

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького*

Кафедра біотехнології та радіології

Основи біотехнології
навчально-методичний посібник
для студентів спеціальності
181 «Харчові технології»



Львів – 2021

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького*

Кафедра біотехнології та радіології

Основи біотехнології
навчально-методичний посібник
для студентів спеціальності
181 «Харчові технології»

Львів – 2021

УДК: 577.2 (075)

Навчально-методичний посібник затверджено на засіданні методичної ради факультету харчових технологій та біотехнології, протокол №5 від 15.09.21р.

Рецензенти:

к. с.-г. н., спеціальність – 03.00.20 біотехнологія, доцентка, завідувачка кафедри садово-паркового господарства Хортицької національної академії Н. П. Дерев'янку

Основи біотехнологій: навчально-методичний посібник / [уклад. Шемедюк Н.П.] – Львів: Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2021. – 109 с.

Навчально-методичний посібник укладено для здобувачів спеціальності 181 «Харчові технології». У посібнику коротко викладено, проілюстровано теоретичний матеріал з дисципліни «Основи біотехнології», рекомендовано до виконання лабораторні роботи, описано методи клітинної та генетичної інженерії, біотехнологічні способи одержання біологічно активних сполук, цінних речовин харчового виробництва, біотехнології утилізації, переробки відходів харчової промисловості. Підібраний матеріал відповідає робочій програмі з дисципліни «Основи біотехнології» для здобувачів факультету харчових технологій та біотехнології ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького спеціальності 181 «Харчові технології».

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
ПРАВИЛА РОБОТИ У ЛАБОРАТОРІЇ.....	7
ПЕРЕЛІК ПРИЛАДІВ ДЛЯ БАЗОВОГО ОБЛАДНАННЯ ЛАБОРАТОРІЇ.....	10
ТЕМА 1: БІОТЕХНОЛОГІЯ ЯК НАУКА. ЗАВДАННЯ І МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЇ	11
ТЕМА 2: КУЛЬТУРА ТВАРИННИХ КЛІТИН ЯК ТЕСТ-СИСТЕМА ОЦІНКИ БЕЗПЕЧНОСТІ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ, НОВОСИНТЕЗОВАНИХ РЕЧОВИН У ХАРЧОВІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ.....	17
Лабораторна робота № 1. Аналіз робочого місця для проведення роботи з культурою тваринних клітин. Вивчення обладнання.....	20
Лабораторна робота № 2. Підготовка посуду для роботи з культурою клітин, стерилізація скляного посуду	28
Лабораторна робота № 3. Основні принципи методу культивування тваринних клітин.....	33
ТЕМА 3: БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН.....	38
Лабораторна робота № 4. Одержання і культивування калюсної тканини сої	42
ТЕМА 4: ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ, ЗОКРЕМА У ХАРЧОВОМУ ВИРОБНИЦТВІ.....	44
Лабораторна робота № 5. Дослідження мікотоксинів методом імуноферментного аналізу (ІФА).....	47
ТЕМА 5: ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ.....	50
Лабораторна робота № 6. Виділення дезоксирибонуклеопротеїну з селезінки тварин.....	59
ТЕМА 6: ОДЕРЖАННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГМО.....	61
Лабораторна робота № 7. Ідентифікація ГМ-сої методом ПЛР	66
ТЕМА 7: БІОТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ РЕЧОВИН ДЛЯ ХАРЧОВОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ	73
Лабораторна робота № 8. Імобілізація глюкоамілази і вивчення активності іммобілізованого і вільного ензиму.....	79

Лабораторна робота №9. Одержання гонадотропіну із сироватки крові жеребних кобил.....	82
САМОСТІЙНА РОБОТА ЗДОБУВАЧА.....	85
1. Перелік тем для самостійного вивчення.....	85
2. Індивідуальні завдання.....	85
ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ.....	86
ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПІДГОТОВКИ ДО ЗАЛІКУ.....	104
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....	107

ВСТУП

Біотехнологія – це використання культур клітин бактерій, дріжджів, тварин або рослин, метаболізм і біосинтетичні можливості яких забезпечують одержання специфічних речовин, продуктів. Застосовуючи знання і методи біохімії, мікробіології, генетики і хімічні технології, під час технологічного процесу, у якому задіяні живі об'єкти (культура клітин, мікроорганізмів) людина отримує ліки нового покоління, засоби діагностики, біологічно активні речовини, високопродуктивні, сільськогосподарські культури та засоби їх захисту. На сьогоднішній день генетично модифіковані організми, рекомбінантні протеїни широко увійшли у різні сфери сучасного господарства, зокрема у сферу харчової промисловості. Отже, виникла необхідність формувати у сучасних здобувачів вищої освіти наукового світогляду щодо біотехнологічного процесу, методів створення та одержання біотехнологічної продукції, розуміння її безпечності і використання у харчовій промисловості. Тому предметом вивчення дисципліни «Основи біотехнології» для здобувачів спеціальності 181 «Харчові технології» є:

- методи біотехнології, які застосовуються під час отримання важливих для харчової промисловості речовин;
- сучасні методи підвищення продуктивності цінних для харчової промисловості рослин, мікроорганізмів;
- біотехнологічні методи, які використовуються для оцінки, контролю безпеки і якості харчових продуктів;
- новітні методи технології утилізації відходів харчового виробництва.

З метою допомогти студенту у вивченні названої дисципліни сформовано цей посібник. У навчально-методичному посібнику описано методи клітинної та генетичної інженерії, біотехнологічні способи одержання біологічно активних сполук, цінних речовин харчового виробництва, біотехнології утилізації, переробки відходів харчової промисловості. Наведено теоретичні відомості, на яких базуються запропоновані до виконання методи. Багато методик є досить складними у виконанні, тому у лабораторних роботах конкретизовано приклади приготування розчинів, необхідних для здійснення експериментальної роботи. Для кращого розуміння принципу методів сформовано список рекомендованої літератури.

ПРАВИЛА РОБОТИ У ЛАБОРАТОРІЇ

1. Під час роботи у лабораторії виконуйте тільки ту роботу, яку Вам доручено.

2. Під час виконання роботи дотримуйтесь правил поведінки у лабораторії (не відволікайте увагу товаришів, не залишайте без нагляду своє робоче місце, розпочату роботу).

3. Підтримуйте порядок робочого місця (на робочому місці не повинно бути непотрібних для роботи речей, наприклад, сумок, портфелів, тощо).

4. Працюйте лише за закріпленим за Вами місцем у лабораторії.

5. Використовуючи речовин для досліду, звертайте увагу на етикетку. У тому разі, коли виникає сумнів щодо відповідності вмісту флакону надпису на етикетці, звертайтеся до викладача або лаборанта.

6. Розпочинаючи роботу, уважно ознайомтесь із завданням та правилами з охорони праці, обладнанням, матеріалами.

7. Хімічні реакції необхідно проводити за умов і у кількостях, концентраціях реагентів, які пропонуються у методичній літературі. Для проведення хімічних реакцій використовуйте зазначений у методичних матеріалах посуд і прилади.

8. Нагрівання вмісту пробірок відбувається поступово за допомогою пробіротримача чи штативу. Пробірка спрямовується в напрямку від себе і свого товариша. Не нахиляйтеся над пробіркою, в якій кипить рідина.

9. Якщо потрібно ідентифікувати речовину за запахом, спрямовуйте до себе випари з пробірки помахом вільної руки.

10. Реактиви не пробуйте на смак, не пийте з хімічного посуду.

11. Досліди з леткими речовинами проводьте у витяжній шафі.

12. Роботи з бензолом, етерами та спиртами проводяться на певній відстані від полум'я, у витяжній шафі.

13. Розчиняйте сульфатну кислоту у воді шляхом внесення кислоти до води невеликими порціями, весь час помішуючи розчин. Майте на увазі, що при розчиненні сульфатної кислоти, відбувається нагрівання розчину.

14. Зливати у раковину кислоти та лужні розчини можна після їх нейтралізації лугами чи кислотами відповідно.

15. Розлиті кислоти та лужні розчини присипати піском або нейтралізувати, лише після цього проводити прибирання.

16. У разі виявлення порушення правил безпеки, повідомляйте викладача або лаборанта.

17. Після закінчення роботи поприбирайте робоче місце, вимийте посуд. Повідомте лаборанта або викладача про завершення роботи, підпишіть зошит.

СУВОРО ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ

1. Вмикати силові та освітлювальні рубильники без дозволу.
2. Проводити роботи з хімічними речовинами у лабораторіях без загальної витяжної вентиляції.
3. Тримати у приміщенні особистий одяг та інші речі.
4. Їсти у приміщенні.
5. Залишати без догляду запалені горілки та нагрівальні прилади.
6. Проводити роботу без наявності спецодягу (халатів).
7. Залишатися працювати в лабораторії одному. Обов'язкова присутність другої особи для забезпечення надання допомоги.

НЕАКУРАТНІСТЬ, НЕУВАЖНІСТЬ, НЕДОСТАТНЯ ОБІЗНАНІСТЬ З РОБОТОЮ ПРИЛАДІВ ТА ВЛАСТИВОСТЯМИ РЕАГЕНТІВ, ПРАВИЛАМИ БЕЗПЕКИ МОЖЕ ПРИЗВЕСТИ ДО НЕЩАСНИХ ВИПАДКІВ !!!

РЕЧОВИНИ, ЯКІ ВИМАГАЮТЬ ОБЕРЕЖНОГО ПОВОДЖЕННЯ:

1. **Нітратна кислота.** Концентрована кислота спричиняє опіки шкіри. Випари нітратної кислоти подразнююче діють на слизову оболонку дихальних шляхів, очей. Нітратна кислота може вибухати при взаємодії зі скипидаром та спиртом, солями пікринової кислоти, карбідами та порошками металів.

2. **Ацетон.** Летка речовина. Зберігати у колбах з притертим корком.

3. **Луг.** При потраплянні на шкіру та слизові оболонки спричиняє опіки. Зберігається у сухому місці.

4. **Сульфатна кислота.** При потраплянні на шкіру спричиняє важкі опіки, при потраплянні у дихальні шляхи – подразнення слизових оболонок.

5. **Хлоридна кислота.** Спричиняє опіки шкіри. Випари спричиняють опіки слизових оболонок.

6. **Ацетатна кислота.** Спричиняє важкі опіки шкіри, випари – опіки слизових оболонок. Під час взаємодії з нітратною кислотою та Натрію пероксидом може спалахнути. Гасити водою.

Основні правила поводження у боксі для роботи з культурою клітин, під витяжною шафою:

- 1) безпечне поводження з електричним, газовим обладнанням, з водовідведенням;
- 2) всі прилади, що використовуються для культивування клітин повинні бути заземлені, розетки та вмикачі знаходяться у доступній та безпечній зоні;
- 3) робота студентів повинна відбуватись лише за присутності відповідального персоналу;
- 4) вмикати та вимикати прилади, узгодивши з відповідальним персоналом;
- 5) робота в культуральній лабораторії повинна відбуватись у максимально допустимій тиші, без сторонніх шумів та відволікаючих подій;
- 6) перед початком роботи під ламінаром чи витяжною шафою слід максимально зручно обладнати робоче місце (висоту стільця, доступ до посуду, автоматичних піпеток, газового або спиртового пальника);
- 7) перед початком роботи у ламінарному боксі слід з'ясувати ступінь біологічної безпеки об'єкта дослідження: лінії клітин, первинної культури;
- 9) максимально дотримуватись правил та навиків стерильної роботи у ламінарному боксі;
- 10) перед роботою з леткими речовинами переконайтесь, що працює витяжна система шафи, не залишайте відкоркованими флакони, пробірки;
- 11) після закінчення роботи прибрати робоче місце та прозвітувати про виконану роботу.

ПЕРЕЛІК ПРИЛАДІВ ДЛЯ БАЗОВОГО ОБЛАДНАННЯ ЛАБОРАТОРІЇ:

1. Ваги аналітичні;
2. Камера для горизонтального електрофорезу;
3. Камера для вертикального електрофорезу;
4. Термоцикл для ампліфікації нуклеїнових кислот;
5. Морозильна камера;
6. Мікроскоп;
7. CO₂ інкубатор;
8. Вортекс;
9. рН-метр;
10. Термостат;
11. Магнітна мішалка;
12. Шейкер;
13. Центрифуга/вортекс;
14. Дистилятор;
15. Охолоджуюча центрифуга;
16. Автоклав;
17. Качалка для культивування мікроорганізмів;
18. Ламінарна шафа II класу захисту.

ТЕМА 1: БІОТЕХНОЛОГІЯ ЯК НАУКА. ЗАВДАННЯ І МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Що таке біотехнологія?

Біотехнологія – це наука, яка вивчає методи одержання корисних для людини речовин і продуктів в керованих умовах використовуючи мікроорганізми, клітини тваринних і рослинних організмів або біологічні структури клітин.

Біотехнологія (Βιοτεχνολογία, від грец. *bios* – життя, *techne* – мистецтво, майстерність і *logos* – слово, навчання) – використання живих організмів і біологічних процесів у виробництві.

Біотехнологія – це застосування наукових та інженерних принципів для переробки речовин органічної та неорганічної природи біологічними агентами з метою отримання різних цінних продуктів та послуг.

Це міждисциплінарна галузь науково-технічного прогресу, яка є більш зрілим станом у розвитку біології, що нині і в майбутньому займатиметься створенням цілого з елементів вивчених раніше.

Отже, під **біотехнологією** розуміють інтегроване використання знань природничих та інженерних наук. **Мета:** використання організмів і частин організмів для одержання корисних продуктів чи використання їх у різних біотехнологічних процесах.

Біотехнологія як окрема наука та галузь виробництва вважається наймолодшою з усіх відомих.

Фундаментом біотехнології є мікробіологія, вірусологія, генетика, імунологія, хімічна технологія, біохімія, біофізика, молекулярна біологія.



У біотехнології обов'язково задіяні об'єкти – живі організми або їх складові.

Які?

Об'єкти біотехнології:

- мікроорганізми,
- клітин тварин та рослин,
- віруси,
- рекомбінанти – організми, отримані методами генетичної інженерії,
- молекули, зокрема продукти метаболізму (нуклеїнові кислоти, протеїни, ензими, цукориди),
- тварини (наприклад, черв'яки задіяні у біотехнології одержання біогумусу),
- субклітинні елементи (хромосоми),
- процеси біоконверсії.

На сьогодні більшість об'єктів біотехнології становлять різноманітні мікроорганізми. Це усі прокаріоти – бактерії, актиноміцети, рикетсії, синьо-зелені водорості й частина еукаріот – дріжджі, нитчасті гриби, мікроскопічні найпростіші та водорості.

Перспективність та ефективність застосування біотехнологічних процесів у різних сферах людської діяльності: від одержання їжі і напоїв до відтворення екологічно чистих енергоносіїв і нових матеріалів, обумовлена їх компактністю й одночасно великомасштабністю, високим рівнем механізації й продуктивності праці. Ці процеси піддаються контролю, регулюванню й автоматизації. Біотехнологічні процеси, на відміну від хімічних, реалізуються в «м'яких» умовах, за нормального тиску, активної реакції й невисоких температур середовища. Ці процеси меншою мірою забруднюють навколишнє середовище відходами і побічними продуктами, мало залежать від кліматичних і погодних умов, не потребують великих земельних площ, застосування пестицидів, гербіцидів й інших чужорідних для навколишнього середовища агентів. Тому біотехнологія в цілому та її окремі розділи визначені серед найбільш пріоритетних напрямів науково-технічного прогресу і є яскравим прикладом «високих технологій», з якими пов'язують перспективи розвитку багатьох виробництв.

Які завдання вирішує біотехнологія?

Вирішує глобальні проблеми людства – ліквідація нестачі

продовольства, енергії, мінеральних ресурсів, поліпшення стану охорони здоров'я і навколишнього середовища.

Завданнями біотехнології є:

1. Одержання амінокислот, протеїнів, вітамінів, ензимів;
2. Одержання вакцин, БАР (гормони, антибіотики, алкалоїди), інтерферонів;
3. Одержання гербіцидів, інсектицидів;
4. Відтворення тварин (трансплантація ембріонів, клонування, химери, монозиготні близнюки);
5. Культивування тканинних та клітинних культур рослинного та тваринного походження з метою одержання моноклональних антитіл, стовбурових клітин, репродукції, оздоровлення рослин);
6. Отримання альтернативних джерел енергії (етанолу, біогазу);
7. Біоконверсія речовин (зменшення навантаження відходами, очищення середовища, одержання біогумусу);
8. Вирішення проблем медицини (генна терапія, діагностика захворювань із застосуванням секвенування, полімеразно ланцюгової реакції, імуноферментного аналізу).
9. Вирішення проблем ветеринарної медицини (одержання ферментних препаратів для покращення засвоєння кормів, мікробного протеїну, вітамінів);
10. Видобування металів (мікробне вилужування);
11. Одержання ГМО.

Для чого фахівцям з харчових технологій вивчати біотехнологію?

Важливою складовою промислової біотехнології є ***харчова біотехнологія***, за допомогою якої одержують ряд продуктів, таких як пиво, вино, оцет, тощо. Крім того, біотехнологічними продуктами є речовини необхідні для харчової промисловості: лимонна, молочна кислота та інші органічні кислоти, ферментні препарати, біологічно активні добавки, харчові добавки. Біотехнологи створюють мікроорганізми, які здатні інтенсифікувати технології одержання продуктів харчування, надати їм нових ознак, властивостей, збільшити харчову цінність, усунути недоліки. ГМО є сировиною харчових виробництв. Вивчаючи біотехнологію, студенти пізнають методи вдосконалення традиційних технологічних процесів, одержання нових організмів, продуктів, діагностикумів, методів дослідження продуктів харчування, контролю їх якості. Формують уявлення про безпечність і

доцільність застосування надбань сучасної науки.

Біобезпека використання біотехнологій.

Складною і важливою етичною проблемою біотехнології є проведення експериментів, спрямованих на створення за допомогою генетичної інженерії нових видів біологічної (бактеріологічної) зброї. Бактеріологічною зброєю можуть бути культури збудників особливо небезпечних захворювань (чуми, холери, туляремії, бруцельозу тощо). Методологія генної інженерії дозволяє створювати резистентні до всіх сучасних лікарських речовин штами бактерій і віруси, які важко діагностувати. Ці штами характеризуються підвищеною вірулентністю, життєздатні тривалий час; легко пристосовуються до умов внутрішнього середовища організму людини і тварин і спричиняють захворювання з невідомою клінічною картиною. З використанням методів біотехнології на основі токсинів можливим є створення супертоксинів, що здатні до масового знищення живих організмів.

Саме тому нові штами мікроорганізмів, створені з використання методів біотехнології, до їх впровадження в практику повинні бути ретельно апробовані і оцінені з точки зору їх впливу на здоров'я людей і збереження генетичної різноманітності та екологічного балансу у біосфері. Важливе значення набуває розширення і зміцнення міжнародної співпраці щодо оцінки і регулювання ризику використання біологічних об'єктів, які в умовах відсутності необхідного контролю за їх функціонуванням, можуть впливати на живі системи і людину як біологічна зброя. Тому надзвичайно важливими є наукові експертизи, прогнози використання біотехнічних систем. Вкрай актуальним питанням залишається безпека використання ГМО.

Методи, які застосовуються у біотехнології:

– селекційні методи (гаплоїдної селекції, клітинної селекції, віддаленої гібридизації), що передбачають конструювання нових форм біооб'єктів за допомогою індукованого мутагенезу та штучного добору ефективних варіантів;

– методи клітинної інженерії, які здійснюються за рахунок гібридизації соматичних клітин або злиття нестатевих клітин з утворенням єдиного цілісного організму; культивування ізольованих клітин і тканин на штучних поживних середовищах в стерильних умовах для отримання високопродуктивних міжвидових та міжродових гібридних культур рослинного або тваринного походження; одержання моноклональних антитіл (як результат

гібридної біотехнології);

– методи генетичної інженерії:

1. отримання генів шляхом виділення їх із ДНК за ферментативного синтезу, відтворення послідовності нуклеотидів гена на основі первинної структури протеїнів, ферментативний синтез генів на матриці іРНК;

2. створення рекомбінантних ДНК;

3. методи ідентифікації та аналізу трансформованих клітин.

– методи біосинтезу (поверхневого й глибинного культивування), які включають:

1. отримання чистої клітинної культури біооб'єкта;

2. підготовку субстратів;

3. підбір систем біореакторів;

4. очищення та зберігання цільових продуктів.

– методи фізико-хімічні;

– методи біохімічні.

