують, сушать, розчинник відганяють на роторному випарювачі, а 2-гідроксиацетофенон — у вакуумі.

Вихід 30–40%. $T_{\text{кип}} = 96^{\circ}\text{C}/10 \text{ мм рт. ст.}$

Ацилювання амінів

Ацетанілід (варіант А)

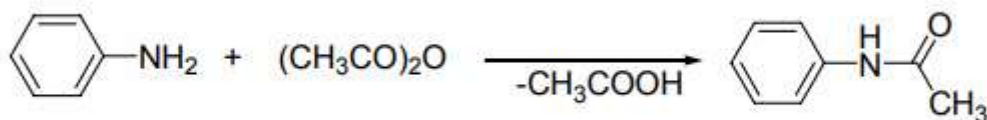


У круглодонну колбу місткістю 250 мл, споряджену насадкою Діна-Старка з холодильником і термометром, поміщають 9,5 г (0,1 моля) аніліну, перегнаного над цинковим пилом, 15 г (близько 15–16 мл, 0,25 моля) льодяної оцтової кислоти і додають 0,05 г цинкового пилу. Колбу нагрівають на азбестовій сітці і повільно відгоняють суміш оцтової кислоти з водою зі швидкістю близько 5 мл на годину. Температура в парах повинна бути не вище 105°C . Через 1,5–2 години нагрівання посилюють, піднімаючи температуру в парах від 105°C до 115°C , і відганяють надлишок оцтової кислоти. У колбі залишається ацетанілід — жовта рідина (під час охолодження темніє), яку, не допускаючи кристалізації, виливають з перемішуванням в хімічну склянку з 20–30 г товченого льоду та 50–100 мл холодної води. Водний розчин декантують із осаду, осад промивають холодною водою, фільтрують на лійці

Бюхнера, перекристалізують із мінімальної кількості води (близько 300–350 мл) з використанням активованого вугілля, в гарячому стані фільтрують через складчастий фільтр на лійці з підігрівом. Очищений цільовий продукт фітрують, промивають холодною водою, сушать на повітрі.

Вихід ацетаніліду 36 г (80% від теоретичного); $T_{\text{пл}} = 114^{\circ}\text{C}$.

Ацетанілід (варіант Б)



У літрову склянку до 500 мл води доливають 8,5 мл концентрованої хлоридної кислоти і, перемішуючи додають свіжоперегнаний над цинковим пилом анілін (12,5 мл). У разі утворення забарвленого розчину додають близько 2 г активованого вугілля, перемішують протягом 5 хвилин і фільтрують. Прозорий безколірний розчин нагрівають до 50°C , додають до нього оцтовий ангідрид, перемішують до повного його розчинення, після чого до реакційної суміші негайно додають розчин 15 г натрій ацетату в 50 мл води, ретельно перемішують та охолоджують льодом.

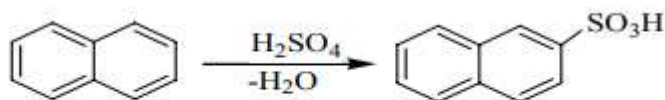
Кристали ацетаніліду фільтрують на лійці Бюхнера, промивають невеликою кількістю холодної води ($0\text{--}146^{\circ}\text{C}$), сушать спочатку між аркушами фільтрувального паперу, а потім у сушарці.

Вихід продукту 10–11 г. $T_{\text{пл}} = 115^{\circ}\text{C}$. Ацетанілід (N-фенілацетамід, N-ацетиланілін, феніламід оцтової кислоти) — безбарвна кристалічна речовина, розчинна в органічних розчинниках, важно розчинна в холодній воді.