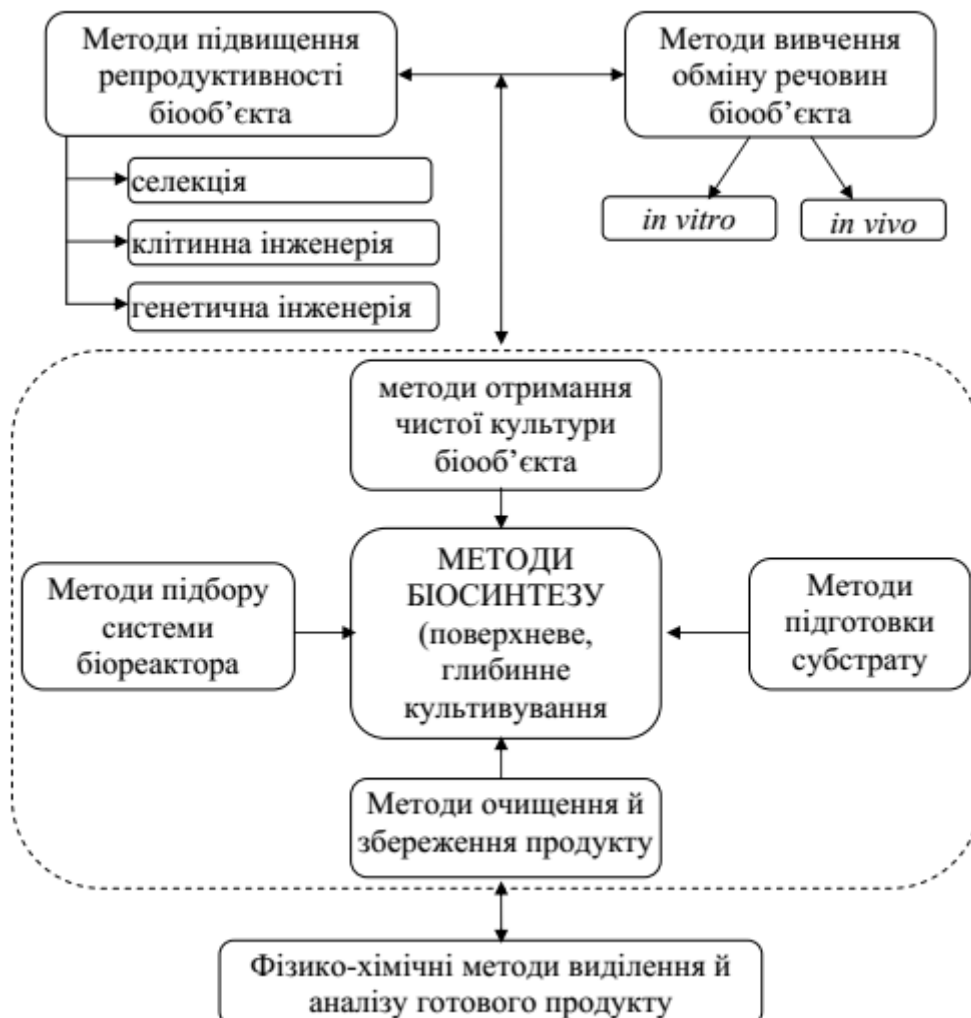


Рис 1. Схема комплексу методів біотехнологічного виробництва та їх взаємозв'язку

Питання для самоконтролю:

1. Що таке біотехнологія?
2. Взаємозв'язок біотехнології з іншими науками?
3. Що є об'єктом біотехнології?
4. Які завдання вирішують біотехнологи?
5. Яким чином можна застосувати знання біотехнології для розвитку галузей харчової промисловості?
6. Біобезпека використання біотехнологій.
7. Які методи клітинної інженерії вам відомі?
8. Назвіть методи генетичної інженерії?

ТЕМА 2: КУЛЬТУРА ТВАРИННИХ КЛІТИН ЯК ТЕСТ-СИСТЕМА ОЦІНКИ БЕЗПЕЧНОСТІ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ, НОВОСИНТЕЗОВАНИХ РЕЧОВИН У ХАРЧОВІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ

Культура тканин тварин і людини – система підтримання впродовж більше, ніж 24 год. життєздатності ембріонів, зачатків органів, цілих органів, експлантів чи клітин, отриманих від тварин чи людини.

Суть методу тканинних і клітинних культур полягає у забезпеченні таких умов *in vitro*, за яких клітини зберігають свої біологічні функції.

Для чого культивувати клітини тварин, тобто підтримувати їх життєздатність поза організмом?

Культура клітин дуже часто замінює або доповнює існуючі моделі дослідження з використанням тварин, позаяк використання культури клітин є зручнішим і дешевшим. Культура клітин з достатньою достовірністю може репрезентувати процеси, які відбуваються у певному типі клітин організму. Зростання масштабів використання рекомбінантних терапевтичних протеїнів у клінічній практиці, перетворення антитіл на потужний дослідницький інструмент, сучасні досягнення у дослідженні стовбурових клітин роблять цей метод повсякденною практикою у багатьох лабораторіях, що спонукає науковців до більш детального вивчення процесів, які впливають на вирощування клітин *in vitro*.

Культури клітин вважають високоекономічними моделями у дослідженнях з вивчення механізмів впливу різноманітних фізико-хімічних чинників: зміни рН, температури, концентрації гормонів, амінокислот, ростових факторів, цитокінів. Головна перевага культур клітин – це можливість прижиттєвого спостереження за ними тривалий час. Зміна умов росту морфологічно однорідної популяції клітин у визначених межах дозволяє оцінити проліферативний ріст клітин через короткий проміжок часу за збільшенням їх кількості і зміною морфології або відслідкувати долю дочірніх клітин за включеними протеїновими маркерами.

Культури тваринних клітин є важливими продуцентами біологічно активних речовин. На них вирощують віруси для їх ідентифікації та одержання вакцин. Їх застосовують для тестування та

вивчення механізму дії ліків, косметичних засобів, пестицидів, консервантів, новосинтезованих сполук для харчової промисловості. Використовуються у трансплантаційній медицині. Так, культура клітин шкіри використовується для лікування опіків, культура клітин ендотелію – для реконструкції стінок судин.

Здатність клітин до росту у культурі призвела до розвитку методів клонування, збереження і гібридизації клітин, що у свою чергу спонукало до розвитку генетики соматичних клітин.

Напрямки застосування методу культивування клітин:

- лабораторні дослідження (доповнює існуючі моделі дослідження, зручніший і дешевший, достатньо достовірний);
- повсякденна практика у роботі зі стовбуровими клітинами, клонами, для одержання і роботи з моноклональними антитілами, на певних етапах трансплантації клітин, тканин, органів, ембріонів;
- синтез природних хімічних сполук;
- одержання вірусної біомаси, яку застосовують для виробництва вакцин і діагностики вірусних захворювань.

Як культивують клітини поза організмом?

- Потрібно виділити ці клітини з організму;
- Внести їх на живильне середовище у спеціальному посуді (культуральних флаконах);
- Забезпечити підтримання сталої температури, рівня CO₂;
- Змінювати середовище час від часу і пересівати клітини.

У культуральному посуді клітини ростуть у вигляді моношару (прикріплені до дна культурального флакона). Таку культуру називають моношаровою чи **субстратзалежною**. **Суспензійна культура** – культура, в якій окремі клітини культивуються у завислому стані у рідкому середовищі.

Моношар – клітинний шар товщиною в одну клітину, що росте на поверхні субстрату.

За інтенсивного зростання кількості клітин на одиницю об'єму середовища, відбувається швидке використання ними поживних речовин і накопичення метаболітів, внаслідок чого середовище виснажується, проліферація клітин припиняється і настає некроз клітин. Тому середовище для культивування необхідно періодично змінювати, зазвичай на 3-4-й день, тобто приблизно 2 рази на тиждень залежно від темпів проліферативного росту. Однак, якщо культура

росте слабо, краще залишити її на довший час без зміни середовища. Це пояснюється тим, що клітини синтезують і виділяють у середовище специфічні низькомолекулярні протеїни: цитокіни/ростові фактори, які здатні підтримувати проліферативний ріст клітин на високому рівні.

Типи культур тваринних клітин

Розрізняють основні типи культур тваринних клітин:

Первинна культура (первинно-трипсинізована) – культура, джерелом клітин якої є органи, експланти чи клітини, отримані безпосередньо з організму. Первинною називатиметься культура до першого пасажу. **Пасажування (субкультивування, пересів)** – перенесення культивованих ембріонів, органів, експлантів чи клітин з однієї посудини в іншу. **Кількість пасажів** – кількість перенесень культивованих ембріонів, органів, експлантів чи клітин з однієї посудини в іншу. Пасажування забезпечує можливість продовження існування культури, можливість клонування, дослідження й збереження властивостей клітин. При цьому утворюються більш однорідні популяції, а також втрачаються спеціалізовані клітини. Після декількох пасажів лінія клітин або гине, або *трансформується* й стає *постійною клітинною лінією*. **Клітинна лінія** – клітинна культура, яка виникає з первинної культури після першого пасажу.

Постійні клітинні культури (перещеплювані) – культури, які здатні витримати необмежену кількість пасажів (використовують також термін «безсмертна» клітинна культура). Перещеплювані культури – це трансформовані номальні клітини або отримані з пухлини.

Де найчастіше застосовується культура клітин у харчовій промисловості?

Найчастіше культура клітин є тест-системою для визначення токсичності синтетичних речовин, які застосовуються у технології харчових продуктів. Адже культура клітин є живим об'єктом, біохімічні процеси якого аналогічні клітинам організму. Задля зменшення використання у експериментах тварин, використовують культуру клітин. Щороку кількість новосинтезованих та нових речовин зростає, винаходять нові технології синтезу речовин для харчової промисловості, тому цей метод є досить актуальним. Адже за допомогою нього на ринок не надходять канцерогенні, тератогенні, токсичні, мутагенні речовини.

Лабораторна робота №1

Тема: Аналіз робочого місця для проведення роботи з культурою тваринних клітин. Вивчення обладнання

Мета: засвоїти вимоги щодо умов проведення робіт з культурою клітин. Створити умови для проведення наступних лабораторних робіт.

Завдання:

1. Ознайомитись зі структурою лабораторії для роботи з культурою клітин;
2. Ознайомитись з основним обладнанням лабораторії для роботи з культурою клітин;
3. Вивчити правила поведінки у боксі для роботи з культурою клітин;
4. У висновку коротко описати основні моменти, які потрібно врахувати при підготовці боксу до роботи з культурою клітин.

Біобезпека під час роботи з клітинними культурами

Лабораторія для роботи з культурою клітин характеризується рядом додаткових ризиків, пов'язаних зі специфікою культивування. До класу робіт з підвищеною небезпекою (робота з клітинними культурами контамінованими вірусними або бактеріальними інфекціями, за впливу речовин підвищеної небезпеки – токсинами, радіоізотопами), як правило, допускається лише досвідчений персонал. Тому, важливим етапом перед початком роботи з культурою є оцінка ризиків, визначення природи та масштабів потенційної небезпеки, ступінь та частота контакту з небезпечним матеріалом. Під час роботи з культурами клітин є загроза пожежної небезпеки (використання пальників) та можливе обмороження, працюючи з рідким Нітрогеном. Якщо виконання робіт у лабораторії пов'язане з ризиком для дослідників, потрібно дотримуватись чітких послідовних маніпуляцій на основі стандартних операційних процедур, які проводяться перед початком роботи із врахуванням всіх можливих небезпек. Щодо експлуатації обладнання, в лабораторії повинні бути чіткі інструкції.

Завдання 1. Ознайомитись зі структурою лабораторії для роботи з культурою клітин

Запорукою успіху у роботі з культурою клітин є стерильність!!!

Стерильність роботи з культурами клітин досягається шляхом проведення досліджень у боксовому приміщенні.

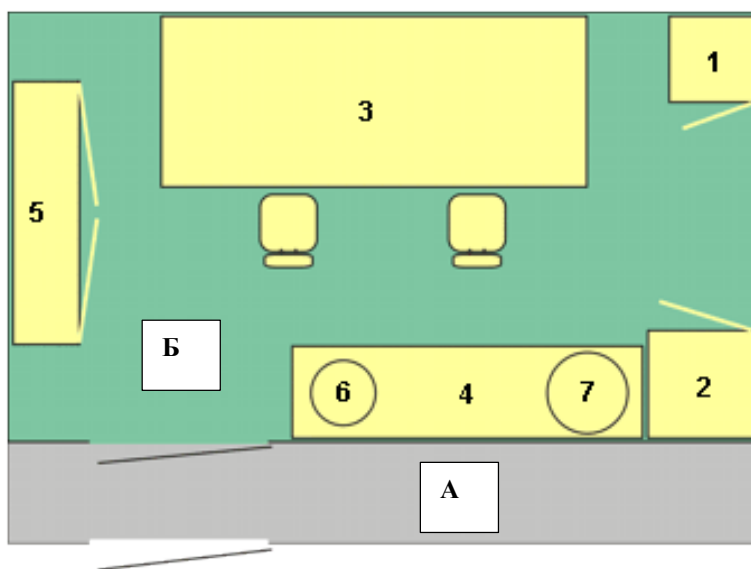


Рис. 2. Приміщення культурального блоку:

Передбоксове приміщення (А),

Бокс (Б):

1 - CO₂-інкубатор

2 - холодильник

3 - ламінар

4 - стіл з мікроскопами:

світловим (6)

та інвертованим світловим (7)

5 - шафа з посудом

За правилами стерильної роботи культуральний блок поділений на декілька зон – бокс, в якому знаходяться: ламінар, CO₂-інкубатор, інвертований мікроскоп, холодильник для зберігання необхідних середовищ для культивування клітин та передбоксове приміщення з додатковим обладнанням. Поза межами боксу із ламінаром та CO₂-інкубатором в двох окремих приміщеннях повинні бути розміщені автоклав та сухожарова шафа для стерилізації розчинів та посуду, кріообладнання, Дьюари для заповнення та зберігання рідкого Нітрогену та Дьюари, обладнані спеціальними пронумерованими касетами для довготривалого зберігання клітинних ліній, первинних культур, перещеплюваних штамів, стовбурових клітин, клонів.

Завдання 2. Ознайомитись з основним обладнанням лабораторії для роботи з культурою клітин

Характеристика основного обладнання лабораторії для роботи з культурою клітин

Обладнання лабораторії можна поділити на 4 групи:

1. прилади та обладнання для культивування клітин;
2. прилади для прижиттєвої візуалізації клітин (мікроскопи; відеокамери);
3. прилади та обладнання для кріоконсервації та зберігання клітинних культур;
4. прилади та обладнання, що забезпечують методи роботи під час експерименту з клітинними культурами.



Рис. 3. Використання ламінарну для роботи з культурою клітин

Прилади та обладнання для культивування клітин

Ламінар – це локальне стерильне робоче місце. Надлишковий тиск повітря у робочому об'ємі та спеціальні конструкторські заходи виключають можливість потрапляння повітря із приміщення в місце розташування біологічного матеріалу. Додатково

стерильність забезпечується підведенням усередину газового пальника, який повинен мати добре відрегульований потік газу. Також альтернативою є спиртові пальники, які використовуються у більшості випадків, оскільки є менш аварійно небезпечними. Окрім цього, ламінари обладнано ультрафіолетовими лампами для стерилізації камери перед початком (за 30 хв.) та після завершення роботи (на 30 хв.). Періодично стерилізацію ламінарну проводять 70%-им спиртовим розчином, протираючи всі робочі поверхні. Кожен раз перед початком роботи робочу поверхню стола ламінарну, руки, флакони, культуральний посуд протирають 70%-им спиртовим розчином. Після завершення роботи робочу поверхню стола протирають 70%-им спиртовим розчином.

Місце розміщення ламінару повинно бути ретельно підібрано; зазвичай це куток кімнати з доступом до електроенергії, газовідводу та водовідведення (у випадку використання автоматичних водяних відсмоктувачів рідини).

CO₂-інкубатор. Основна функція – це підтримання життєдіяльності



Рис. 34 CO₂-інкубатор

клітин поза організмом. Це термостат, у якому відбувається регулювання температури, підтримання вологості, концентрації CO₂. Культивування більшості клітин тварин та людини відбувається за умов:

температура – 37°C;

вологість – 100%;

концентрація CO₂ – 5 %.

Періодично проводиться профілактичне відключення CO₂-інкубатора, промивання внутрішньої камери. Лабораторні термостати для культивування клітин повинні відповідати певним вимогам: забезпечувати високу стабільність заданої температури, мати систему швидкого

відновлення температури після короткотермінового охолодження. Внутрішня поверхня термостатів виготовлена із біологічно пасивних матеріалів, тобто таких, що не впливають на життєздатність клітин та стійких до дії компонентів живильних середовищ. Зазвичай термостати мають зовнішні та внутрішні дверцята. Внутрішні дверцята виготовлено із прозорого матеріалу, що дозволяє спостерігати за культуральними флаконами без порушення температурного режиму. Регуляція CO₂ відбувається за допомогою редуктора, приєднаного до балону (зокрема, з карбонатною кислотою). Редуктор обладнано двома манометрами: перший із них показує тиск (у атмосферах) у балоні, другий забезпечує постійну подачу необхідного відсотка карбонатної кислоти у камері інкубатора для культивованих клітин.

Оптимальне *pH* для більшості культур клітин тварин і людини становить 7,2-7,4. Зазвичай підтримання такого *pH* забезпечується бікарбонатним буфером, який створюється у культуральному середовищі. Компонентами цього буферу є аніон HCO₃⁻ (його наявність забезпечує Натрію бікарбонат у культуральному середовищі) та H₂CO₃ (з вуглекислого газу, який закачують у робочу

камеру). За умов визначеної кількості доданого бікарбонату треба забезпечити 5% концентрацію CO_2 у газовій фазі, щоб pH культурального середовища становило 7,2-7,4.

Прилади для прижиттєвої візуалізації клітин



Рис. 5. Інвертований мікроскоп

Інвертований мікроскоп. В основі роботи інвертованого мікроскопа – принцип «перевернутості» (інвертованості), у результаті чого у полі зору можна спостерігати за клітинами, прикріпленими до дна планшету, флакону, чи чашки Петрі. З використанням інвертованого мікроскопа можна також

спостерігати за клітинами, що ростуть у суспензії. Більшість сучасних інвертованих мікроскопів обладнані відеокамерами та цифровими фотоапаратами, що дозволяє проводити прижиттєве спостереження за клітинами на всіх етапах їхнього культивування. Мікроскопи можуть мати спеціальне програмне забезпечення (наприклад AxioVision), що дозволяє обраховувати площу, інтенсивність забарвлення, розміри та інші параметри культивованих клітин; постійно спостерігати за інтенсивністю поширення субстратзалежних клітин за визначений проміжок часу.

Прилади, пристрої для кріоконсервування та зберігання клітин



Рис. 6. Дьюари з рідким Нітрогеном і штатив з кріопробірками

Для кріоконсервування клітинних субкультур лабораторія повинна бути оснащена кріоцистернами різної ємності, 5 – 10-ти літровими для щоденної

роботи з культурами та 40-ка літровими для їх тривалого збереження у рідкому Нітрогені (рис. 6.). Первинне замороження клітин проводять у холодильній камері за -20°C та -80°C . Зазвичай, працювати з рідким Нітрогеном дозволено лише персоналу після спеціальної підготовки з врахуванням усіх правил безпеки поведінки з реактивами, що можуть спричиняти обмороження. Для створення клітинних банків необхідно мати окреме приміщення.

Прилади та обладнання, що забезпечують методи роботи під час експерименту з клітинними культурами

Серед допоміжного необхідного обладнання в першу чергу виділяють автоклави та сухожарові шкафи, бідистилятори та дейонізатори для очищення води, прилади для ультрафільтрації середовищ та буферів, що використовуються для культивування



Рис. 7. Автоклав

Мультилунковий спектрофотометр

Центрифуга

Водяна баня



Рис. 8. рН-метр



Мікродозатори



Магнітна мішалка

клітин, мультилункові спектрофотометри, автоматичні відсмоктувачі рідини, водяні бані, рН-метри, лабораторні магнітні мішалки, гемоцитометри, а також широкий спектр біохімічних, молекулярно-біологічних та хроматографічних приладів, необхідних для обладнання культуральної лабораторії певного напрямку досліджень. Робота з культурами клітин передбачає наявність у лабораторії центрифуги, електронних вагів для зважування компонентів середовищ і розчинів. Необхідний також комплект напівавтоматичних мікродозаторів об'ємом від 10 до 1000 мкл зі змінними стерильними наконечниками 10, 100 або 200 і 1000 мкл.

Завдання 3. Вивчити правила поведінки у боксі для роботи з культурою клітин

Вхід в бокс, де проводяться роботи з культурами тваринних клітин, є обмеженим (не більше 3 особи). Робота проводиться у спецодязі з натуральних тканин (халат, змінне взуття; шапочка, маска – залежить від специфіки досліджуваних об'єктів і методів роботи).

Перед початком роботи слід ввімкнути у ламінарі ультрафіолетову лампу (30 хвилин), ламінарний потік повітря.

Працюючи з культурами у ламінарі, ультрафіолетову лампу вимикаємо!!!

Перед роботою у ламінарі необхідно обробити руки спиртом. Після цієї процедури руками працюють лише у ламінарі. Якщо руки опинились поза ламінаром, процедуру з оброблення спиртом слід повторити. Працюючи, слід роботу організовувати так, щоб «чисті» і користовані предмети були розділені у просторі, за можливості – у часі. Наприклад, відібрати середовище у ламінарі, решта, задля попередження контамінації, винести з-під ламінарну; лише після цього вносити під ламінар культури і проводити з ними маніпуляції. Використання стерильних рукавичок не завжди є безпечним, оскільки використання етанолу та пальника у ламінарі може призводити до пожежі. Приміщення, в якому проводиться стерильна робота з клітинами не відвідують сторонні люди, воно не провітрюється, обладнане кондиціонером. Стіни, підлога вкриті матеріалом, який добре миється дезінфікуючими розчинами.

Не допускати проведення робіт з бактеріями, дріжджами та клітинами вищих еукаріот в одному ламінарі. Для робіт з різними об'єктами, як правило, використовуються окремі приміщення. Якщо виникає необхідність одному досліднику працювати з різними об'єктами, послідовність роботи – клітини, бактерії, дріжджі.

Стационарно у ламінарі можуть знаходитись, пенали зі стерильними піпетками, коробки із автоклавованими пластиковими наконечниками, необхідна кількість пластикового посуду, стерильна вода, фізіологічний розчин, фосфатно-сольовий буфер. Недопустимо, щоб середовища культивування, сироватка та білкові розчини знаходились у ламінарному боксі. Для цих компонентів обов'язково повинен бути виділений окремий холодильник. Перед використанням готові середовища підігріваються в термостаті до 37°C.

Послідовність проведення робіт з культурами клітин:

1. Підготовка середовищ та реактивів для культивування.
2. Відбір кількості середовища, необхідної для певного етапу робіт.
3. Пересів клітин та кріоконсервація.
4. Висів клітин у планшети для короткотривалих експериментів.
5. Маніпуляції з клітинами в планшетах.

Якщо, у ламінарі працюють декілька фахівців, слід

Лабораторна робота №2

Тема: Підготовка посуду для роботи з культурою клітин, стерилізація скляного посуду

Мета: ознайомитись з різноманітністю і значенням посуду для роботи з культурою клітин, методами його підготовки до роботи.

Завдання:

1. Ознайомитись з пластиковим посудом для роботи з культурою клітин;
2. Ознайомитись зі скляним посудом для роботи з культурою клітин та методами його підготовки до роботи.

Є два основні види культурального посуду – скляний та пластиковий. Кожен з цих видів посуду має свої переваги та недоліки. Скляний посуд для культивування клітин виготовляється із спеціального нейтрального скла.

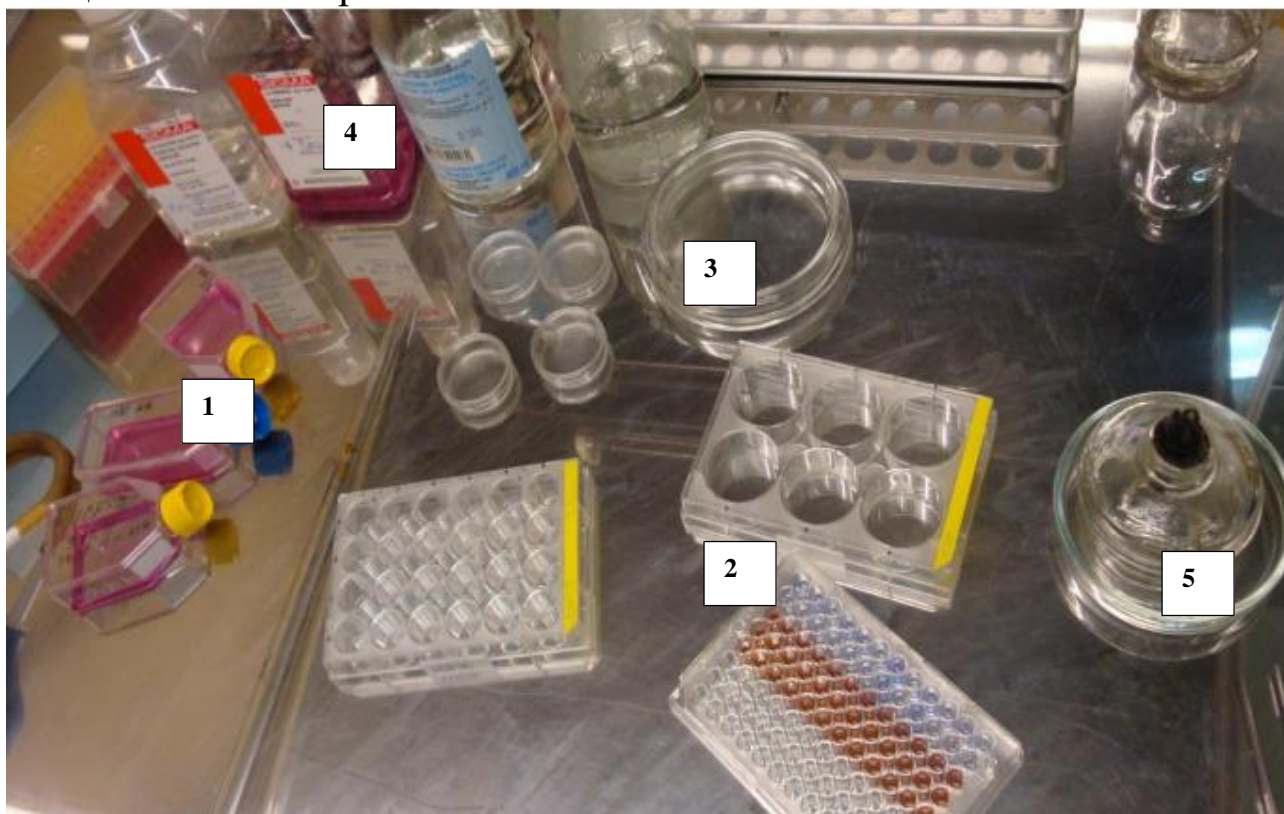


Рис.9. Посуд для культивування клітин:

- 1 – культуральні флакони;
- 2 – культуральні планшети: 6-, 24-, 96-лункові;
- 3 – чашки Петрі різного діаметру;
- 4 – флакони з середовищем;
- 5 – спиртівка.

Переваги скляного посуду: багаторазове використання, стійкість до агресивних рідин. Недоліки: клітини гірше прикріплюються до поверхні скляного посуду, ніж до пластикового, він крихкий.

Пластиковий посуд надходить стерильним, він легкий, клітини до нього краще прикріплюються, має рівнішу поверхню. Недоліки: висока вартість.

Завдання 1. Ознайомитись з пластиковим посудом для роботи з культурою клітин

Пластиковий посуд одноразовий, стерильний. Для культивування використовуються культуральні флакони з різною робочою поверхнею (від 25 см² до 500 см²) та чашки Петрі з різним діаметром. Планшети, які найчастіше використовують, бувають трьох видів (плоскодонні, V-подібні, та круглдонні). Для посуду існують оптимальні норми висівання клітин та об'єму середовища для культивування.

Таблиця 1.

Характеристика пластикового посуду, який використовується для культивування кліти

Тип флакону	Площа (см ²)	Об'єм (мл)	Об'єм середовища інкубації (мл)	Щільність висаджуваних клітин
Флакон	24	50	7	4,8x10 ⁵
флакон	25	70	7	5x10 ⁵
флакон	75	250	25	1,5x10 ⁶
флакон	83	260	30	1,6x10 ⁶
флакон	175	800	68	3,5x10 ⁶
Чашка 35x10	9,6		2,5	1,6x10 ⁵
Чашка 65x15	21		6,0	4,2x10 ⁵
Чашка 100x20	58		16,0	1,1x10 ⁶
96 лунковий планшет	0,32		0,2	6x10 ³
24 лунковий планшет	1,88		1,5	3,7x10 ⁴
12 лунковий планшет	3,83		2,0	7,6x10 ⁴
6 лунковий планшет	9,4		3,0	1,8x10 ⁵



Рис. 10. Пластиковий посуд:
 а – центрифужні пробірки різного об'єму;
 б – пробірки для кріоконсервації клітин;
 в – мікропробірки Епендорф;
 г – наконечники для мікродозаторів.

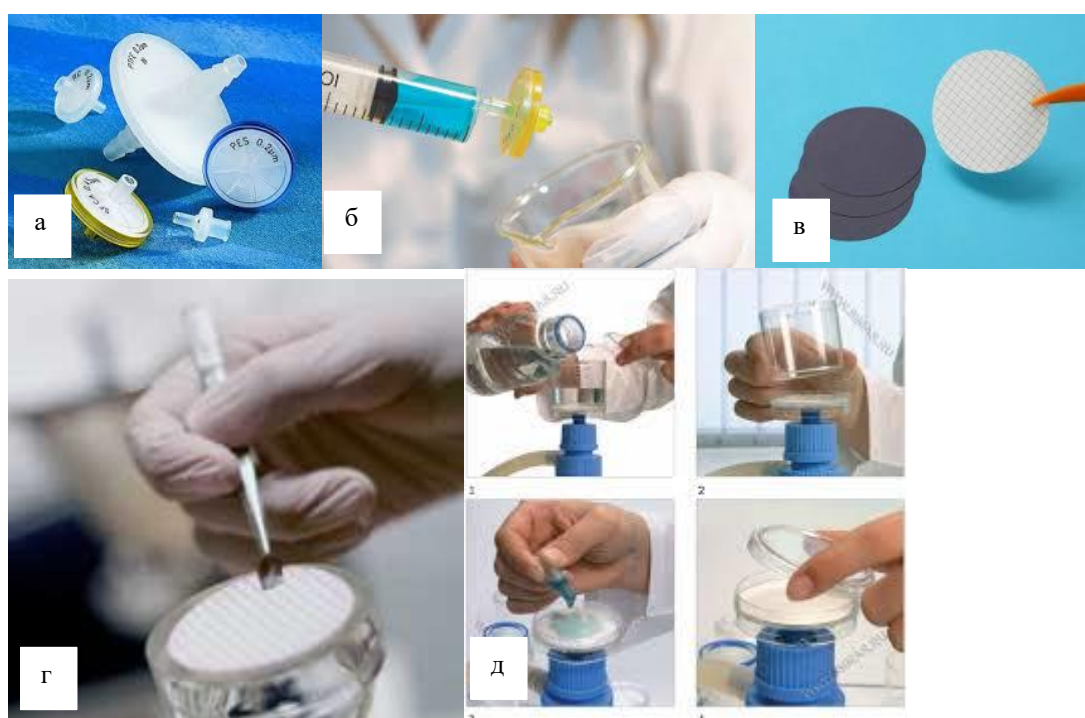


Рис. 11. Різновиди фільтрів
 а – шприцеві фільтри;
 б – використання шприцевих фільтрів;
 в – мембранні фільтри;
 г, д – використання мембранних фільтрів.

Серед іншого пластикового посуду – пробірки для кріоконсервації клітин, центрифужні пробірки різного об'єму, одноразові наконечники. Особливо, необхідними є мембранні фільтри (нітроцелюлозні з діаметром пор 0,22 мкн) та шприцеві фільтри, які розраховані на фільтрування невеликої кількості розчинів та буферів.

Завдання 2. Ознайомитись зі скляним посудом для роботи з культурою клітин та методами його підготовки до роботи

Скляний посуд для роботи з культурою клітин

Скляний посуд – це посуд різної ємності (колби, хімічні склянки, піпетки, пробірки), основне призначення якого приготування розчинів для культивування клітин. Цей посуд спеціально готується. Під час миття посуду обов'язково відбувається процедура замочування у спеціальних детергентах або у розчині Калію біхромату («хромка») (93 г Калію біхромату в гумових рукавичках та у респіраторі, ватно-марлевій пов'язці добре розтирають у порошкоподібну масу в ступці, додають мінімально необхідний об'єм води та порційно розчиняють у 1 л сульфатної кислоти). Ополіскують посуд у проточній воді, потім – у дистильованій та бідистильованій воді. Наступний етап – кількогадинна обробка посуду за високої температури (160-180°C). Після цього посуд обгортають фольгою і стерилізують автоклавуванням. Підготовка скляних піпеток також містить процедуру ретельного миття; замочування і обробка детергентами відбувається у циліндрах для замочування піпеток. Важливим є ретельне ополіскування в проточній та дистильованій воді. Перед стерилізацією тупі кінці піпеток закорковують ватними тампонами, поміщають у спеціальні пенали або загортають кожну піпетку окремо в папір, який витримує стерилізацію за 180°C. За такої обробки посуд можна зберігати у шафі боксу впродовж тижня часу, після чого його слід автоклавувати повторно.

Стерильність посуду важлива для отримання достовірного результату роботи з культурами клітин. Посуд, що використовується для культивування клітин, не використовується для біохімічних та молекулярно-біологічних досліджень.

Послідовність процедури підготовки піпетки до роботи:

1) необхідно зняти кришку пеналу в полум'ї пальника (це робиться правою рукою). Кришка після прожарювання над полум'ям відставляється вправо.



Рис. 13. Користування пеналом з піпетками у ламінарі

2) тримаючи пенал лівою рукою, легкими рухами пеналу висунути кінчики піпеток в полум'я пальника і відібрати необхідну

Лабораторна робота № 3

Тема: Основні принципи методу культивування тваринних клітин

Мета: Навчитись основних принципів роботи з культурою тваринних клітин: визначення концентрації клітин; визначення співвідношення живих та мертвих клітин у культурі.

Завдання:

1. Підрахуйте кількість клітин у флаконах, запропонованих для дослідження.
2. Дослідити життєздатність клітин субстратзалежної та суспензійної культури, використовуючи вітальний барвник трипановий синій.

Працюючи з культурою клітин, дослідник повинен вміти виконувати ряд рутинних методів, пов'язаних зі збереженням життєздатності клітин та їх оцінкою. Застосовуючи, запропоновані методи студент оволодіє навиками фарбування клітин, приготування барвників, зуміє візуально відрізнити живі і мертві клітини, кількісно подати ці показники. Це є основою для майбутнього планування наукових, експериментальних досліджень.

Завдання 1. Підрахуйте кількість клітин у флаконах, запропонованих для дослідження

Обладнання, матеріали та реактиви

DMEM, трипсин/EDTA;

Культура субстратзалежних, суспензійних клітин, склянка для зливу, скляні піпетки (5 мл) – 4 шт., центрифужні пробірки – 2 шт., фільтрувальний папір, серветки, центрифуга, термостат, мікроскоп, автоматичні мікродозатори з наконечниками (1000 мкл, 10 мкл), камера для підрахунку клітин.

Дослідження субстратзалежних клітин

Хід роботи

1. Злийте поживне середовище;

2. Внесіть до культури 2 мл розчину трипсин/*EDTA*. Трипсинізуйте за 37°C до 5 хвилин. Огляд культури під мікроскопом допоможе встановити час трипсинізації. Відкріплені клітини будуть сферичної форми, вільно плавати у розчині;
3. Інактивуйте трипсин/*EDTA* середовищем (5 мл);
4. Центрифугуйте за 1000 об/хв. впродовж 10 хвилин;
5. Осад ресуспендуйте в 1 мл середовища;
6. Відіберіть аліквоту (10 мкл) суспензії клітин та внесіть мікродозатором у камеру для підрахунку клітин (користування камерою див. нижче). Надлишок розчину видаліть фільтрувальним папером;
7. Підрахуйте кількість клітин.

Дослідження суспензійних клітин

Хід роботи

1. Суспензію клітин перенесіть у центрифужну пробірку;
2. Центрифугуйте за 1000 об/хв впродовж 10 хвилин;
3. Осад ресуспендуйте в 1 мл середовища;
4. Відіберіть аліквоту (10 мкл) суспензії клітин та внесіть мікродозатором у камеру для підрахунку клітин (користування камерою див. нижче). Надлишок розчину видаліть фільтрувальним папером;
5. Підрахуйте кількість клітин.

Використання камери для підрахунку клітин

Існує кілька типів гемоцитометрів для підрахування концентрації клітин. Камера Горяєва – найбільш розповсюджена.

1. Промийте скляний слайд камери і покривне скло 70% розчином етанолу і висушіть.
2. Розташуйте покривне скло так, щоб воно щільно притиснулося до скляного слайду з утворенням інтерферентних (райдужних) кілець.
3. Наповніть 4 камери, що утворилася між слайдом і покривним склом, краплею клітинної суспензії, не більше 10 мкл.
4. Під мікроскопом підрахуйте кількість клітин у квадратах кожної камери. Якщо середня кількість клітин у квадратах перевищуватиме 200, – концентрація значна – клітинну суспензію необхідно розвести середовищем у 10 разів для вірного

3. Біобезпека в лабораторії для культивування клітин.
4. Основні правила техніки безпеки в лабораторії для культивування клітин.
5. Загальна структура лабораторії для культивування клітин.
6. Групи основного обладнання для роботи з культурами клітин.
7. Як створюється локальний стерильний простір?
8. Які основні принципи стерильної роботи?
9. Посуд для культивування клітин.
10. Способи миття скляного посуду, що використовується для стерильної роботи.
11. Яким чином слід підготувати посуд до стерилізації?
12. Як провести підрахунок клітин у культурі?
13. Якими методами можна дослідити життєздатність клітин?

ТЕМА 3: БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН

Біотехнологія рослин – це сукупність технічних прийомів для модифікації, створення нових та розмноження рослин з корисними ознаками, одержання біологічно активних речовин (БАР).

Практичне і фундаментальне значення біотехнології рослин:

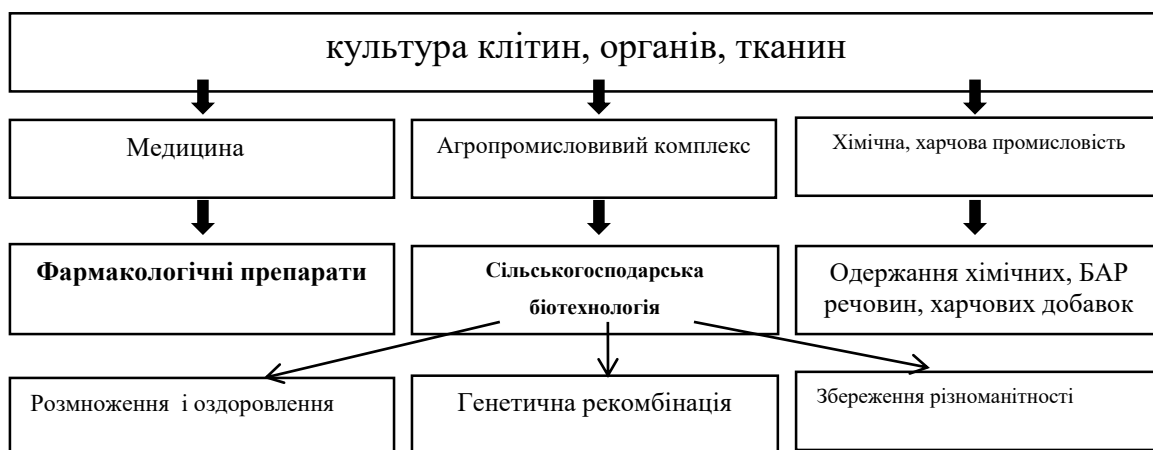
- отримання рослин з кращими якісними ознаками (збалансованим вмістом жирів, незамінних амінокислот);
- отримання рослин стійких до біотичних та абіотичних стресових факторів навколишнього середовища (захворювань, шкідників, вірусів, віроїдів, засолення, закислення ґрунтів, гербіцидів);
- отримання рослин з надсинтезом певних БАР;
- нарощування клітинної біомаси як джерела БАР;
- отримання рослин зі здатністю до фіторемедіації;
- можливість отримувати результати незалежно від клімату, сезону, ґрунтових умов;
- працюючи з культурою рослинних клітин можна вивчати процеси росту, клітинної диференціації і розвитку рослинного організму, метаболізм і його регуляцію у клітинах і тканинах цілої рослини;
- можливість проводити швидке розмноження у дуже великих кількостях;
- можливість створювати принципово нові технології для промисловості і сільського господарства;
- можливість вкоротити селекційний процес у 2, а той і 3 рази.

Отже, біотехнологічні методи *in vitro* дають змогу швидко розмножити рослини, вивільнити їх від бактеріальних та вірусних інфекцій, збільшити коефіцієнт розмноження та отримати масовий, морфологічно вирівняний посадковий матеріал.

Біотехнологія рослин базується на застосуванні низки нових технічних прийомів для модифікації, покращення, створення та розмноження рослинних організмів в умовах *in vitro*, одержання корисних речовин. Вирощування і маніпуляції з клітинами, тканинами і органами рослин поза організмом відбуваються на штучних живильних середовищах у чітко контрольованих умовах. Методи клітинної інженерії рослин дозволяють не тільки глибше вивчати структуру і функціонування клітин, що визначають розвиток будь-якого організму, але й створювати нові форми живих організмів, корисні для людини, для збереження різноманітності видів на Землі.

Досягнення цього напрямку мають важливе значення для розвитку сільського господарства, медицини, харчової технології та служать основою сучасної біотехнології. Особливо важливим є отримання різноманітних біологічно активних речовин рослинного походження, які використовують при виготовленні лікарських препаратів (фітопрепаратів), засобів захисту рослин, харчових добавок.

Перспективи методу культури рослин *in vitro* Напрямки використання культури клітин рослин



Культивування рослин в умовах *in vitro* відбувається:

1. культурою калюсних тканин на агаризованому середовищі;
2. суспензійною культурою клітин;
3. культурою протопластів;
4. ізольованими зародками, органами (кінчиками корінців, меристемами пагонів).

Такі культури зберігають біосинтетичний потенціал вихідних форм, є джерелом економічно важливих продуктів клітинного метаболізму. Ця особливість використовується для створення технологій з метою одержання промисловим методом цінних речовин.

Практичне значення методу культури рослин *in vitro*



Культура рослинних клітин і тканин – джерело БАР у промисловості, зокрема харчовій.

Технології на основі культивованих *in vitro* клітин і тканин рослин розвиваються в чотирьох основних напрямках. Перший – отримання промисловим способом цінних біологічно активних речовин рослинного походження. Другий – використання тканинних і клітинних культур для швидкого клонального мікророзмноження та оздоровлення рослин. Третій – отримання вихідного матеріалу для прискореної селекції важливих сільськогосподарських рослин. Четвертий – використання методів клітинної та генетичної інженерії для генетичної модифікації клітин і отримання на їх основі нових форм рослин.

Фармацевтичні продукти, ароматичні речовини, прянощі, барвники, біостимулятори, отримані з вищих рослин, мають складну хімічну будову і відомі як природні сполуки. Їх або не можна, або надзвичайно важко синтезувати хімічним шляхом. Ціна деяких із таких продуктів на світовому ринку досягає кількох тисяч і навіть мільйонів доларів США за 1 кг. Внаслідок зменшення природних запасів необхідно шукати відповідні нові джерела для виробництва біологічно активних речовин.

У 50-х роках минулого століття встановлено, що під час культивування клітин рослин можуть накопичуватись різноманітні речовини, синтез яких характерний для цього виду рослини. Культури клітин деяких рослин здатні синтезувати різноманітні вторинні метаболіти в концентраціях, близьких і навіть більш високих, ніж інтактні рослини. На сьогодні такі високопродуктивні, а також трансформовані культури, в які перенесено гени, що забезпечують синтез цільового продукту, широко використовують в промисловому виробництві біопродуктів.

Особливості культивування калюсних культур як приклад біотехнології рослин.

Калюсна тканина – це дедиференційовані клітини, в які перетворюються спеціалізовані і меристематичні клітини за культивування на специфічних поживних середовищах *in vitro*. Калюсна тканина – аморфна маса тонкостінних паренхімних клітин без визначеної анатомічної структури. Клітини калюсу мають велике ядро, високий вміст РНК. Деякі клітини здатні накопичувати крохмаль і речовини вторинного метаболізму. Колір тканин: білий, жовтий, зелений,

червоний, що залежить від виду рослини, типу експланту та умов культивування.