Лабораторна робота № 12

Сульфування, гідроліз та конденсація органічних сполук

Синтез 2-нафталін сульфо кислоти

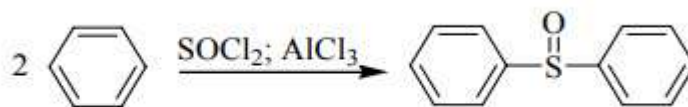


У тригорлій колбі місткістю 100 мл, спорядженій механічною мішалкою, крапельною лійкою, термометром та зовнішнім підігрівом (масляна або пісочна баня) плавлять 10 г нафталіну, доводять температуру до 160°C і протягом 10–15 хвилин додають краплями 8,5–9 мл концентрованої сульфатної кислоти. Реакційну суміш витримують за вказаної температури 5 хвилин і обережно виливають у холодну воду (15 мл). Після формування осаду його фільтрують (на наступному занятті) на скляному фільтрі і очищують методом

переосаджування (додають 5 мл води, нагрівають до розчинення, до гарячого розчину додають 2 мл концентрованої хлоридної кислоти, охолоджують, осад знову фільтрують і сушать в ексикаторі над натрій гідроксидом).

Вихід близько 15 г. $T_{пл} = 102^{\circ}\text{C}$.

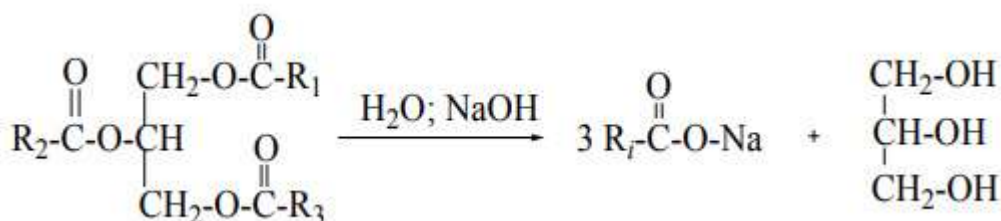
Синтез дифенілсульфоксиду



У колбу місткістю 50 мл вносять 6 мл бензолу, додають 10 мл свіжоочищеного хлорид тіонілу і при охолодженні (лід – вода) обережно порціями додають 3 г порошкоподібного алюміній(III) хлориду. Потім додають ще 2 мл бензолу, приєднують зворотний холодильник і нагрівають протягом 30–40 хвилин на киплячій водяній бані. Реакційну суміш охолоджують і виливають в холодну воду. Органічний шар відділяють, водний — екстрагують 5 мл бензолу, органічні фази об'єднують, бензол відганяють. Цільовий продукт перекристалізують із петролейного ефіру.

Вихід 2 г. $T_{пл} = 71^{\circ}$.

Гідроліз жирів (Виготовлення мила)



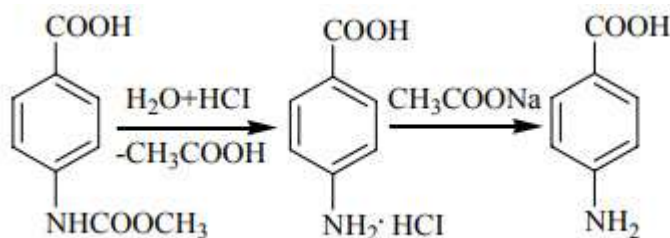
У колбу місткістю 100 мл поміщають 5–6 г свинячого (баранячого) жиру, додають 8–10 мл етилового спирту для розчинення жиру і 7–8 мл 40%-го розчину натрій гідроксиду. До колби приєднують високий повітряний холодильник і поміщають її в нагріту до кипіння водяну баню. Суміш час від часу перемішують похитуванням штативу і через хвилин двадцять реакційна суміш стає прозорою.

Щоб визначити, чи повністю відбувся гідроліз, беруть пробу: декілька крапель гідролізату відливають у пробірку з гарячою дистильованою водою. Якщо проба повністю розчиняється у воді і немає крапель жиру – гідроліз пройшов повністю.

Гідролізат у гарячому стані виливають тонкою цівкою в склянку, в якій міститься 50 мл гарячого ($90\text{--}100^{\circ}\text{C}$) насиченого (14 г солі в 40 мл води) розчину натрій хлориду. На поверхню спливають солі жирних кислот (відбувається висолювання мила). Склянку залишають охолоджуватися (без перемішування) — мило твердіє. Через добу шар мила відділяють від підмильного луку, злегка промивають, сушать і після повного висихання, визначають масу та розраховують вихід.