Для індукування калюсної тканини стерильні листки, черешки, сегменти стебла (експланти) нарізають і вносять на живильне середовище. Калюсну тканину можна індукувати із будь-якого органу, тканини рослини. При цьому диференційовані клітини рослин під дією індукторів клітинного розмноження – ауксинів та цитокинінів, переходять в дедиференційований стан. Перехід спеціалізованих клітин у стан неорганізованого росту пов'язаний із синтезом білка в клітинах, збільшенням вмісту РНК, зникненням хлоропластів і хромопластів. При оптимально підбраному середовищі сегменти утворюють калюс через 3-8 тижнів.

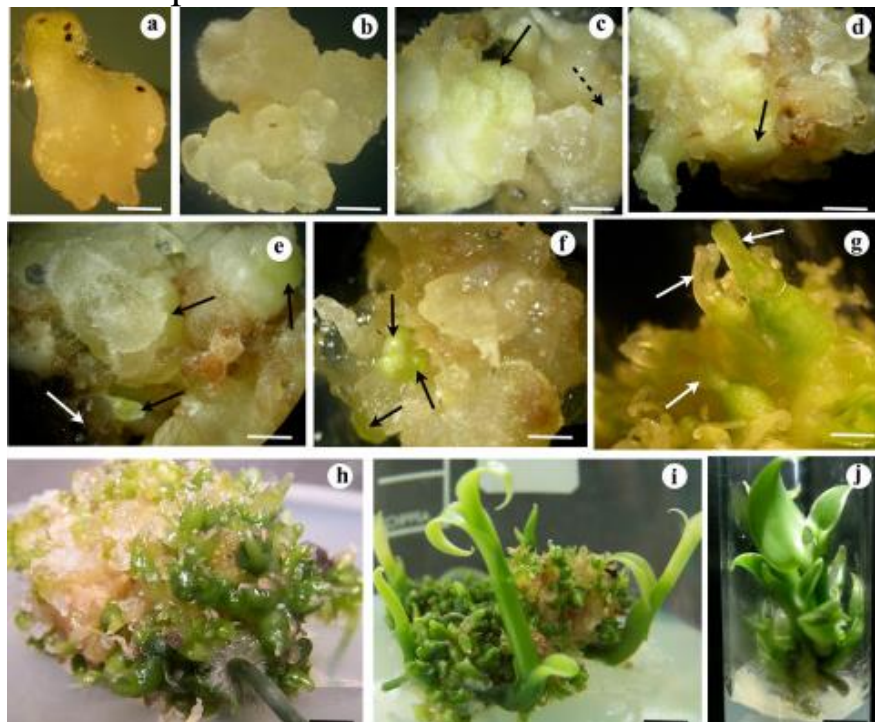


Рис. 14. Етапи калюсогенезу.

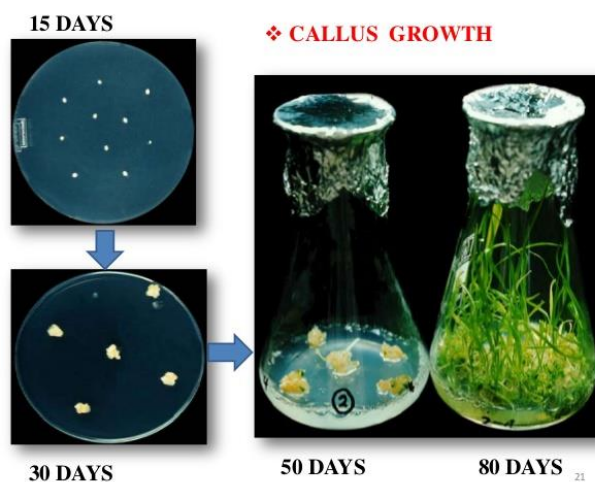


Рис.15. Одержання рослин-регенерантів з калюсу

Лабораторна робота № 4

Тема: Одержання і культивування калюсної тканини сої

Мета: Навчитись основних принципів роботи з культурою рослинних клітин.

Завдання 1. Одержати калюсну тканину сої

Обладнання, матеріали та реактиви

Ламінар-бокс, чашки Петрі, інструменти (пінцети, скальпелі), стерильні проростки сої, флакони з калюсогенним живильним середовищем.

Хід роботи

1. Роботу проводьте у ламінар-боксі. Для одержання калюсної культури як експлант використовуйте проростки сої. Пробірку із стерильною рослиною протріть спиртом, обпаліть над полум'ям спиртівки.
2. Стерильні проростки сої вийміть стерильним пінцетом із пробірки і помістіть у стерильну чашку Петрі.
3. Сім'ядолі сої стерильним скальпелем відріжте від проростків і розріжте на сегменти.
4. Експланти сім'ядолі помістіть на калюсогенне живильне середовище.

Склад живильного середовища для вирощування калюсної тканини із сім'ядолей сої (мг/л)

Макросолі за Міллером	100 мл
Мікросолі за Міллером	1 мл
Вітаміни за Уайтом (додаток А)	1 мл
Fe-хелат	5 мл
Гліцин	2 мг
Кінетин	0,5 мг
ІОК	2 мг
Цукроза	20 г
Агар-агар	7 г

pH 5,6-5,8

5. Флакони з сім'ядолями сої помістіть у термостат (+25°C, абсолютна темрява 70% вологості) для отримання калюсної тканини. Спостерігайте калюсогенез 30 днів. Висновки запишіть.

Висновки: _____

Питання для самоконтролю:

1. Що таке біотехнологія рослин?
2. Практичне значення біотехнології рослин?
3. Постачання яких матеріалів, речовин для харчової промисловості забезпечує біотехнологія рослин?
4. Способи культивування рослин в умовах *in vitro*.
5. Особливості культивування калюсних культур.

ТЕМА 4: ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ, ЗОКРЕМА У ХАРЧОВОМУ ВИРОБНИЦТВІ

Розвиток біотехнологій у сучасному світі є вирішальним для розв'язання першочергових завдань медицини, фармакології, сільського господарства, екології, різних галузей промисловості, зокрема харчової. Актуальною є розробка підходів та засобів аналітичної біотехнології із застосуванням моноклональних антитіл (МКА).

Забруднення кормів тварин мікотоксинами, активне використання антибактеріальних засобів, стимуляторів росту у тваринництві, що забезпечує сировиною харчову промисловість, обумовлює необхідність впровадження оптимальних методів аналітичного контролю якості продуктів харчування. Інші важливі питання – діагностика захворювань людини, контроль стану довкілля. Відкриття МКА, імуноферментного аналізу (ІФА) є одними із шляхів вирішення цих питань. Порівняно низька собівартість, нетривалий час виконання аналізу, недороге обладнання дає можливість застосовувати ІФА у різних сферах діяльності, мотивує до вдосконалення.

ІФА є офіційним методом контролю продуктів тваринництва у країнах Євросоюзу.

Використання у тваринництві, птахівництві й рибництві гормональних активних стимуляторів росту й тиреостатиків негативно відображається на здоров'ї людини. Наприклад, вміст у продуктах харчування стильбенів, стероїдних гормонів є причиною канцерогенезу, порушення статевого дозрівання та репродуктивності, а тиреостатики порушують функцію щитовидної залози й провокують алергію. Деякі катехол-метаболіти спричиняють вільнорадикальне окиснення ДНК у культурі клітин й тест-системі лабораторна тварина. Доведено токсичну, алергенну, мутагенну та онкогенну дію на організм людини і тварини гербіциду 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота. Значна кількість речовин має віддалені ефекти: тератогенний, мутагенний, ембріотоксичний, канцерогенний. Для них характерною є імуносупресивна дія та відсутність сенсibiliзуючих властивостей. Такі препарати не відразу руйнуються у печінці тварин, продукти їх трансформації зберігаються у м'ясних, молочних продуктах, інформацією про вміст яких необхідно володіти.

Деякі речовини, для ідентифікації яких у продуктах тваринного походження розроблено методики ІФА

Групи речовин	Речовини, які можливо ідентифікувати у продуктах тваринного походження ІФА
Гормони	тестостерон, 17β-естрадіол, зеранол, кленбутерол, диетилстильбестрол, медроксипрогестерон, ацетилгестагени
Антимікробні речовини	доксциклін, фуразолідон, фузалтодон, фурадонін, тетрацикліни, стрептоцид, сульфагуанідин, сульфадіазин, сульфатіазол, сульфамеразин, нітрофуран, сульфаметазин, левоміцетин, сульфаметоксазол, ампіцилін, норсульфазол, сульфаметоксипіридазин, сульфадиметоксин, сульфаклорпіразин, бензилпеніцилін, амоксицилін, клоксацилін, стрептоміцин, окситетрациклін
Мікотоксини	афлатоксини, афлатоксин В1, фумонізін, токсин Т-2, деоксиніваленол, афлатоксин М1, охратоксин А, зеараленон
Протипаразитичні препарати	івермектин, фенбендазол
Пестициди	синтетичні піретроїди, сим-триазини, 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота

Існують тест-системи ІФА RIDASCREEN® (*R-Biopharm*, Німеччина), призначені для кількісного визначення концентрації свинини у харчових продуктах, для визначення сої, арахісу, лісового горіха, мигдалю, селери, глютену, грецького горіха, гірчиці, риби, люпину, ракоподібних, молюсків. Тест-системи «Beacon Analytical Systems Inc.» (США); «Envirologix Inc.» (США) застосовують для визначення залишкової кількості шкідливих речовин у продуктах харчування.

Традиційно контроль концентрації ксенобіотиків у продуктах харчування здійснюють фізико-хімічними методами аналізу: газова, газорідинна і високоефективна рідинна хроматографії. Ці методи досить ефективні для ідентифікації речовин. Позаяк, вони мають ряд істотних недоліків – трудомісткість, складність, тривалість аналізу, необхідність використання дорогого устаткування і залучення висококваліфікованого персоналу. Їх собівартість на 28% перевищує вартість ІФА. Забруднення їжі, води й інших об'єктів навколишнього середовища, що становить потенційну небезпеку, диктує потребу в простих, недорогих, швидких методах дослідження.

Будь-яку речовину, яка володіє властивостями антигену, можна кількісно визначити ІФА. Значна кількість таких речовин названа вище. Важливим є факт одержання біотехнологічним методом моноклональної антитіла до тої речовини, яку необхідно дослідити. Ці антитіла будуть іммобілізовані на дні лунки планшета, який є складовою тест-системи.

Для проведення цього методу необхідно мати очищений антиген (речовина, що визначається), специфічне антитіло (іммобілізоване на дні лунки планшета), ензим як мітку для антигена чи антитіла і засіб реєстрації активності ензиму (спектрофотометр). Усі компоненти є

складовими тест-системами (діагностикумі), можуть бути стандартизованими. Виконання реакцій методично просте й легко контролюються. Для проведення ІФА використовують автоматичні та напіваавтоматичні аналізатори, перевагами яких є: зручність у роботі, швидкість, об'єктивність за рахунок автоматизації обліку результатів, висока специфічність та чутливість, можливість виконання великої кількості аналізів. Автоматизована оцінка реакцій дозволяє стандартизувати метод. Основою ІФА є специфічна взаємодія антитіла з антигеном, при цьому один з компонентів кон'югованих з ензимом, в результаті реакції з відповідним хромогенним субстратом утворює забарвлений продукт.



Лабораторна робота №5

Тема: Дослідження мікотоксинів методом імуноферментного аналізу (ІФА)

Мета: опрацювати метод ІФА, навчитись визначати концентрацію канцерогенів у продуктах харчування.

Завдання:

1. Дослідити мікотоксини методом ІФА.

Набори *RIDASCREEN FAST* містять усі необхідні реагенти для ІФА і слугують для експрес-визначення мікотоксинів: афлатоксину B_1 , охратоксину A , фумонізинів, зеараленону, патуліну, Т-2 токсину в зернових, зернобобових, насінні олійних культур, кормах, борошні, круп'яних виробках, спеціях та сухофруктах, каві, горіхах, пиві.

Набори *RIDASCREEN® FASTAflatoxinM1* і *RIDASCREEN® AflatoxinM130/15* – тест-системи для ІФА випускаються серійно відповідно до ISO 9000, укомплектовані необхідними реагентами і призначені для кількісного експрес-визначення афлатоксину M_1 у молоці, сухому молоці і сирі. Цей метод є офіційним у Німеччині (LMBG § 35 01.00-34), а також здійснюється відповідно до рекомендацій і критеріїв Міжнародної організації зі стандартизації (ISO 14675: 2003) і Міжнародної молочної федерації (IDF 186:2003).

Відповідно до методу спочатку необхідно екстрагувати афлатоксин M_1 з молока 70%-вим водним розчином метанолу і профільтрувати через фільтрувальний папір.

Матеріали та обладнання, реактиви

Екстракт молока; автоматичні одно- та багатоканальні дозатори фіксованого або змінного об'єму 5-1000 мкл; термошейкер; аналізатор імуноферментний з довжиною хвилі 450 нм.

Тест-система:

1. Планшет з іммобілізованим антигеном до афлатоксину M_1 ;
2. Стрічки для заклеювання планшетів;
4. Набір калібраторів та контролю;
5. Відмиваючий розчин концентрат;
6. Кон'югат;
7. Субстрат;
8. Стоп-реагент.

Хід роботи

1. Помістіть у рамку потрібну кількість стрипів – лунок контролю та зразків у 2-ох паралелях;
2. Внесіть у лунки розчини афлатоксинів з відомою концентрацією, контрольний зразок та досліджувані зразки, до кожної лунки також внесіть кон'югат згідно з інструкцією до тест-системи («*RIDASCREEN FAST*»);
3. Інкубуйте;
4. Відмийте стрипи 5 разів промиваючим розчином;
5. Внесіть у лунки субстрат з хромогеном;
6. Інкубуйте за 20-25°C у темному місці;
7. Внесіть у лунки стоп-реагент. Упродовж не більше 15 хв. виміряйте оптичну густину (ОГ) у лунках на аналізаторі імуноферментному за довжини хвилі 450 нм. Результат вимірювання виражають у відсотках від ОГ у лунці з нульовим стандартом;
8. Побудуйте калібрувальну криву за калібраторами і визначіть концентрацію афлатоксину M_1 за допомогою комп'ютерної програми.

ГДК афлатоксину M_1 у молоці – 0,0005 мг/кг.

Висновки:

ГДК мікотоксинів у продуктах харчування

Показник	Продукт	Європейський стандарт (EU)	CODEX STAN 193-1995	Японський стандарт
Афлатоксини B_1, B_2, G_1, G_2	Зерно, зернопродукти, мука	Сума 4–15 мкг/кг AFB ₁ 2–12 мкг/кг	Сума 10–15 мкг/кг	Сума 10 мкг/кг
Афлатоксин M_1	Молоко	0,05 мкг/кг	0,5 мкг/кг	0,5 мкг/кг
Охратоксин A	Пшениця, пшенична мука	2–10 мкг/кг	5 мкг/кг	Не регламентується
Патулін	Яблуко	25–50 мкг/кг	50 мкг/кг	50 мкг/кг
Зеараленон	Зерно, зернопродукти, мука	20–400 мкг/кг (корм 2–3 мкг/кг)	Не регламентується	Не регламентується (корм 1 мкг/кг)
Фумонізін	Кукурудза	200–400 мкг/кг	2000–4000 мкг/кг	Не регламентується
Т-2 токсин	Зерно	Сума 200–1000 мкг/кг	Не регламентується	Не регламентується

Активність мікотоксинів

Мікотоксин	Мутагенність	Тератогенність	Канцерогенність
Афлатоксини B_1, B_2, G_1, G_2	+++	+++	+++
Афлатоксин M_1	+++	+++	+++
Охратоксин A	-	+	+
Патулін	+	+	+
Зеараленон	+	-	+
Фумонізін			+
Т-2 Токсин	-	+	+
Гризеофульвін			++

Питання для самоконтролю:

1. У яких дослідженнях використовується ІФА?
2. Суть ІФА.
3. У продуктах харчування які речовини можна ідентифікувати ІФА?
4. Що таке тест-система ІФА?

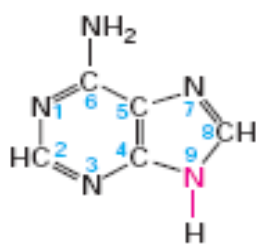
ТЕМА 5: ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ

Основи молекулярної біології.

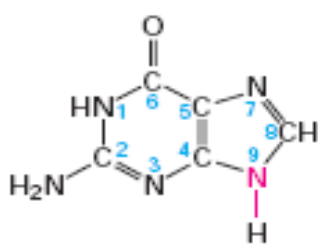
Ген – це ділянка ДНК, яка є одиницею спадкової інформації і відповідає за синтез одного протеїна та формування одної ознаки. Гени знаходяться в хромосомах у певних місцях (локусах), тому ген є хромосомним локусом, а сама хромосома – лінійна комбінація генів, що не перекриваються. Матеріалом хромосом є ДНК.

ДНК, також РНК – нуклеїнові кислоти, мономерами яких є **нуклеотиди**. **ДНК** – дезоксирибонуклеїнова кислота, **РНК** – рибонуклеїнова кислота. Нуклеотид складається з трьох компонентів: азотистої основи, пентози і залишку фосфатної кислоти. Нуклеотид ДНК: азотиста основа (Т, С, А, Г), пентоза (дезоксирибоза), залишок фосфатної кислоти. Нуклеотид РНК: азотиста основа (У, С, А, Г), пентоза (рибоза), залишок фосфатної кислоти.

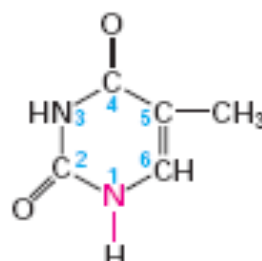
Азотисті основи похідні пурину:



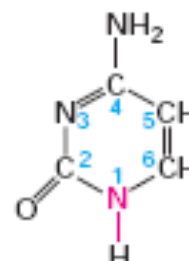
Adenine (A)



Guanine (G)



Thymine (T)



Cytosine (C)

Азотисті основи похідні піримідину:

Зв'язки між нуклеотидами в ланцюгу утворюються за рахунок дезоксирибози і фосфатної групи. Цей зв'язок формується між 3'-ОН групою одного нуклеотидного залишку і 5'-ОН іншого. Ланцюг нуклеотидів, з'єднаних фосфодіестерним зв'язком є **первинною структурою** нуклеїнових кислот.

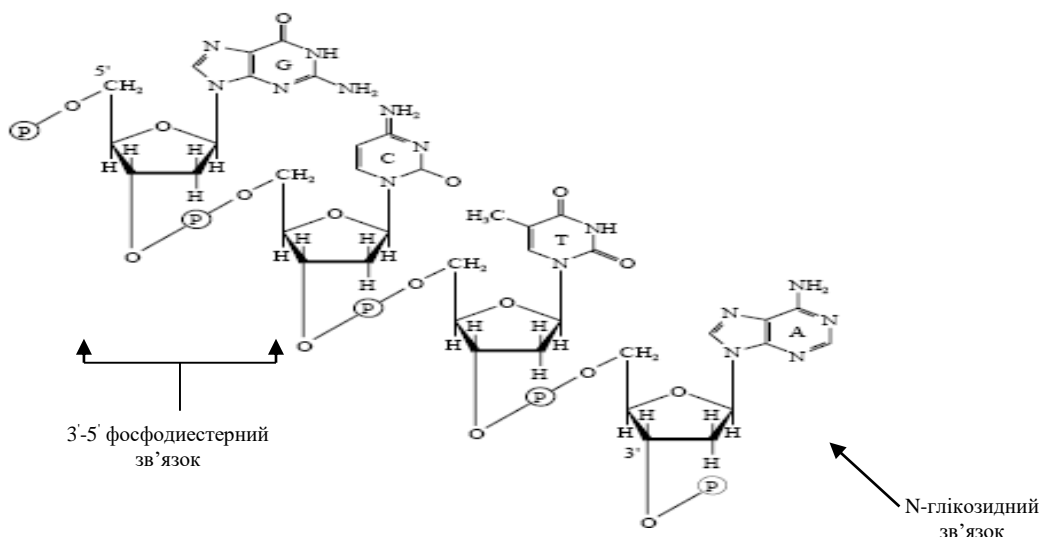


Рис. 16. Первинна структура ДНК

Вторинна структура ДНК

Два полінуклеотидних ланцюги мають антипаралельну структуру (в одному ланцюгу фосфодіестерні зв'язки направлені 3'→5', а в іншому 5'→3' напрямку), спіралізовані.

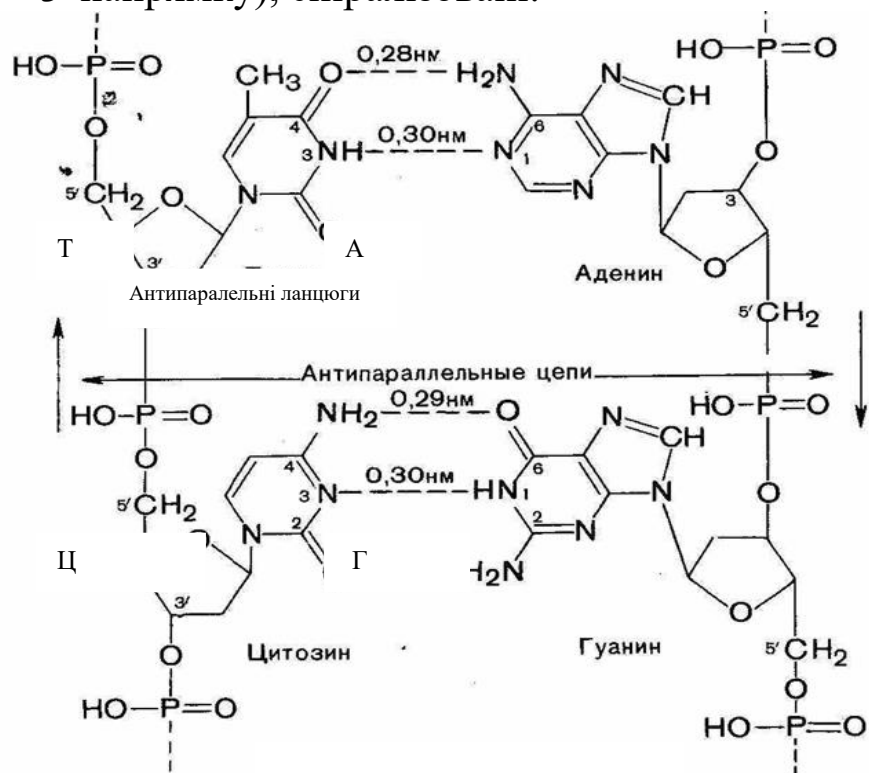


Рис. 17. Вторинна структура ДНК

Горизонтальне зображення ДНК: (5') – АТТГАЦАГГЦ -- (3')
(3') -- ТААЦТГТЦЦГ-- (5')

Під третинною структурою розуміють загальну форму молекул. ДНК може бути лінійної чи кільцевої форми.

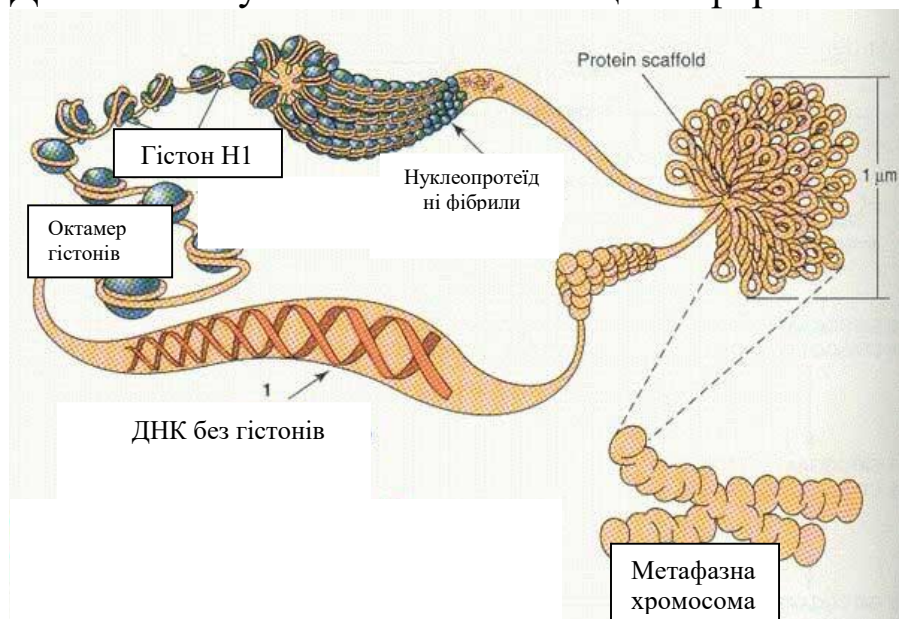


Рис. 18. Загальна схема упакування молекули ДНК у хромосому.

Молекули ДНК дуже довгі, вони упаковуються за допомогою гістонів у спіралізовану спіраль значно меншої довжини, щоб майже двометрова ДНК помістилась у клітину.

Біологічна інформація записана у генах таким чином, що здатна безпомилково копіюватись і передаватись успадок. Як ми розглянули, генетична інформація записана на двох комплементарних, ідентичних ланцюгах ДНК. Кожен з ланцюгів може бути комплементарно досинтезований ДНК-залежною-ДНК-полімеразою у результаті реплікації (подвоєння ДНК), що призводить до подвоєння генетичної інформації і можливості її розподілу по обох дочірних клітинах перед їх діленням. Таким чином, відбувається передавання генетичної інформації від клітини до клітини.

У реалізації генетичної інформації беруть участь РНК: рибосомальні РНК (рРНК), транспортні РНК (тРНК), інформаційні РНК (іРНК).

ДНК знаходиться у ядрі, а синтез протеїнів, інформація про які закодована на ній, відбувається у цитоплазмі. Для того, щоб синтез протеїнів відбувся, генетична інформація переписується на мобільну іРНК – процес називається транскрипцією. іРНК через ядерні пори переходить у цитоплазму і входить до трансляційного комплексу. Під час трансляції – переклад послідовностей нуклеотидів у послідовність амінокислот – відбувається декодування генетичної інформації, у якій беруть участь рибосоми та тРНК. Отже, ми прослідкували як послідовність нуклеотидів гена визначає послідовність амінокислот протеїнів.



Рис. 19. Центральна догма молекулярної біології

Правило перекладу послідовності триплету нуклеотидів у послідовність амінокислот називають *генетичним кодом*. Генетичний код і механізми реплікації та реалізації генетичної інформації є універсальними для усіх живих організмів.

Послідовність реалізації генетичної інформації

Змістовий ланцюг ДНК (5') –ТТЦ-АГТ-ЦАГ-ГАЦ-ГАТ-АЦГ – (3')
 Матричний ланцюг ДНК (3') –ААГ-ТЦА-ГТЦ-ЦТГ-ЦТА-ТГЦ – (5')



Транскрипція

Матрична РНК (мРНК) (5') –УУЦ-АГУ-ЦАГ-ГАЦ-ГАУ-АЦГ – (3')



Трансляція

Пептидний ланцюг протеїна (NH₂) - фен – сер – глі – асп – асп – тре -(COOH)

Усі клітини одного організму походять від одної – зиготи. Отже, кожна з них містить однаковий набір генів, забезпечений механізмами реплікації. Клітини живих організмів володіють здатністю синтезувати величезну кількість різноманітних протеїнів. Проте вони ніколи не синтезують усі протеїни одночасно. Кількість і спектр синтезованих протеїнів визначаються їх потребою у даний час і спеціалізацією клітини або експресією генів – активністю певних генів у даний час.

Для збереження і відтворення генетичної інформації, закодованої в структурі генів, необхідна наявність специфічних регуляторних ділянок (промоторів, генів-операторів, сайленсерів, енхансерів), які забезпечують ефективність та швидкість цих процесів. Ці регуляторні ділянки (регуляторні гени) - це теж гени, але вони не несуть інформації про протеїн. Вони регулюють зчитування генетичної інформації з тих генів (структурних генів), у яких закодована інформація про протеїн.

Отже, геном – це сукупність усіх генів, його складають структурні та регуляторні гени.

Структурні гени визначають амінокислотну послідовність протеїнів. РНК-кодуючі і протеїн-кодуючі гени транскрибуються і часто об'єднуються під назвою структурних генів.

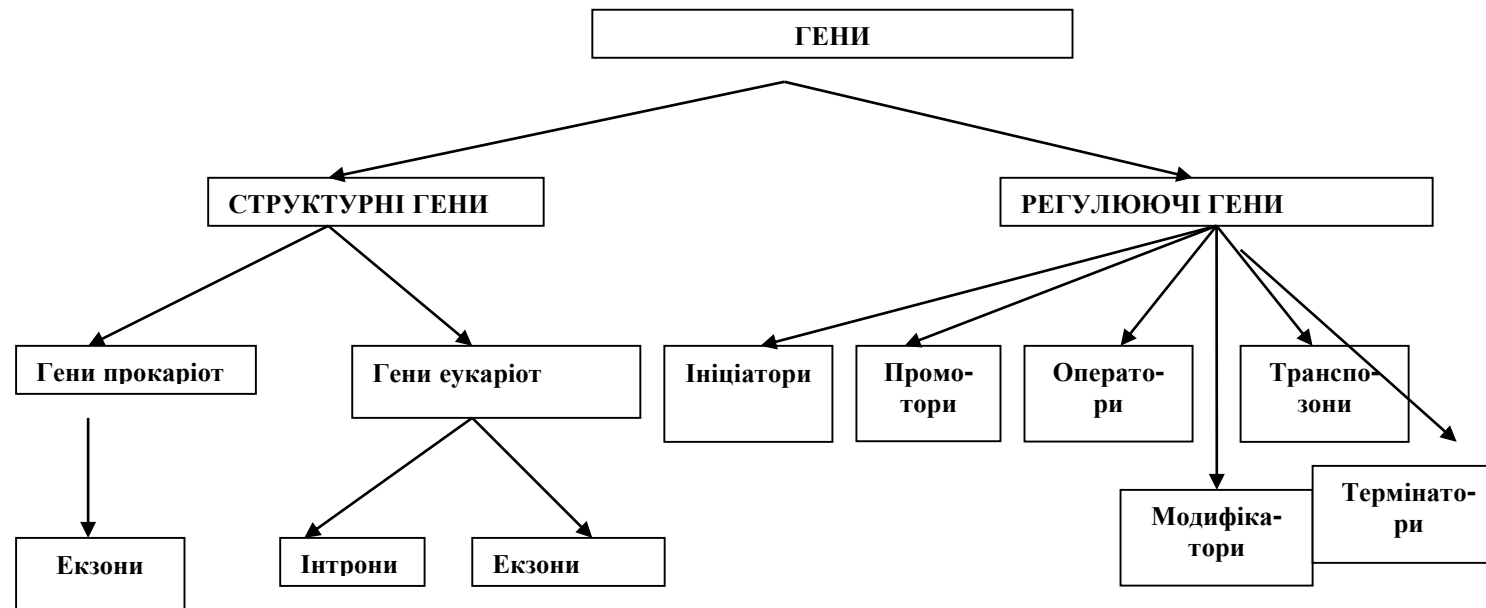
Регулюючі гени контролюють транскрипцію.

До регуляторної частини відносяться:

- **промотори** (ділянки гена, до яких приєднується РНК-полімераза для початку процесу транскрипції; розташовані на початку гена – 5'-кінці);

- **енхансери** (ділянки ДНК, які посилюють процес транскрипції з найближчого до них промотора). Підвищують активність тільки певних генів, можуть розташовуватись далеко від гена, який регулюють;

Класифікація генів

В хромосомах людини

- **сайленсери** (ділянки ДНК, які пригнічують процес транскрипції з найближчого до них промотора);
- **оператор** – ділянка ДНК, з якою зв'язується протеїн-репресор, в результаті чого блокується транскрипція;
- **атенуатор** – специфічна регуляторна ділянка ДНК, що забезпечує механізми регуляції оперонів, які здійснюють синтез іРНК, локалізується безпосередньо перед структурними генами і може виконувати роль термінатора синтезу іРНК;
- **інтрони** (некодуючі послідовності нуклеотидів; ділянки ДНК, які розташовані між екзонами).
- **термінатор** (ділянка ДНК, яка термінує процес транскрипції; розташована на 3'-кінці гену).

До **структурної частини** відносяться:

- **екзони** (кодуючі послідовності нуклеотидів).

Теорія Жакоба-Моно розглядає яким чином частина генів експресується і з них зчитується генетична інформація, тобто вони є «ввімкненими», в той час коли інша частина генів не експресується, «вимкнена». Ця теорія, доведена в досліджах на бактеріях, отримала широке визнання.

Відповідно до теорії F.Jacob і J.Monod в біосинтезі протеїнів у бактерій беруть участь принаймні чотири типи генів: структурні гени, ген-промотор, ген-оператор і ген-регулятор. Нагадаємо, що структурні гени визначають первинну структуру протеїнів, що синтезуються. Саме ці гени в ланцюзі ДНК є основою для біосинтезу іРНК, яка потім надходить на рибосому і, як було вказано вище, служить матрицею для біосинтезу протеїнів.

Існує поняття «оперон». **Оперон** – ділянка ДНК, яка включає регуляторні та структурні гени.

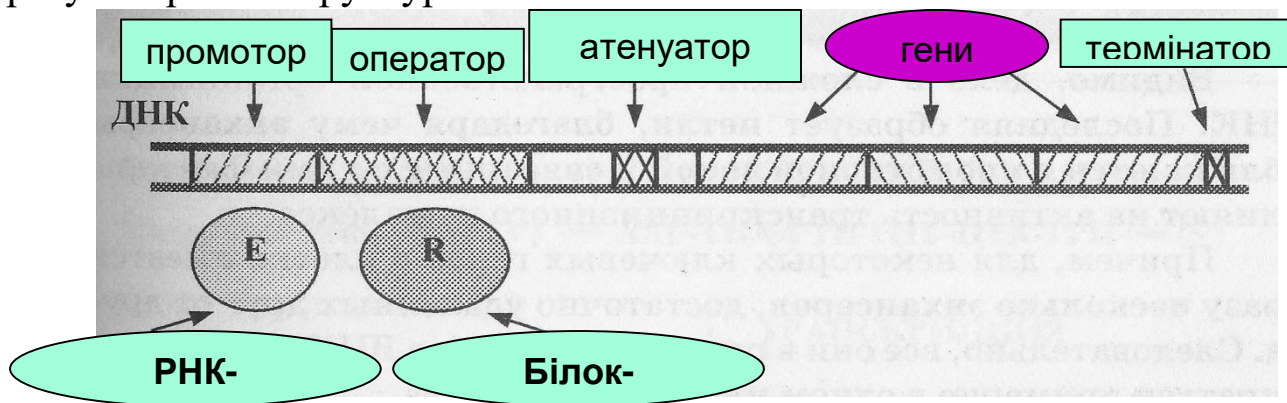


Рис. 20. Будова оперона

У зчитуванні генетичної інформації з ДНК бере участь ДНК-залежна-РНК-полімераза (РНК-полімераза). Це основний ензим транскрипції. Зчитування генетичного коду, тобто синтез іРНК, починається з того, що з промотором взаємодіє РНК-полімераза, і далі рухається послідовно уздовж оператора, атенуатора і структурних генів до термінатора. Зі структурних генів синтезуватиметься іРНК.

Діяльність оперона перебуває під контролюючим впливом іншої ділянки ланцюга ДНК – гена-регулятора. Ген-регулятор може знаходитись далеко відносно оперона і відповідати за синтез протеїна-репресора. Репресор має спорідненість з геном-оператором і, відповідно, здатний взаємодіяти з ним. Утворення такого комплексу призводить до блокування синтезу іРНК, оскільки заблокує рух РНК-полімерази через ген-оператор.

Якщо ж РНК-полімераза пройшла ділянку оператор, наступно може бути заблокованим її проходження на ділянці атенуатор. Атенуатор може виконувати роль термінатора. У такому випадку РНК-полімераза «сходить» з ДНК, транскрипція не відбувається. Якщо ж РНК-полімераза пройшла ділянку атенуатор, транскрибуються структурні гени. У результаті синтезується іРНК. На термінаторі РНК-полімераза пізнає стоп-кодон і сходить з ДНК.

Таким чином, на молекулярному рівні відбувається регуляція синтезу певної речовини. Припустимо, якщо у клітині синтез речовини не потрібен, у ній синтезується протеїн-репресор, який блокує активність РНК-полімерази та процеси синтезу протеїнів загалом. Якщо ж ситуація в клітині змінилась у сторону потреби речовини, синтез протеїна-репресора припиняється.

Володіючи знаннями про такі принципи регуляції зчитування генетичної інформації, людина навчилась використовувати її з метою створення організмів надпродуцентів речовин, лікувати захворювання, тощо.

Основи генетичної інженерії.

Генетична інженерія – галузь молекулярної генетики, яка досліджує способи та шляхи створення *in vitro* генетичних структур та спадково змінених організмів. Особливістю генетичної інженерії є маніпулювання матеріальними носіями генетичної інформації – молекулами ДНК та РНК. Штучні носії генетичної інформації, сконструйовані генними інженерами, називають **рекомбінантними** (гібридними, химерними) молекулами ДНК. Методи генетичної інженерії дають можливість виділяти окремі гени як фрагменти ДНК і

отримувати багато копій цих молекул. Тому генетичну інженерію часто називають молекулярним клонуванням генів. Крім маніпулювання окремими генами, предметом цієї науки є такі штучні способи генетичного обміну, як злиття соматичних клітин або протопластів, перенесення генів за допомогою фрагментів клітин – органел, які містять ДНК (мітохондрій, пластид), ядер, окремих хромосом тощо.

Молекулярні біологи розробили принципово нові технології, засновані на відкриттях біохімії і молекулярної генетики. Це надало величезні можливості маніпулювання генетичним матеріалом. Нові підходи і методи отримали назву «Технології рекомбінантних ДНК».

Технологія рекомбінантних ДНК – це сукупність експериментальних процедур, що дають можливість здійснювати перенесення генетичного матеріалу, як правило ДНК, з одного організму в інший.

Основні продукти, які отримують за допомогою генетичної інженерії

У ветеринарії, медицині та с/г	У харчовій промисловості
Амінокислоти; Антибіотики; Вітаміни; Гормони (інсулін, соматотропін); Вакцини; Ферментні препарати; Компоненти крові; Діагностичні препарати; Протипухлинні агенти; Біологічні засоби захисту рослин; Інсектициди; Кормовий протеїн; Модифіковані рослини, тварини, які краще пристосовані до умов середовища.	Ензими; Амінокислоти; Вітаміни; Бактеріоцини; Ароматизатори; Сировина для харчової промисловості (рослини, тварини з кращими харчовими властивостями); Харчовий мікробний протеїн; Зміна якості продукції внаслідок втручання у генетичний апарат мікроорганізмів, які беруть участь у технології її одержання, для покращення дієтичних, смакових і харчових властивостей.

У природі перенесення генетичної інформації між організмами здійснюється шляхом трансформації, кон'югації або трансдукції.

Трансформація – процес захоплення бактеріальною клітиною вільної молекули ДНК із середовища і вбудовування її у свій геном. Встановлено, що до трансформації здатні лише деякі, так звані «компетентні» клітини. **Плазмід** – кільцеві дволанцюгові молекули ДНК, які складаються з декількох тисяч пар нуклеотидів здатні до автономної реплікації. **Кон'югація** – один із способів обміну генетичним матеріалом, при якому відбувається однонаправлене перенесення генетичної інформації від донора до реципієнта. Цей процес перебуває під контролем особливих кон'югативних плазмід, а перенесення інформації від донорної клітини до реципієнтної здійснюється через спеціальні статеві ворсинки (пілі).

Процес перенесення генетичного матеріалу за допомогою вірусів від клітини-донора до клітини-реципієнта називається **трансдукцією**. Людина використала ці принципи природи для керованого обміну генетичною інформацією між організмами.

У результаті вбудовування у геном раніше відсутнього гена можна змусити клітину синтезувати протеїни, які вона не синтезувала, такі протеїни називають **рекомбінантними**.

Процес одержання рекомбінантних ДНК та модифікованих мікроорганізмів складається з декількох етапів:

1. Визначення локалізації потрібного гена.

2. **Рестрикція** – розрізування ДНК на фрагменти за допомогою ензимів рестриктаз і одержання окремого гена.

3. **Створення рекомбінантної ДНК**. Ген «вшивають» у вектор за допомогою ензимів лігаз. **Вектор** – спеціальна генетична конструкція, у складі якої вирізаний ген буде внесений в геном іншої клітини. Вектор повинен містити регуляторні гени – промотор, термінатор, оператор.

4. **Трансформація** – введення рекомбінантних плазмід у бактеріальні клітини. Кожна з трансформованих бактерій розмножується й утворює колонію з багатьох тисяч нащадків – клон.

5. **Скринінг** – відбір серед клонів трансформованих бактерій таких, які містять потрібний ген.

Лабораторна робота №6

Тема: Виділення дезоксирибонуклеопротейну з селезінки тварин

Мета роботи: освоєння методу виділення дезоксирибонуклеопротейну з селезінки тварин

Завдання:

1. Виділити дезоксирибонуклеопротейн із селезінки тварин.
2. Якісно довести наявність у пробірці дезоксирибонуклеопротейну.
3. У висновку занотувати результат проведеної роботи.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Ступка, хімічна склянка, центрифужні – 4 шт., пробірки, центрифуга, водяна баня, пісок, дерев'яна паличка;
1М NaCl;
1н HCl;
дистильована вода;
0,4% NaOH;
дифеніламіновий реактив.

Характерною особливістю нуклеопротейнів є збільшення їх в'язкості у концентрованих розчинах NaCl. При осадженні із сольових розчинів нуклеопротейни випадають в осад у вигляді ниток. Дезоксирибонуклеопротейни від рибонуклеопротейнів відрізняють кольоровою реакцією. Так, ДНК з дифеніламіном надає розчину синього забарвлення, а РНК – зеленого.

Хід роботи

1. У ступці розітріть 2-3 г селезінки з невеликою кількістю піску;
2. Внесіть 70-80 мл 1М розчину NaCl, добре розітріть 10-15 хв.;
3. Одержаний в'язкий розчин внесіть у центрифужні пробірки, центрифугуйте 15 хв.;
4. У хімічну склянку внесіть шестикратний об'єм (відносно центрифугату) води, підкисленої 1н HCl, внесіть центрифугат. Утворені нитки нуклеопротейну намотайте на дерев'яну паличку і невелику їх кількість перенесіть у іншу пробірку для виконання кольорової реакції на дезоксирибозу.

5. Для розчинення дезоксирибонуклеопротеїну у пробірку внесіть 1 мл 0,4% NaOH, перемішайте;
6. У розчин внесіть 1 мл дифеніламінового реактиву (до повного розчинення осаду), витримайте у киплячій водянй бані 15-20 хв. Спостерігайте появу синього забарвлення.

Висновки:

Питання для самоконтролю:

1. ДНК – носій генетичної інформації.
2. Які нуклеїнові кислоти Вам відомі, їх функція?
3. Етапи реалізації генетичної інформації.
4. Основний ензим транскрипції.
5. Що таке генетичний код?
6. Суть генетичної інженерії.
7. Які продукти для харчової промисловості отримують за допомогою генетичної інженерії?
8. Як регулюється зчитування генетичної інформації?
9. Що таке оперон?
10. Гени-регулятори та структурні гени.
11. Що називають рекомбінантною ДНК?
12. Етапи одержання організмів зі зміненою генетичною інформацією.