Отримане таким способом мило називають ядровим. Воно тверде, має жовтий колір, але при нагріванні становиться м'яким, розчинне у воді та спирті. Якісне мило не повинно містити більше 0,03% натрій гідроксиду та 0,04% натрій карбонату.

Синтез 4-амінобензойної кислоти



Стадія 1. Гідроліз 4-ацетиламінобензойної кислоти

У круглодонній колбі місткістю 250 мл спорядженій зворотним холодильником протягом 1,5–2 години нагрівають 13,4 г (0,075 моль) 4-ацетиламінобензойної кислоти з 30 мл розбавленої (1:1) хлоридної кислоти. Закінчення реакції визначають методом ТСХ. Отриманий розчин гідрохлориду 4-амінобензойної кислоти охолоджують до 5°C, осад фільтрують на лійці Бюхнера, з використанням склотканини або скляному фільтрі, промивають невеликою кількістю льодяної води і сушать. Із маточного розчину шляхом одноразового або дворазового часткового випарювання води, охолодження і повторного фільтрування можна виділити додаткову кількість продукту. Гідрохлорид 4-амінобензойної кислоти — жовті голки, легко розчинні у воді.

Вихід гідрохлориду 4-амінобензойної кислоти 11–12 г (близько 85–90% від теоретично можливого).

Стадія 2. Виділення 4-амінобензойної кислоти

Отриманий гідрохлорид 4-амінобензойної кислоти розчиняють в колбі Ерленмейера або хімічній склянці (при перемішуванні на магнітному перемішувачі) у мінімальній кількості води, повільно додають насичений розчин натрій ацетату до припинення виділення осаду 4-амінобензойної кислоти (контроль повноти осадження цільового продукту !!!). Осад цільового продукту фільтрують на лійці Бюхнера з використанням щільного фільтрувального паперу, віджимають, промивають невеликою кількістю холодної води. Отриманий цільовий продукт бажано перекристалізувати із гарячої води з використанням у якості сорбенту смол активоване вугілля. 4-Амінобензойна кислота кристалізується у вигляді довгих голок жовтого кольору, розчинна у воді, спирті тощо.

Вихід близько 8 г (80% від теоретично можливого). $T_{пл} = 186^{\circ}\text{C}$.