ТЕМА 6: ОДЕРЖАННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГМО

1. Біотехнологія створення ГМ-сої.

У створенні нових сортів рослин усе більшого значення набуває прямий генетичний вплив на рослинний організм. У результаті такого втручання отримуємо трансгенний організм, геном якого містить чужорідний генетичний матеріал.

Для того, щоб ген після клонування експресувався, у клітині синтезувався відповідний протеїн, необхідно створити генетичну конструкцію з регулюючими елементами (рис. 21).

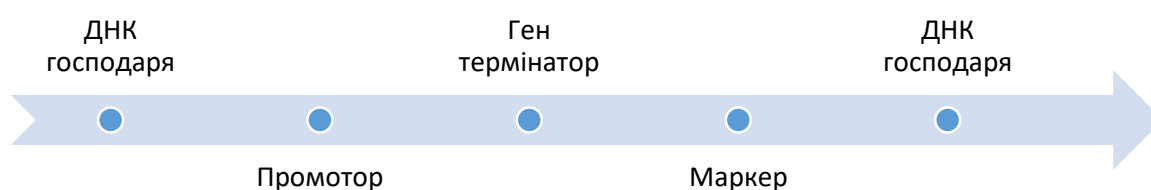


Рис. 21. Генетична конструкція ГМО (касета експресії)

Ця генетична конструкція повинна містити вклований промотор (найпоширенішим промотором ГМ-сої є *35S CaMV*), термінатор (найпоширеніші термінатори: *NOS*, *E9*). Ключовим елементом генетичної конструкції є відповідний ген, який відповідає за бажані ознаки. У більшості випадків в ГМО вмонтовують такі гени: *epsps*, *cry*, *bar*, *pat* – гени стійкості до гербіцидів, *CP4EPSPS* – ген стійкості до гліфосату, *bar* – ген стійкості до фосфінотрицину, *cry* – гени стійкості до комах-шкідників. Генетична конструкція також обов'язково повинна містити маркерні гени – такі, як наприклад, *npt*, *npt II*, які дають змогу відрізнити у процесі створення генетично модифіковані організми від немодифікованих. У результаті комбінування різних елементів генетичної конструкції науковці отримують велику кількість ліній ГМО.

Основні етапи створення ГМ-сої :

1. Одержання цільових генів (гени стійкості до гербіцидів, гліфосату, комах, тощо).
2. Конструювання вектора, що несе цільовий ген.
3. Трансформація рослинних клітин.
4. Регенерація рослинних клітин із трансформованої клітини.
5. Детектування трансформованих рослин серед регенерантів.

Одержання цільових генів. На першому етапі необхідно отримати ген, яким буде трансформовано рослину.

Якщо відома нуклеотидна послідовність ДНК, здійснено картування генів організму донора, то потрібний ген рестрикується із ДНК донора. Іншим способом отримання цільового гена є хімічний або ферментативний синтез потрібного фрагменту ДНК.

Регулюючі елементи гена: промотор – ділянка молекули ДНК, з якою зв'язується РНК-полімераза; термінатор – ділянка молекули ДНК, що визначає закінчення синтезу молекули іРНК.

Найчастіше використовують сильний промотор 35S вірусу мозаїки цвітної капусти. Він відноситься до конститутивних промоторів, тобто такий, що працює упродовж усього життя рослини. Іноді потрібні специфічні промотори – такі, які активні в окремих клітинах, тканинах, органах або лише на певних стадіях життя рослин. Залежно від того, який ген повинен бути перенесений у рослину та у який період він повинен експресуватися.

Конструювання вектора. Касета експресії самовільно не може потрапити до клітини-реципієнта та інтегруватися в хромосому рослини. Для цього потрібен вектор – спеціальна молекула ДНК, яка може проникати до клітин рослини та самореплікуватись або вбудовуватись у ДНК та реплікуватись разом із нею.

Як вектор зазвичай використовують бактеріофаг, також плазміди бактерій. Саме плазміди частіше використовують для трансформації рослин. Перші спроби створення таких векторних систем базувалися на використанні Tі-плазміди ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens* – фітопатоген, який інфікує клітину рослин, що призводить до утворення пухлини корончастого гала, який порушує нормальний ріст рослини.

Трансформація рослинних клітин. Для трансформації рослинних клітин була розроблена низка методів: використання Tі-плазмід, бомбардування мікрочастинками, використання векторів на основі вірусів, мікроін'єкції, електропорація та інші.

Такими способами були трансформовані більш 50-ти різних видів рослин. Проте, для виробництва трансгенних культур у промислових масштабах в основному застосовують агробактеріальний (за допомогою Tі-плазмід) і балістичний (бомбардування мікрочастинками) способи модифікації рослинного геному. Один із способів трансформації – це трансформація калюсу, з якого отримують масу модифікованих рослин-регенерантів.

Селекція трансформованих рослин. Трансформовані тим або іншим способом рослинні клітини культивують в умовах *in vitro* на спеціальних середовищах, що сприяють регенерації з рослин. Таким

чином, з однієї трансформованої клітини можна виростити повноцінну фертильну рослину, усі клітини якої несуть чужорідну ДНК.

Культивування регенерантів включає кілька серій пасажів на селективних середовищах, що містять антибіотик або гербіцид, завдяки чому клітини, у яких немає маркерного гена стійкості (тобто немає й чужорідної ДНК) – гинуть.

Надалі за допомогою певних маніпуляцій домагаються елімінації маркерних генів із геномів рослин-регенерантів, оскільки присутність цих генів у сировині для харчової промисловості небажана.

Відібрані регенеранти використовують для аналізу геномної ДНК, який дозволяє визначити присутність цільового гена й число його копій, інтегрованих у геном.

Заключний етап лабораторного тестування трансгенних рослин складає біологічні дослідження, що визначають стабільність прояву цільової ознаки.

Таким чином, з використанням описаних вище технологій до теперішнього часу створені й випробувані в польових умовах ГМ-форми багатьох сільськогосподарських рослин. Так, отримана значна кількість ГМ-форм томатів, сої, бавовника, гарбузових, а також пшениці, рису, соняшника, яблунь і ін. Проте зареєстрована й допущена до промислового виробництва лише незначна кількість ГМ-рослин. Це пов'язано з тим, що перш ніж потрапити на ринок, продукція, що містить ГМ-компоненти, повинна пройти експертизу якості й безпеки.

2. Ідентифікація ГМО. Принцип методу ПЛР в реальному часі.

Основним методом, що використовується для детекції ГМО є метод полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ), оскільки він дозволяє не тільки виявити наявність ГМ ДНК в зразку, але і визначити кількість цієї ДНК.

В основі ПЛР лежить природна здатність термофільного ензиму ДНК-залежної *Taq*-ДНК полімерази (*Taq*-полімераза) здійснювати копіювання одного з ланцюгів ДНК, стартуючи з праймера, комплементарної іншому ланцюгу. Необхідними компонентами реакційної суміші є *Taq*-полімераза; праймери – короткі синтетичні олігонуклеотиди, які завдяки своїй комплементарності до одного з ланцюгів дволанцюгової матриці ДНК, виділяють початок і кінець ділянки, що ампліфікується – амплікон); суміш чотирьох дезоксинуклеозидтрифосфатів («будівельні» блоки для побудови амплікона); буфер, що містить йони Магнію (11).

Протіканню ПЛР сприяє швидка і точна циклічна зміна температури реакційної суміші. Таким чином, упродовж 1-2 годин вдається експоненціально збільшити кількість вихідної нуклеїнової кислоти – мішені та з однієї молекули ДНК отримати до декількох десятків мільярдів копій її фрагменту.

Загалом типова ПЛР-ампліфікація складається з трьох етапів: денатурації, ренатурації і синтезу. Денатурація є першим етапом ПЛР і проводиться витримуванням взірця ДНК при температурі 95°C упродовж щонайменше однієї хвилини, молекула плавиться з утворенням двох поокремих ланцюгів. Під час ренатурації температура суміші повільно знижується до 55 °C, і праймери з'єднуються з комплементарними ділянками ДНК. Завершальним етапом є синтез, при проведенні якого температуру підвищують до величини, оптимальної для дії ензиму *Taq*-полімераза 75 °C. Починається синтез ДНК, ініційований праймером.

Суть процесу ампліфікації специфічних фрагментів у повторюваних циклах температурної денатурації ДНК, відпалу праймерів з комплементарними послідовностями і наступній добудові полінуклеотидних ланцюгів з цих праймерів ДНК-полімеразою з детекцією результатів у режимі реального часу.

Реакція дозволяє виявити термінатор *nos*, промотор *35S CaMV*. Виявлення цих регулюючих послідовностей дозволяє виявити близько 90% ГМ-рослин.

Проведення ПЛР у реальному часі здійснюється за допомогою аналізатора нуклеїнових кислот (АНК). Метод ПЛР у реальному часі заснований на детектуванні сигналу флуоресценції, що дає змогу спостерігати процес накопичення продуктів у ході реакції. Сигнал флуоресценції зростає пропорційно збільшенню кількості продукту ампліфікації у досліджуваному зразку (рис. 9).

При додаванні в реакційну суміш молекул флуоресцентного барвника, що володіє здатністю при зв'язуванні з ДНК багаторазово збільшувати сигнал флуоресценції, збільшення числа копій амплікона в ході ПЛР буде пропорційною сигналу флуоресценції, як це зображено на рис. 9. Прикладом такого з'єднання є барвник *SyberGreen I*.

Програма дає змогу контролювати хід реакції у всіх пробірках одночасно. Після отримання достатніх даних виводяться реальні графіки інтенсивності флуоресценції усіх пробірок.

Ефективність методу ПЛР, як і інших методів аналізу ДНК, залежить від якості і чистоти виділеної ДНК. Якість ДНК визначається

довжиною фрагментів і ступенем їх пошкодження під дією тепла, кислот та інших речовин, що викликають гідроліз чи ферментативну деградацію.

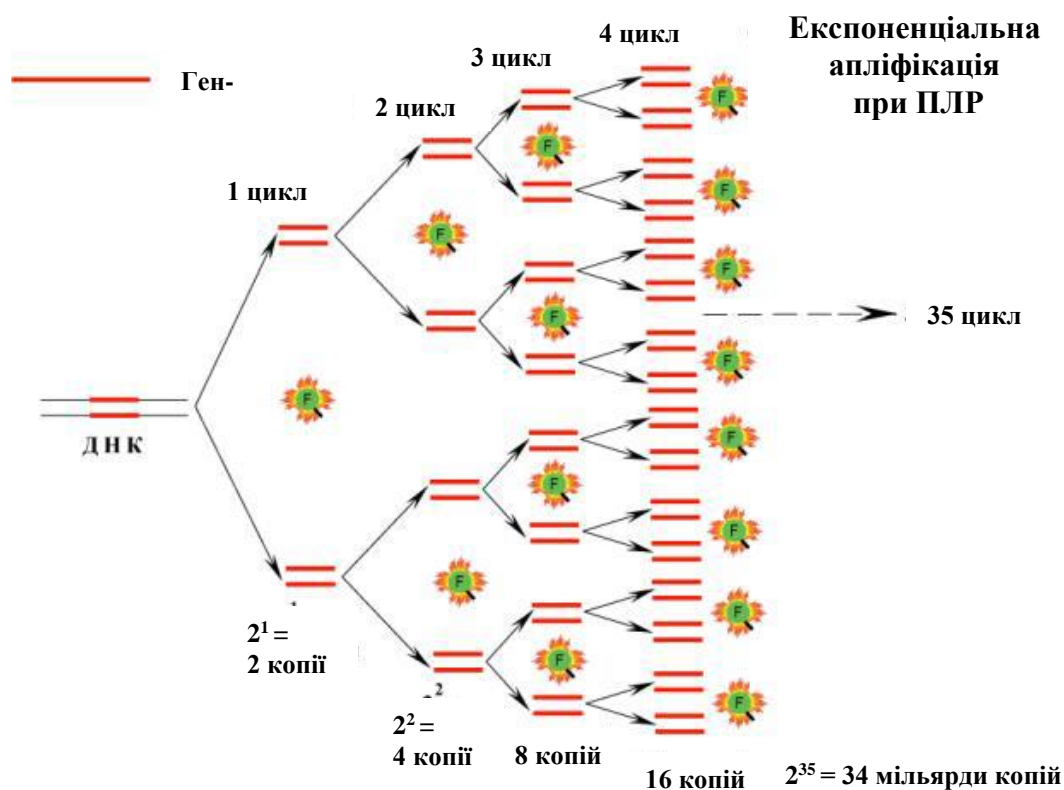


Рис. 9. Схема накопичення сигналу флуоресценції при ПЛР-РЧ

Основними перевагами методу ПЛР-РЧ в діагностиці ГМО є висока специфічність і чутливість, швидкість отримання результату, ідентифікація ліній ГМО, кількісний аналіз, простота і гнучкість (можливість створення нових комбінацій маркерів). Можливість мультиплексного (крім широко використовуваного моноплексного) аналізу зразків, що дозволяє детектувати кілька мішеней в одній пробірці реакції.

Лабораторна робота №7

Тема: Ідентифікація ГМ-сої методом ПЛР

Мета роботи: ідентифікувати у досліджуваному зразку ДНК ГМ-сої.

Завдання:

1. Виділення ДНК зі зразків насіння сої;
2. Проведення ПЛР-аналізу.

Структура ПЛР-лабораторії

Основною умовою успішної роботи ПЛР-лабораторії є відсутність контамінації обладнання, поверхонь і реактивів молекулами ДНК. У приміщенні, де працюють з ДНК або РНК, фрагменти молекул даних кислот можуть знаходитися у повітрі у вигляді аерозолів, а також на поверхнях столів, приборів. Потрапляння ДНК-мішені або ампліконів у реактиви призводить до хибно-позитивних результатів ПЛР.

Через загрозу контамінації ПЛР-лабораторію поділяють на три блоки – пре-ПЛР блок, ПЛР-блок і пост-ПЛР блок. Ці три приміщення забезпечені УФ-лампами.

У пре-ПЛР блоці здійснюють пробопідготовку зразків. У даному приміщенні знаходяться ламінарні бокси для розливання реактивів і виділення ДНК. У пре-ПЛР блоці також знаходиться холодильник для збереження реактивів. Це, так звана, «чиста» зона ПЛР-лабораторії. У «чистій» зоні працюють в окремих халатах, які перевдягають у передбокснику, у змінному взутті, гумових рукавичках, які не виносять у інші зони ПЛР-лабораторії. У ПЛР-блоці знаходиться ампліфікатор. Пост-ПЛР блок – це приміщення для проведення електрофорезу. Це, так звана, «забруднена зона» лабораторії. ДНК, яка ампліфікується під час ПЛР у великій кількості, знаходиться у буфері для електрофорезу, на наконечниках, на внутрішній поверхні кришечок епендорфів, на дозаторах, на одязі співробітника тощо. Необхідним перед роботою у пост-ПЛР блоці є перевдягання халату і взуття, зміна гумових рукавичок.

Правила роботи та техніка безпеки у ПЛР-лабораторії.

Усі етапи ПЛР у лабораторії повинні проводитися у одному напрямку: від «чистої» зони до «забрудненої». Ні в якому разі не можна переносити обладнання або предмети із «забрудненої» зони у «чисту». Якщо на різних етапах проведення ПЛР використовуються

одні й ті ж реактиви, необхідно, щоб у окремих блоках знаходилися різні упаковки, які б не виносилися за межі блоків лабораторії.

Багато, щоб на етапах підготування зразків і на етапі електрофорезу працювали різні співробітники.

Стерильності необхідно дотримуватися лише на етапі роботи з дослідним матеріалом та з культурою мікроорганізмів. Реактиви для проведення ПЛР не є стерильними, однак під час роботи з ними слід бути дуже уважним, щоб не допустити потрапляння у пробірки з реактивами пилу, тальку з гумових рукавичок, зайвих речовин (кожен раз при роботі з дозатором потрібно користуватися новим наконечником, який ще не був у використанні), ДНК та РНК мікроорганізмів. Щоб уникнути цього, епендорфи з реактивами для ПЛР відкривають на якомога менший термін у стерильному боксі. Реактиви зберігають за 18-20°C у холодильнику, а перед роботою залишають розтопитись на льоді за кімнатної температури. Працюють з такими реактивами якомога швидше і одразу ж після роботи переносять у холодильник.

На етапі аналізу продуктів ПЛР важливими є правила безпеки роботи з бромистим етидієм, який використовується як барвник для нуклеїнових кислот. Необхідно уникати потрапляння бромистого етидію у розчині або порошку у дихальні шляхи, на шкіру і слизові оболонки. Бромистий етидій – канцероген.

Матеріали та обладнання

Для проведення ПЛР-аналізу необхідні наступні матеріали і устаткування:

ЗОНА 1(пре-ПЛР, 1 етап) – виділення ДНК із досліджуваного матеріалу:

- настільний або стаціонарний бокс із бактерицидною лампою;
- термостат на 25-100°C;
- мікроцентрифуга до 2500-6000 g;
- центрифуга/вортекс;
- окремий набір автоматичних мікропіпеток перемінного об'єму;
- одноразові наконечники із аерозольним бар'єром;
- одноразові поліпропіленові пробірки типу "Eppendorf" об'ємом 0,5 і 1,5 см³.

ЗОНА 2(ПЛР блок 2 етап) – власне ПЛР (ампліфікація):

- програмований термостат (ампліфікатор, термоциклер);
- настільний бокс або окремий стіл із бактерицидною лампою;
- окремий набір автоматичних мікропіпеток змінного об'єму;

- одноразові наконечники;
- одноразові поліпропіленові пробірки типу “Eppendorf” об’ємом 0,2 або 0,5 см³;
- штативи для пробірок типу “Eppendorf” об’ємом, відповідно, 0,2 або 0,5 см³;
- термостат на 95°C;
- холодильник (2-8°C) або морозильник (- 20°C) для зразків ДНК.

Виділена нуклеїнова кислота має бути достатньо очищена від протеїнів та інгібіторів термостабільної ДНК-полімерази, і водночас, зберігати нативність. Виділення ДНК є першим етапом ПЛР.

Завдання 1. Виділення ДНК зі зразків насіння сої

Реактиви

Набір реактивів для виділення ДНК «Сорб-ГМО-А»

До складу набору входить:

Реактив 2 – лізуючий буфер;

Реактив 3 – протеїназа К;

Реактив 4 – буфер для сорбенту;

Реактив 5 – сорбент;

Реактив 6 – розчин для промивання А;

Реактив 7 – розчин для промивання Б;

Реактив 8 – ТЕ-буфер, складається з: буферної речовини Тріс та ЕДТА, для виділення ДНК.

Умови використання реактивів: якщо у реактивах 2, 4, 6 є осад, його потрібно прогріти за 60° С або витримати за кімнатної температури 15-30 хв та обов’язково перемішувати до повного розчинення осаду.

Хід роботи

Перед виділенням ДНК ГМ-сої відбувається процес пробопідготовки. Зробіть три послідовні помоли, відберіть наважку, зважте 50 мг зразку і помістіть у дві попередньо промарковані одноразові пластикові мікропробірки типу Еппендорф об’ємом 2,0 мл. Після закінчення етапу пробопідготовки проведіть виділення рослинної ДНК, яку потім передайте у закритих контейнерах у кімнату для проведення ампліфікації.

Виділення ДНК з рослинного матеріалу проведіть за наступним планом:

- 1) Перший етап виділення ДНК – лізис. Для цього подрібнені сухі зразки перенесіть в одноразові мікроцентрифужні пробірки об'ємом 2 мл. Додатково в кожній серії виділення підготуйте порожню пробірку для ОКО-В. Внесіть в кожен пробірку (включно з ОКО-В) по 800 мкл реактиву 2 (лізуючий буфер) – руйнуються мембрани клітин і клітинних ядер, щоб ДНК, протеїни, ліпіди і цукориди клітини вийшли в розчин; і 15 мкл реактиву 3 (Протеїнкіназа К) – деградуються протеїни, інактивуються ДНКазі.

Ретельно перемішайте на центрифугі-змішувачі кілька секунд.

Інкубуйте суміш 30 хв за температури 60°C, помішуючи кожні 5-10 хв, для руйнування клітинних стінок.

Охолодіть пробірки (1-2 хв) і центрифугуйте суміш 5 хв при 12-14 тис.об/хв, для кращого відділення ДНК.

- 2) Осадження ДНК: під час лізису і центрифугування приготуйте осаджувальний реактив. Для цього в нові пробірки об'ємом 2 мл, взяті в кількості, що дорівнюють кількості зразків для виділення, внесіть по 200 мкл реактиву 4 (буфер для сорбенту) – і по 40 мкл реактиву 5 (сорбент).

Після лізису і центрифугування верхню водяну фазу з кожної пробірки з пробою в об'ємі 300 мкл, акуратно, не зачіпаючи нижній шар, перенесіть окремими наконечниками з аерозольним бар'єром в пробірки з реактивом для осадження, щоб ДНК зв'язалась з сорбентом. Інтенсивно перемішайте на мікроцентрифугі-змішувачі до повного змішування. Інкубуйте за кімнатної температури 10 хвилин, періодично помішуючи.

Центрифугуйте пробірки з суспензією за 7 тис. об/хв. 1 хвилину, для осадження зв'язаної ДНК. Видаліть супернатант, використовуючи окремий наконечник для кожної проби.

- 3) Промивання ДНК: внесіть до осаду в кожен пробірку по 300 мкл реактиву 6 (розчин для промивання А), інтенсивно перемішайте до рівномірного ресуспендування сорбенту. Центрифугуйте пробірки з суспензією за 7 тис. об/хв 30 секунд, видаліть супернатант.

Внесіть до осаду в кожен пробу по 500 мкл реактиву 7 (розчин для промивання Б), повторіть центрифугування і знову внесіть таку ж кількість реактиву 7, центрифугування повторіть. Це необхідно для кращого очищення і концентрації ДНК на сорбенті.

- 4) Десорбція ДНК: помістіть пробірки з відкритими кришками в термостат за 60°C на 10-15 хв, до повного випаровування рідини.

До сухого осаду в пробірках внесіть по 200 мкл реактиву 8 (TE-буфер) – для елюції ДНК, сприяє довгому зберіганню ДНК в замороженому вигляді.

Перемішайте на мікроцентрифузі, та інкубуйте 5 хв за температури 60°C, перемішуючи кожні 2 хв. Після цього центрифугуйте пробірки з суспензією за 12-14 тис. об/хв 2 хвилини.

Акуратно, не захоплюючи сорбент, відберіть і перенесіть чисту надосадкову рідину в чисті пробірки.

Висновок

Завдання 2. Проведення ПЛР-аналізу

Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі – один з різновидів ПЛР, який використовується для одночасної ампліфікації і детекції отриманих продуктів. Детекція ампліфікованого фрагмента ДНК проводиться за кінцевою точкою (принцип, присутній, чи відсутній продукт).

Хід роботи

ПЛР-РЧ здійснюйте у ампліфікаторі АНК. Використовуйте набір реагентів. Набір реагентів «Соя\35S+FMV\NOS скринінг» дозволяє одночасно виявляти в одній реакційній суміші специфічні фрагменти регулюючих послідовностей ГМ-рослин термінатора *NOS* промоторів 35S CaMV і 35S FMVa також внутрішній позитивний контроль. Набір суміші для дослідження методом ПЛР містить 4 компоненти:

1. Реакційна суміш «Соя-35S-FMV-NOS-ВПК»
2. *SynTaq* ДНК-полімераза Т+, 5од/мкл.
3. Позитивний контрольний зразок, ПКО.
4. Негативний контрольний зразок, ОКО.

Набір розрахований на проведення 50 реакцій, включаючи контрольні зразки.

1. Для проведення ПЛР - РЧ спочатку розморозьте реакційну суміш «Соя-35S-FMV-NOS-ВПК». Витримайте 15 хв при кімнатній температурі, перемішайте на мікроцентрифузі-струшувачі і центрифугуйте декілька секунд для скидання крапель.

2. В окремій чистій пробірці змішайте $21 \cdot (N+2)$ мкл реакційної суміші «Соя-35S-FMV-NOS-ВПК» і $0,5 \cdot (N+2)$ мкл *Taq*-полімерази,

де N – кількість досліджуваних зразків, включно з ОКО-В, 2 – кількість контролей (ПКО, ОКО)

Негативні контролі виділення (ОКО-В) аналізуйте аналогічно до дослідних зразків.

Отриману суміш перемішайте на мікроцентрифузі-струшувачі і центрифугуйте декілька секунд. Внесіть по 20 мкл отриманої суміші в 0,2 мл пробірки.

3. Розморозьте ПКО, ОКО та дослідні зразки, перемішайте на мікроцентрифузі-струшувачі і центрифугуйте декілька секунд.

4. Внесіть в підготовані 0,2 мл пробірки по 5 мкл ОКО, дослідних зразків і в останню чергу ОКО, використовуючи наконечники з аерозольним бар'єром, щільно закрийте кришки і центрифугуйте для скидання крапель.

5. Помістіть пробірки до ампліфікатора в рекомендованому порядку:

1- ПКО

2- ОКО

3- Дослідний зразок 1

4- Дослідний зразок 2

Обробку даних здійснюйте відповідно до інструкції виробників приладів.

Висновок

Питання для самоконтролю:

1. Які елементи містить генетична конструція для ГМ-сої?
2. Етапи одержання ГМ-сої.
3. Промотор та термінатор ГМ-сої?
4. З якою метою модифікують сою?
5. Як одержати цільовий ген?
6. Для чого конструюють вектор?
7. Які є методи трансформації рослин?
8. Як відібрати рослини зі зміненою генетичною інформацією?
9. Для чого використовують ПЛР?

10. Суть ПЛР.
11. Склад реакційної суміші для ПЛР.
12. Що таке праймер?
13. Етапи ПЛР.
14. Які елементи ГМ-сої ідентифікують ПЛР?
15. Структура ПЛР-лабораторії та правила роботи у ній.

ТЕМА 7: БІОТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ РЕЧОВИН ДЛЯ ХАРЧОВОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ

Напрявлений синтез лимонної кислоти.

Лимонна кислота ($C_6H_8O_7$) – триосновна оксикислота, широко поширена в природі, відносно багато її міститься в деяких ягодах, фруктах, особливо в цитрусових (в лимоні 5-10%), в листках і стеблах деяких рослин.

В даний час лимонна кислота за обсягом виробництва є одним з головних продуктів мікробного синтезу, в світі її загально отримують до 400 тис. тонн на рік.

Для отримання лимонної кислоти використовують мікроскопічні гриби родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Ustina* та ін. В даний час основними продуцентами лимонної кислоти є різні штами гриба *Aspergillus niger*, які відрізняються великою швидкістю росту, легкістю культивування та високим виходом лимонної кислоти відносно маси цукориду, що окиснюється. Вони стійкі до зовнішніх впливів. Надсинтез лимонної кислоти відбувається при лімітуванні росту грибів-продуцентів мінеральними компонентами середовища і одночасному надмірним вмістом джерела Карбону. В умовах лімітування росту гриба нестачею Феруму і Марганцю після повного поглинання з середовища дефіцитного елемента він припиняє рости, проте продовжує використовувати наявні в середовищі джерела Карбону. При цьому в клітинах гриба починає накопичуватися лимонна кислота, яка в подальшому виділяється в середовище.

Лимонна кислота використовується в кондитерській промисловості для підкислення карамелі, пастили, вафель, позаяк вона добре підкреслює фруктовий смак. Дану органічну кислоту додають до морозива, харчових концентратів, маргарин, до деяких сортів ковбас і сиру.

Одержання молочної кислоти біотехнологічним способом.

Молочну кислоту з 1881 р. одержують промисловим способом за допомогою молочнокислих бактерій. Штами *Lactobacillus delbrueckii* (Дельбрюкк), *L. bulgaricus* не є вибагливими до складу живильного середовища і за короткий час синтезують багато молочної кислоти.

Молочнокислі бактерії переробляють на молочну кислоту різні цукориди, тому для промислового отримання цієї кислоти використовують мелясу, молочну сироватку, глюкозу, мальтозу, цукрозу, лактозу, оцукрений крохмаль та інше. В кожному випадку підбирають оптимального продуцента. Для зброджування глюкози або

мальтози зазвичай використовують штами *Lactobacillus delbrueckii*, *L. leichmannii* або *L. bulgaricus*. Для зброджування оцукреного крохмалю використовують суміш молочнокислих бактерій *L. delbrueckii* або з *L. bulgaricus*, або зі *Streptococcus lactis*. При зброджуванні мальтози вихід молочної кислоти є вищим за використання *L. bulgaricus* або *L. casei*.

Як основну сировину використовують мелясу, яку розводять водою до певної концентрації (12%), вносять вільні амінокислоти, вітамінів та інших біологічно активні речовини у складі кукурузного або дріжджового екстракту, або витяжки солодових паростків.

Одержання оцтової кислоти біотехнологічним способом.

Продуцентами оцтової кислоти є оцтовокислі бактерії роду *Acetobacter* (*Acetobacter curvum*). Ці бактерії ростуть за рН 4,0. Недоліком продуцента *Acetobacter curvum* є те, що він може втрачати властивість синтезувати оцтову кислоту, тому його постійно підтримують в середовищі з високою концентрацією спирту і оцтової кислоти і низькою концентрацією поживних речовин.

Оцтова кислота стала першим мікробіологічним продуктом, який отримано за допомогою іммобілізованих клітин. Цей спосіб може бути безперервним і періодичним. Упродовж тривалого часу застосовується адсорбція оцтовокислих бактерій на деревній стружці, деревному вугіллі, коксі та інших субстратах. Пропускаючи розчин етанолу через генератори з іммобілізованими бактеріями, отримують 10-15% -ний розчин оцтової кислоти.

Одержання та використання амінокислот.

При одержанні амінокислот можуть бути використані відходи м'ясопереробної промисловості (відходи обробки тваринної сировини, кров), ячний протеїн, казеїн молока, клейковина пшениці, соєвий шрот і т.д.

Хімічний синтез амінокислот досить ефективний, проте його недоліком є те, що у процесі синтезу утворюється суміш з біологічно активної L-форми і D-ізомери амінокислоти. D-форма є баластом, оскільки не засвоюється тваринами і людиною, а деякі D-форми амінокислот володіють токсичними властивостями.

У даний час велику частину амінокислот одержують за допомогою мікробного синтезу, причому мікроорганізми синтезують тільки L-форму. Це значно полегшує виділення і очищення амінокислот і дозволяє отримувати препарати з низькою собівартістю. Мікроорганізми, що синтезують амінокислоти, не накопичують їх у клітині, а постійно виділяють в живильне середовище. Тому амінокислоти виділяють з фільтрату культуральної рідини.

Глутамінова кислота – перша амінокислота, отримана мікробним синтезом. Глутамінова кислота належить до замінних кислот, володіє приємними органолептичними властивостями. Її продуцентами є бактерії, що відносяться до різних родів. У промисловому виробництві використовують бактерії *Corinebacterium glutamicum* і *Brevibacterium flavum* та інші. Умови надсинтезу глутамату Натрію наступні. Коли *Corinebacterium glutamicum* росте в середовищі з меншою, ніж оптимальна, концентрацією біотину (вітаміну Н), порушується синтез мембранних фосфоліпідів, в результаті чого глутамат Натрію проходить через мембрану і накопичується у культуральній рідині. Теж саме відбувається при додаванні в живильне середовище пеніциліну: цей антибіотик пригнічує синтез клітинної стінки і тим самим сприяє виділенню амінокислоти.

Лізін синтезують бактерії, актиноміцети, синьо-зелені водорості, деякі види мікроскопічних грибів. У нашій країні продуцентами лізину є бактерії *Corinebacterium* (*C. glutamicum*), *Micrococcus*, *Brevibacterium*. Живильним середовищем є м'яса або оцтова кислота.

Триптофан синтезують мікроорганізми бактерії та гриби: *Aerobacter*, *Bacillus*, *Escherichia* (*E. coli*), *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*), *Candida* та інші. Найбільш активні продуценти L-триптофану – представники роду *Micrococcus*, *Candida utilis*, *Bacillus subtilis*.

Амінокислоти, найчастіше лізін, використовують для збагачення кормів і харчових продуктів рослинного походження з метою підвищення їх харчової цінності і для збалансування їжі. Використання 1 т лізину в комбікормовій промисловості дозволяє економити 40-50 т фуражного зерна.

Глутамінова кислота і її натрієва сіль (глутамат натрію) є ефективним підсилювачем смаку м'ясних і овочевих страв. Дану амінокислоту використовують при консервуванні, заморожуванні і тривалому зберіганні. Зростає попит на гліцин і аланін, які також застосовують як приправи. Аспарагінова і глутамінова кислоти кислі на смак, в нейтральних розчинах мають дуже приємний оригінальний смак. Лізін, аланін, пролін, валін можуть знімати неприємні запахи і використовуються як дезодоранти харчових продуктів.

Для поліпшення органолептичних показників м'ясних продуктів, надання їм специфічного приємного смаку і аромату використовують цистин, лізін, гістидин. Цистеїн і цистин з глутамат натрію створюють імітацію запаху і смаку м'яса, що використовується при приготуванні приправ. Цистеїн, крім того, використовується для створення пористої

структури хліба.

Одержання ліпідів за допомогою мікроорганізмів.

Джерелом отримання ліпідів може бути біомаса дріжджів (в основному роду *Candida*), що накопичується при одержанні протеїнів, але містить підвищену кількість ліпідів, які екстрагують розчинниками.

При вирощуванні кормових дріжджів на середовищах з підвищеними концентраціями парафінів, на дизельному паливі в біомасі дріжджів накопичується значна кількість ліпідів, які є небажаним компонентом в готовому продукті, оскільки вони спричиняють його гіркоту при зберіганні. Тому ліпіди з кормових дріжджів екстрагують, відпрацьовані дріжджі висушують, а ліпіди звільняють від розчинника і переробляють.

В даний час значна кількість рослинних і тваринних ліпідів витрачається на технічні потреби. Заміна харчових ліпідів мікробними дає помітний економічний ефект.

Використання харчових добавок та інгредієнтів, одержаних біотехнологічним шляхом.

Підкислювачі.

Підкислювачі застосовують в основному як смакові добавки для надання продукту «гострого» смаку. Найпопулярніший підкислювач – лимонна кислота, яку отримують за участю *Aspergillus niger*, зброджуюючи мелясу і глюкозовмісні гідролізати. Її широко використовують у виробництві безалкогольних напоїв та кондитерських виробів. При консервуванні помідорів широко використовують яблучну кислоту, її утворює *A.flavus*. До числа інших кислот, що широко застосовуються в харчовій промисловості, відносяться оцтова, молочна, ітаконова глюконова, використовувана у формі глюконолактона (продуцент *A. niger*), і фумарова (продуцент мікроскопічний гриб роду *Rhizopus*).

Підсилювачі смаку.

Головним підсилювачем смаку вважається натрієва сіль глютамінової кислоти (глутамат натрію): її можна отримувати за допомогою *Micrococcus glutamicus*.

Барвники.

Як барвники і підсилювачі кольору використовують В₂ (рибофлавін), β-каротин, що забарвлюють харчові продукти в оранжево-жовті кольори. β-каротин застосовують при виготовленні ковбас з метою заміни нітриту натрію, кондитерських виробів, вершкового масла, макаронних виробів.

Згущувачі.

Ксантан був першим мікробним поліцукоридом, який почали виробляти в промисловому масштабі. Синтезується мікроорганізмами *Xanthomonas campestris* за культивування на глюкозі, цукрозі, крохмалі, барді. У поєднанні з рослинним поліцукоридом з насіння лжеакації водні розчини ксантану утворюють стабільні гелі, що використовується у виробництві кормів, наприклад, консервованих кормів для домашніх тварин.

Широко використовується в кондитерській промисловості при виробництві морозива як стабілізатор поліцукорид декстран (α -D-глюкан) з *Leuconostoc mesenteroides*.

Альгірати з рослинних джерел широко використовуються у харчовій промисловості як згущувачі або гелеутворюючі агенти. Їх застосовують для стабілізації йогурту, для запобігання утворенню кристалів льоду при отриманні морозива і т. д. Джерелом альгіратів є морські водорості (*Laminaria*), однак за своєю природою це джерело непостійне. В промисловому масштабі отримують альгірати, вирощуючи бактерії *Azotobacter* в умовах надлишку Карбону.

Одержання безлактозного молока.

У більшості ссавців активність лактази обмежена. Максимальна активність лактази у жінок складає 10-15% активності мальтази. Недостатня активність лактази може спричинювати серйозні проблеми у дітей. При годуванні грудних дітей, надходження в організм лактози може досягати 30-40 г/добу і перевищувати лактазну спроможність. Нерозщеплена лактоза недоступна для організму, водночас може підтримувати розвиток небажаної кишкової мікрофлори.

Багато людей, в основному африканського або азійського походження, володіють несприйнятністю до лактози, яка пов'язана з відсутністю лактази, що супроводжується шлунково-кишковими розладами після споживання молока. Оскільки ці люди харчуються молоком в значних кількостях у дитячому віці, то, можливо, розвиток несприйнятності до лактози настає не відразу після народження. Несприйнятність до лактози спостерігається також у дітей з генетичним дефектом лактази. У всіх випадках обмеження лактози в харчових раціонах є зручним і високоефективним способом попередження симптомів захворювання, що зумовлене несприйнятністю до лактози.

Молекули лактози при гідролізі або під дією ензиму лактази (галактозидази) розпадаються на глюкозу і галактозу. Молоко після такої переробки одержує нові дієтичні властивості.

Перший промисловий процес одержання безлактозного молока з використанням іммобілізованого ензиму лактази був здійснений в Мілані. Одержане дієтичне молоко дещо солодше порівнянно із звичайним, оскільки глюкоза солодша ніж лактоза. Однак це не заважає його споживанню. Стабільність іммобілізованого ензиму достатньо висока, і після 50-ти діб роботи він зберігає 80% початкової активності. Завод в Мілані дає 10 т безлактозного молока щодоби.

Одержання цукрів з молочної сироватки.

Молочна сироватка містить у своєму складі велику кількість лактози – біля 5% в рідкій і 75% у висушеній сироватці. Ферментативний гідроліз лактози в сироватці передбачає нові можливості одержання цукристих речовин із нетрадиційної сировини, вносить також певний вклад у вирішення проблем харчування і екології, оскільки сироватка утилізується не повністю.

Перший промисловий процес гідролізу лактози в молочній сироватці за допомогою іммобілізованого ензиму лактази був реалізований в 1980 р. спільно англійською, французькою і американськими компаніями одночасно в Англії і Франції.

Перед введенням в колонний реактор з іммобілізованим ензимом сироватку пастеризують, піддають ультрафільтрації і пропускають через йонообмінник, з метою її демінералізації. Потужність установки складає біля 1000 л при ступені конверсії лактози 80%. Установка повністю автоматизована. Одержані при цьому цукри (глюкоза і галактоза) за мірою солодкості в півтора рази перевищують солодкість харчового цукру в розрахунку на однакові економічні затрати. За даними Італійської компанії «Снам Проджетті», тривалість роботи іммобілізованого ензиму в реакторі з молочною сироваткою суттєво залежить від якості сироватки і часу інактивації ензиму, який змінюється від 60 (при обробці депротейнізованої і демінералізованої сироватки) до 8 діб (для необробленої кислої сироватки). У зв'язку з цим в промислових умовах щоденно по півгодини проводять очистку колон з іммобілізованою лактазою розведеною оцтовою кислотою. Час роботи системи в лабораторних умовах складає біля двох років.

Лабораторна робота №8

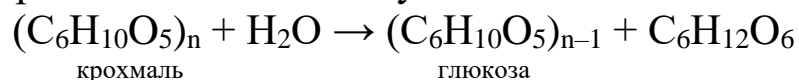
Тема: Імобілізація глюкоамілази і вивчення активності імобілізованого і вільного ензиму

Мета роботи: одержати порошок гонадотропінів, вивчити методи одержання БАР.

Завдання:

1. Визначити активність вільного та імобілізованого на цеоліті ензиму глюкоамілази;
2. Вивчити вплив йонів важких металів на активність імобілізованого і вільного препарату глюкоамілази.

Глюкоамілаза (К.Ф.3.2.1.3. 1,4- α -D-глюкан глюкогідролаза) гідролізує α -1,4-зв'язки, послідовно відщеплюючи залишки глюкози від молекули крохмалю чи глікогену:



Реакція проходить до повного гідролізу всіх α -1,4-зв'язків і розщеплення крохмалю. Проходження ферментативної реакції контролюють за наявністю в середовищі субстрату – крохмалю і продукту реакції – глюкози. Наявність крохмалю визначають за реакцією з розчином йоду, а утворення глюкози – реактивом Фелінга, котрий готується перед заняттям змішуванням 50 мл 7% розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ і 50 мл 34,6% розчину сегнетової солі в 12% розчині NaOH . При цьому утворюється $\text{Cu}(\text{OH})_2$, який відновлюється глюкозою спочатку до CuOH , що розпадається з утворенням Cu_2O . Процес супроводжується зміною яскраво-синього кольору (CuSO_4) на жовтий (CuOH), а потім на червоно-цегляний (Cu_2O).

Обладнання, матеріали та реактиви

- 1% розчин глюкоамілази;
- цеоліт;
- 2% розчин крохмалю;
- 0,1 М йод;
- 10% розчин Плюмбуму нітрату;
- реактив Фелінга.

Водяна баня, пробірки, піпетки.

Завдання 1. Визначення активності вільного та іммобілізованого на цеоліті ензиму глюкоамілази

Хід роботи

1. У дві пробірки внесіть по 2 мл 1% розчину глюкоамілази. В одну із них внесіть 0,2 г порошку цеоліту і безперервно перемішуйте 5 хвилин. Відбувається іммобілізація (зв'язування) ензиму цеолітом.
2. В обидві пробірки внесіть по 2 мл 2% розчину крохмалю і поставте на 10 хвилин у водяну ванну при температурі 37°C. Після цього вміст кожної пробірки поділіть на дві частини.
3. До однієї із частин кожної пробірки внесіть по 2 краплі розчину 0,1 М йоду. Спостерігайте відсутність синього забарвлення у пробірці з цеолітом, що вказує на повний розклад крохмалю.
4. У другій частині кожної пробірки виконайте реакцію на відновлення $\text{Cu}(\text{OH})_2$ глюкозою. Для цього до обох пробірок внесіть по 2 мл реактиву Фелінга і нагрійте до кипіння. Спостерігайте за інтенсивністю відновлення гідроксиду міді в обох пробірках.
5. Зробіть висновки щодо впливу іммобілізації глюкоамілази на її активність.

Висновок

Завдання 2. Вивчення впливу йонів важких металів на активність іммобілізованого і вільного препарату глюкоамілази

Як відомо, йони важких металів (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+}) гальмують активність ензимів і зменшують швидкість реакції. У цій роботі визначається підвищення стійкості іммобілізованого ензиму до інгібуючої дії йонів важких металів.

Хід роботи

1. У дві пробірки внесіть по 2 мл 1% розчину глюкоамілази.
2. В одну із пробірок внесіть 0,2 г цеоліту і перемішуйте безперервно упродовж 5-ти хвилин.
3. В обидві пробірки внесіть по 3 мл 2% розчину крохмалю і 0,2 мл 10% розчину Плюмбуму нітрату. Поставте у водяну баню при температурі 37°C на 10 хвилин.
4. Вміст обох пробірок поділіть наполовину. До однієї половини обох пробірок внесіть по 2 краплі 0,1 М розчину йоду, а з другою половиною обох пробірок виконайте реакцію на глюкозу з реактивом Фелінга (як і в попередньому досліді).
5. Порівняйте інтенсивність забарвлення з йодом і відновлення $\text{Cu}(\text{OH})_2$ в обох пробірках.
6. Зробіть висновок про вплив іммобілізації ензиму на його стійкість до інгібуючої дії йонів важких металів.