Використана література

1. Афанасьєва К. С. Фізичні методи в молекулярній генетиці. Практикум. Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2016. 127 с.
2. Біохімія : підручник / за заг. ред. проф. А. Л. Загайка, проф. К. В. Александрової. Х. : Видво «Форт», 2014. 728 с.
3. Волкова Н. Е. Молекулярно-генетичні дослідження ядерного геному кукурудзи. Одеса : Астропринт, 2015. 120 с.
4. Гасинець Я. С., Щубелка Х. М., Вольфсбергер В. В., Кіш Р. Я., Вакерич М. М., Кривцова М. В., Мірутенко В. С., Олексик Т. Х. Вступ до геномної біології : навчально-методичний посібник. Ужгород : вид-во ДВНЗ «УжНУ», 2023. 48 с. <https://dspace.uzhnu.edu.ua/jspui/handle/lib/53612>
5. Джамєєв В.Ю. Механізми рецесії та внутрішньоклітинного сигналіну у рослин: навчальний посібник. Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2016. 208 с.
6. Кривцова М. В., Колесник А. В., Сікура А. О. «Медична біологія (частина I): Практикум». Ужгород, 2022. 156 с. <https://dspace.uzhnu.edu.ua/jspui/handle/lib/54152>
7. Медична біологія : підручник / Видання 3-є, переробл. і доповнене. / за ред. В. П. Пішака, Ю. І. Бажори. Вінниця : Нова книга, 2017. 608 с.
8. Методологія оцінки генотипу тварин за молекулярно-генетичними маркерами у тваринництві України. Копилов К. В., Жукорський О. М., Копилова К. В., Метлицька О. І., Вдовиченко Ю. В., Балацький В. М., Порхун М. Г., Шельов А. В., Шевченко Є. А., Писаренко Н. Б. Київ : Аграрна наука, 2015. 212 с.
9. Молекулярна біологія клітини : навчальний посібник / О. Б. Кучменко, А. І. Марченкова. Ніжин : НДУ ім. М. Гоголя, 2021. 135 с.
10. Молекулярно-біологічні методи оцінки безпечності та автентичності харчових продуктів та інгредієнтів / І. В. Лопотан, Є. О. Котляр, О. І. Данилова, Л. М. Пилипенко // Зб. тез. доп. 78-ї наук. конф. викл. акад., Одеса, 23–27 квіт. 2018 р. / Одес. нац. акад. харч. технологій ; під заг. ред. Б. В. Єгорова. Одеса, 2018. С. 64–66.
11. Молекулярна генетика та технології дослідження геному : навч. посіб. / за ред. проф. М. І. Гиль. Київ : Гельветика, 2019. 320 с.
12. Основи молекулярної біології та біоінформатики: комп'ютерний практикум [Електронний ресурс] : навч. посіб. для студ. спеціальності 122 «Комп'ютерні науки та інформаційні технології спеціалізації «Інформаційні технології в біології та медицині» / С. В. Кисляк, Є. А. Настенко; КПІ ім. І. Сікорського. Електронні текстові данні. Київ: КПІ ім. І. Сікорського, 2018. 95 с. <https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/27529/1/molbiolbioinformatics.pdf>
13. Помогайбо В. М., Петрушов А. В. Генетика людини : навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Київ : «Академія», 2014. 325 с.
14. Ріддлі М. Геном. Автобіографія виду у 23 главах. В-во «КМ-БУК», 2018. 408 с.

15. 5S рибосомна ДНК квіткових рослин: монографія / за ред. проф. Р.А. Волкова. Чернівці : Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, 2021. 168 с.
16. Столяр О. Б. Молекулярна біологія. Вид-во: Біологія та медицина, 2020. 224с.
17. Сучасні проблеми молекулярної біології : навчальний посібник / Г. О. Ушакова, І. Є. Соколова. Д., РВВ ДНУ, 2016. 200 с.
18. Ушакова Г. О., Соколова І. Є. Основи молекулярної біології : навч. посіб. Дніпропетровськ, 2016. 200 с.
19. Caputo A., Fournier PE, Raoult D. Genome and pan-genome analysis to classify emerging bacteria. Biol Direct. 2019. Vol. 14, №1. P. 5. doi: 10.1186/s13062-019-0234-0.
20. Clokie M.R., Kropinski A., Lavigne R. Bacteriophages (Eds.), Methods and Protocols. Vol. 4. 2019. 369 pp.
21. Janet Iwasa, Wallace F. Marshall, Gerald Karp. Karp's cell and molecular biology: concepts and experiments. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2016. 829 p.
22. Kryvtsova M. V., Sikura A. O. MEDICAL BIOLOGY (Molecular biology. Genetic. Basics principles of diagnostics of genetic disease). Practical training. Uzhhorod. Uzhhorod national university, 2021 42 p. <https://dspace.uzhnu.edu.ua/jspui/handle/lib/54321>
23. Molecular biology of the cell. 6th ed. / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. N.-Y.: Garland Science, 2014. 1464 p.
24. Molecular Cell Biology. 8th ed. / H. Lodish, A. Berk, Kaiser C.A. et al. N.-Y.: W.H. Freeman & Co. Ltd, 2016. 1280 p.

Сварчевська Оксана Зіновіївна

Слободян Соломія Олегівна

НАВЧАЛЬНЕ ВИДАННЯ

МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ ТА ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Методичні вказівки для лабораторних робіт

**здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої
освіти**

спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

ОП «Біотехнології та біоінженерія»

Підписано до друку2025 р. Формат 60х84 ^{1/16}

Папір офсетний. Тираж 50 прим.

Видавництво “ ”