Висновок

Лабораторна робота №9

Тема: Одержання гонадотропіну із сироватки крові жеребних кобил

Мета роботи: одержати порошок гонадотропінів, вивчити методи одержання БАР.

Завдання:

1. Осадження альбумінів і глобулінів;
2. Осадження гонадотропіну;
3. Одержання порошку гонадотропіну.

Обладнання, матеріали та реактиви

сироватка або плазма крові;
50% розчин ацетатної кислоти;
спирт;
ацетон.

Центрифужні пробірки, мірні циліндри, ділительна лійка об'ємом 100-150 мл, скляні палички, піпетки, гумовий шланг, мікродозатори змінного об'єму, рН-метр, центрифуга.

Завдання 1. Осадження альбумінів і глобулінів

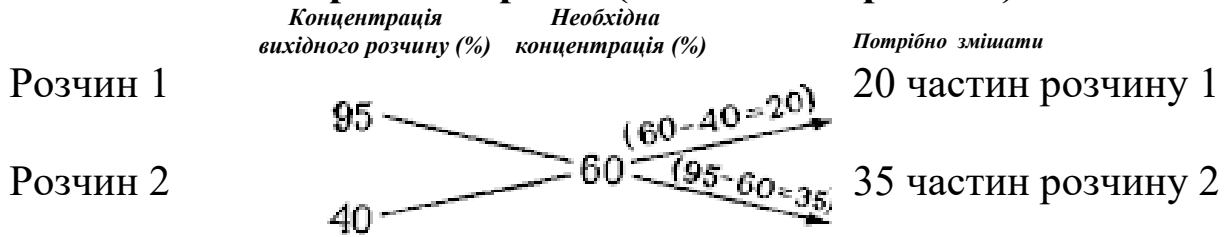
Хід роботи

1. До 10 мл сироватки або плазми крові поступово (упродовж 15-20 хвилин) внесіть декілька мілілітрів 50% розчину ацетатної кислоти до рН-4,5. При цьому слід постійно проводити помішування з допомогою скляної палички. Значення рН перевіряйте універсальним індикаторним папірцем (можна також з допомогою рН-метра).

2. Після досягнення значення рН в межах $4,5 \pm 0,2$ до сироватки (плазми) крові поступово перемішуючи внесіть охолоджений ($0-2^{\circ}\text{C}$) спирт до 40° концентрації (на 10 мл сироватки чи плазми крові необхідно додати приблизно 7 мл). При визначенні необхідного об'єму спирту слід користуватись правилом хреста.

3. Осадження альбумінів і глобулінів проведіть через 10 хвилин шляхом фільтрування або центрифугування упродовж 10 хвилин при 2-3 тис. об./хв.

Правило хреста (загальний приклад)



Висновок _____

Завдання 2. Осадження гонадотропіну

Хід роботи

4. Після фільтрування або центрифугування слід заміряти об'єм фільтрату (цетрифугату) з допомогою мірного циліндра.

5. Фільтрат (центрифугат) перенесіть у ділильну лійку об'ємом 100-150 мл. Перемішуючи скляною паличкою, внесіть охолоджений спирт до концентрації 80°. Об'єм спирту підраховують аналогічно, як при осадженні альбумінів і глобулінів. Концентрацію спирту також можна вимірювати з допомогою спиртометра. Внесення спирту слід проводити поступово упродовж 10-15 хвилин. Через 1-1,5 години після внесення спирту наступить випадання осаду гонадотропінів. Повне осадження гонадотропінів наступить через 10-12 годин.

6. Після того як випаде осад гонадотропінів слід провести сифонування (відділення і збирання) верхньої прозорої частини з допомогою гумового шлангу, а нижню частину через краник ділильної лійки внести у склянку і провести фільтрування або центрифугування упродовж 10 хвилин при 2-3 тис. об./хв.

Висновок _____

Завдання 3. Одержання порошку гонадотропіну

Хід роботи

7. До осаду в пробірках внесіть 5 мл ацетону і перемішайте скляною паличкою, після чого процентрифугуйте (10 хвилин за 2-3 тис. об./хв). Цю процедуру слід повторити ще 2 рази. Залишки ацетону в пробірці над осадом гонадотропінів висушуйте на повітрі.

За наявності ліофільної сушки проводять висушування гонадотропінів. До осаду гонадотропінів додають дистильовану воду і отриманий розчин переносять у целофановий мішечок для діалізу. Процес триває 10-12 годин. Після цього діалізат піддають ліофільній сушці.

Вихід гонадотропінів з 10 мл сироватки (плазми) складає 10-15 мг.

Висновок

Питання для самоконтролю:

1. Організми-продуценти речовин для харчової промисловості, які одержують біотехнологічним шляхом.
2. Біотехнологія одержання амінокислот.
3. Біотехнологія одержання підсолоджувачів.
4. Біотехнологія одержання підсилювачів смаку.
5. Біотехнологія одержання ліпідів.
6. Біотехнологія одержання згущувачів.
7. Біотехнологія одержання барвників.
8. Біотехнологія одержання оцтової кислоти.
9. Біотехнологія одержання молочної кислоти.
10. Біотехнологія одержання лимонної кислоти.
11. Одержання безлактозного молока.
12. Одержання цукрів з молочної сироватки.
13. Значення процесу іммобілізації.
14. Використання іммобілізованих ензимів.
15. Процес осадження альбумінів і глобулінів.
16. Процес одержання гонадотропінів.

САМОСТІЙНА РОБОТА ЗДОБУВАЧА

Самостійну роботу з дисципліни «Основи біотехнології» рекомендується провадити впродовж усього часу вивчення курсу паралельно з аудиторним навчанням. Організовуючи самостійну роботу,

1. ознайомтесь з програмою дисципліни та тематикою, яка виносить на самостійне вивчення;
2. з рекомендованої літератури підберіть посібники для вивчення тої чи іншої теми;
3. працюючи з літературою, зробіть короткий конспект. У конспекті фіксуйте визначення, перебіг основних процесів;
4. дайте відповіді на питання для самоконтролю.

1. Перелік тем для самостійного вивчення.

№ з/п	Назви тем та короткий зміст
1.	Біотехнологія виробництва протеїну. Переваги біотехнологічного виробництва протеїну над традиційними.
2.	Мікроорганізми – продуценти протеїну. Дріжджі, бактерії, мікроскопічні гриби, одноклітинні водорості.
3.	Джерела сировини для одержання кормового протеїну. Рідкі парафіни, метан, нижчі спирти (метанол, етанол), рослинна сировина. Технологія отримання кормового протеїну з парафінів, метану, метанолу, етанолу. Склад та якість одержаного продукту.

2. Індивідуальні завдання.

З метою покращення успішності здобувачів вищої освіти та підвищення його балів за поточний контроль, упродовж семестру їм може додатково надаватися індивідуальне завдання (написання реферату і виконання описових завдань) з таких тем:

1. Мікроорганізми-продуценти біотехнологічного процесу.
2. Відкриття структури ДНК.
3. Методологія клонування.
4. Законодавство у сфері клонування.
5. Безпека та перспективи використання ГМО.
6. Секвенування ДНК.

ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

Тестові завдання (одна вірна відповідь)

1. Біотехнологія – це:

1. природнича наука, метою якої є лише вивчення живих об'єктів;
2. наука, яка займається вивченням процесу переробки, модифікації речовин органічної та неорганічної природи з метою отримання різних цінних продуктів та послуг без використання біологічних агентів;
3. застосування наукових та інженерних принципів для переробки речовин органічної та неорганічної природи біологічними агентами з метою отримання різних цінних продуктів та послуг.

2. Процеси, пов'язані з біотехнологією бродіння, за допомогою яких одержують органічні кислоти, розчинники та енергетичну сировину можуть відбуватись:

1. у нестерильних умовах, оскільки фактор температури або наявність спирту, цукру, кислот та інших компонентів середовищ або продуктів метаболізму мікроорганізмів інгібують ріст сторонньої мікрофлори;
2. лише у стерильних умовах, оскільки фактор температури або наявність спирту, цукру, кислот та інших компонентів середовищ або продуктів метаболізму мікроорганізмів не інгібують ріст сторонньої мікрофлори;
3. органічні кислоти, розчинники та енергетичну сировину у результаті бродіння не отримують.

3. Процеси одержання біогазу, біодобрих, біогумусу:

1. це небіотехнологічні процеси;
2. це біотехнологічні процеси, у яких біологічні організми застосовуються з метою біотрансформації сільськогосподарських, промислових і побутових відходів, очистки води і ґрунту;
3. це біотехнологічні процеси, метою яких є біотрансформація сільськогосподарських, промислових і побутових відходів, очистки води і ґрунту, можуть відбуватись без використання живих організмів або їх структур чи продуктів їхньої життєдіяльності.

4. Продуктом імунної біотехнології є:
 1. виділення антитіл, які продукують лімфоцити;
 2. одержанням моноклональних антитіл;
 3. реконструйована ДНК.

5. Якщо продукт отримують без участі біологічного агента – це біотехнологічний процес:
 1. так;
 2. ні;
 3. будь-який процес, пов'язаний з модифікацією усіх органічних чи неорганічних сполук є біотехнологічним.

6. Термін «біотехнологія» вперше застосував:
 1. вчений Л. Пастер;
 2. інженер К. Ерекі;
 3. біолог І. І. Мечніков.

7. Рекомбінанти – це:
 1. молекули, зокрема продукти метаболізму;
 2. субклітинні елементи;
 3. організми, отримані методами генетичної інженерії.

8. За допомогою яких організмів, у клітини яких уведено ген, що відповідає за утворення хімозину, можна оптимізувати, покращити технологію виготовлення сиру?
 1. плісневих грибів;
 2. бактерій;
 3. дріжджів.

9. Клітинна інженерія – це
 1. напрям біотехнології, завданням якої є створення нових, не існуючих раніше у природі клітин із заданими властивостями;
 2. застосування біотехнологічного процесу для одержання промисловим способом цінних продуктів життєдіяльності мікроорганізмів і їх клітинної біомаси;
 3. метод біотехнології, що займається дослідженнями з перебудови генотипів.

10. Біотехнологія тварин – напрям біотехнології, основними методами якого є

1. традиційна селекція, спонтанний мутагенез;
2. клонування, створення генетично модифікованих тварин, трансплантація ембріонів;
3. природний добір.

11. Штам *Pseudomonas putida* здатний:

1. синтезувати амінокислоти для харчової промисловості;
2. утилізувати нафтопродукти;
3. синтезувати антибіотики для фармацевтичної промисловості.

12. Хто описав скляний посуд, що отримав назву «чашки Петрі», для вирощування мікроорганізмів на живильному середовищі:

1. вчений Луї Пастер;
2. дослідник І.Уайлдер;
3. бактеріолог Юліус Петрі.

13. Вперше довів, що ДНК – носій спадкової інформації :

1. вчений О. Ейвері;
2. Пол Берг;
3. Джеймс Уотсон.

14. Створили просторову модель молекули ДНК:

1. вчений О. Ейвері;
2. біолог Ілля Мечніков;
3. дослідники Джеймс Уотсон та Френсіс Крік.

15. Першу рекомбінантну ДНК *in vitro* створив :

1. вчений О. Ейвері;
2. дослідник Френсіс Крік;
3. науковець Пол Берг.

16. Е. Чаргафф:

1. родом з Алабами;
2. родом з Санкт-Петербургу;
3. родом з Чернівців.

17. Методи аналізу нуклеотидних послідовностей в молекулах нуклеїнових кислот або білків (поліпептидів) називаються методами

1. секвенування;
2. ампліфікації;
3. модифікації.

18. Метод полімеразно ланцюгової реакції – це метод:

1. секвенування ДНК;
2. ампліфікації ДНК;
3. модифікації ДНК.

19. Геном людини містить:

1. 20 000-25000 генів;
2. 100 000-125000 генів;
3. 50 000-100000 генів.

20. Основна мікробіота:

1. це домінантна мікробіота, що сформувалася в результаті природної сукцесії спонтанної мікробіоти молока під час його скисання;
2. заквашувальні культури (*starters*), які розробляють на основі домінантних видів основної мікробіоти та спеціально селекціонованих мікроорганізмів;
3. мікроорганізми, які залишаються після пастеризації молочної основи.

21. Стороння мікробіота:

1. це домінантна мікробіота, що сформувалася в результаті природної сукцесії спонтанної мікробіоти молока під час його скисання;
2. заквашувальні культури (*starters*), які розробляють на основі домінантних видів основної мікробіоти та спеціально селекціонованих мікроорганізмів;
3. мікроорганізми, які залишаються після пастеризації молочної основи.

22. Промисловий варіант основної мікробіоти:
1. це доміантна мікробіота, що сформувалася в результаті природної сукцесії спонтанної мікробіоти молока під час його скисання;
 2. заквашувальні культури (starters), які розробляють на основі доміантних видів основної мікробіоти та спеціально селекціонованих мікроорганізмів;
 3. мікроорганізми, які залишаються після пастеризації молочної основи.
23. Дріжджі у сироваріні та виробництві деяких кисломолочних продуктів:
1. використовують як стороння мікробіота;
 2. використовують як додаткові культури;
 3. використовують як основні культури.
24. Бактерії роду *Bacillus* використовують для одержання:
1. ензимів (протеаз, амілаз), поліпептидних антибіотиків, поліцукоридів, засобів захисту рослин;
 2. для зброджування цукоридів до ацетону, етанолу, бутанолу;
 3. для одержання вітаміну B₁₂ .
25. Бактерії роду *Clostridium* використовують для одержання:
1. ензимів (протеаз, амілаз), поліпептидних антибіотиків, поліцукоридів, засобів захисту рослин;
 2. для зброджування цукоридів до ацетону, етанолу, бутанолу;
 3. для одержання вітаміну B₁₂ .
26. Бактерії роду псевдомонади використовують для одержання:
1. ензимів (протеаз, амілаз), поліпептидних антибіотиків, поліцукоридів, засобів захисту рослин;
 2. для зброджування цукоридів до ацетону, етанолу, бутанолу;
 3. для одержання вітаміну B₁₂ .
27. Для створення генетично модифікованих рослин використовуються:
1. агробактерії ;
 2. псевдомонади;
 3. бактерії роду *Clostridium*.

28. Гібридизація – процес одержання гібридів
1. який ґрунтується на об'єднанні генетичного матеріалу статевих клітин;
 2. який ґрунтується на об'єднанні генетичного матеріалу різних клітин;
 3. який ґрунтується на внесенні змін до генетичного матеріалу клітини.
29. Стовбурові клітини – це:
1. клітини, в яких відсутні тканинноспецифічні структури і які здатні до проліферації, тобто тривалого самовідновлення та диференціювання в різні типи спеціалізованих клітин;
 2. попередники пухлинних клітин;
 3. клітини, які не здатні до проліферації, тобто тривалого самовідновлення та диференціювання в різні типи спеціалізованих клітин.
30. Клітинна лінія – це
1. клітини, що підтримуються у культурі до першого пересіву;
 2. культура, отримана шляхом пересіву у свіже середовище;
 3. культура однорідних клітин, що виникла у результаті пасажування клітин первинної культури.
31. Субкультура – це
1. клітини, що підтримуються у культурі до першого пересіву;
 2. культура пухлинних клітин;
 3. культура, отримана шляхом пересіву у свіже середовище.
32. Первинні культури – це
1. клітини, що підтримуються у культурі до першого пересіву;
 2. культура, отримана шляхом пересіву у свіже середовище;
 3. культура однорідних клітин, що виникла в результаті пасажування.

33. Субстратзалежні культури – це
1. тип культури, у якій клітини ростуть завислими у рідкому середовищі;
 2. клітини, яким не властиве ділення у культурі;
 3. тип культури, у якій клітини ростуть прикріпленими до дна посудини.
34. Суспензійні культури – це
1. тип культури, у якій клітини ростуть завислими у рідкому середовищі;
 2. клітини, яким не властиве ділення у культурі;
 3. тип культури, у якій клітини ростуть прикріпленими до дна посудини.
35. За культивування досліджено, що спочатку клітини знаходяться у так званій лаг-фазі – це
1. фаза спокою;
 2. фаза адаптації;
 3. фаза активного росту і проліферації.
36. За культивування досліджено, що після виснаження культурального середовища та максимального використання субстрату, клітини знаходяться у так званій фазі плато – це
1. фаза спокою;
 2. фаза адаптації;
 3. фаза активного росту і проліферації.
37. Після певного періоду адаптації, який виникає одразу після пасажування клітин, вони знаходяться у так званій лог-фазі – це
1. фаза спокою;
 2. фаза адаптації;
 3. фаза активного росту і проліферації.
38. Яка речовина використовується для руйнування клітинних контактів та утворення суспензії клітин при пасажуванні?
1. фосфатно-сольовий буфер;
 2. культуральне середовище;
 3. трипсин.

39. Калюс – це:
1. тканина недиференційованих клітин;
 2. тканина диференційованих клітин;
 3. тканина клітин, що не здатні рости на живильному середовищі *in vitro*.
40. Властивість клітини реалізувати генетичну інформацію, що забезпечує її диференціювання і розвиток до цілого організму:
1. тотипотентність;
 2. дедиференція;
 3. калусогенез.
41. Як називають фрагменти тканин різних органів вищих рослин для одержання культури клітин, тканин, органів?
1. експланти;
 2. протопласти;
 3. імпланти.
42. Втрата спеціалізації клітини – це явище
1. дедиференціації;
 2. тотипотентності;
 3. диференціації.
43. β -індолілоцтова кислота (ІОК), α -нафтилоцтова кислота (НОК) і 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-Д) – це
1. цитокініни;
 2. ауксини;
 3. гібереліни.
44. Ауксини, цитокініни та гібереліни – це
1. вітаміни;
 2. фітогормони;
 3. ензими.
45. Вторинні метаболіти рослин:
1. протеїни, цукориди;
 2. амінокислоти;
 3. антибіотики, мікотоксини, пігменти, фенольні сполуки.

46. З метою отримання великих кількостей клітинної біомаси рослин у промисловості застосовують:

1. ферментери;
2. аеротенки;
3. метантенки.

47. Вирощування і маніпуляції з клітинами, тканинами і органами рослин *in vitro* проводяться:

1. поза організмом на штучних живильних середовищах у чітко контрольованих, нестерильних умовах;
2. поза організмом на штучних живильних середовищах у чітко контрольованих, стерильних умовах;
3. поза організмом на штучних живильних середовищах у чітко контрольованих умовах, стерильністю можна знехтувати.

48. Сукупність технічних прийомів для модифікації, створення нових та розмноження рослин з корисними ознаками, одержання біологічно активних речовин (БАР) – це завдання:

1. ботаніки;
2. біотехнології рослин;
3. агрономії.

49. Без яких компонентів поживного середовища не можливо культивувати калюс:

1. без органічних добавок;
2. без цукрози;
3. без фітогормонів.

50. Калюсні клітини одержують:

1. після переміщення експланта на живильне середовище у результаті дедиференціювання його клітин;
2. після переміщення експланта на живильне середовище у результаті морфогенезу;
3. після переміщення експланта на живильне середовище у результаті розростання меристематичних осередків.

51. Бактерії, які використовують у технології одержання генетично модифікованих рослин:

1. кишкова паличка;
2. лактобактерії;
3. агробактерії;
4. біфідобактерії.

52. Виберіть вірну послідовність маніпуляцій під час генноінженерних втручань:

1. з'ясування локалізації гена, який цікавить → підбір ензимів-рестриктаз → підбір плазміди-вектора, який здатний переносити чужорідні гени в клітини → отримання рекомбінантної молекули ДНК за допомогою лігаз → перенесення рекомбінантних молекул в організм для його модифікації;
2. отримання рекомбінантної молекули ДНК за допомогою лігаз → підбір ензимів-рестриктаз → підбір плазміди-вектора, який здатний переносити чужорідні гени в клітини → з'ясування локалізації гена, який цікавить → перенесення рекомбінантних молекул в організм для його модифікації;
3. отримання рекомбінантної молекули ДНК за допомогою лігаз → перенесення рекомбінантних молекул в організм для його модифікації → з'ясування локалізації гена, який цікавить → підбір ензимів-рестриктаз → підбір плазміди-вектора, який здатний переносити чужорідні гени в клітини;
4. підбір плазміди-вектора, який здатний переносити чужорідні гени в клітини → отримання рекомбінантної молекули ДНК за допомогою лігаз → перенесення рекомбінантних молекул в організм для його модифікації → з'ясування локалізації гена, який цікавить → підбір ензимів-рестриктаз.

53. Генетично модифіковані організми (ГМО) – це

1. організми, в яких генетичний матеріал був змінений за допомогою штучних прийомів перенесення генів;
2. організми, які виникли самостійно;
3. організми створені природою;
4. усі відповіді вірні.

54. Визначення генетично модифікованих організмів у продуктах проводять за допомогою:

1. хімічних методів;
2. гістологічних методів;
3. молекулярно-генетичних методів;
4. візуального спостереження.

55. В основі методів визначення генетично модифікованих організмів у продуктах харчування лежить:

1. полімеразно ланцюгова реакція;
2. біотехнологічні маніпуляції з використанням речовин-маркерів;
3. цитологічні дослідження;
4. усі відповіді вірні.

56. Потенційними перевагами ГМ-рослин є:

1. ефективна боротьба з бур'янами та збільшення прибутків;
2. зменшення використання гербіцидів;
3. збільшення врожаїв;
4. усі відповіді вірні.

57. Першість серед ГМ-рослин, що вирощуються у відкритих екосистемах займає:

1. соя;
2. квасоля;
3. цибуля;
4. огірок.

58. Як називають місце локалізації гена на хромосомі?

1. реплікон;
2. локус;
3. ділянка;
4. регіон.

59. Як називають позахромосомні молекули ДНК у бактерій, здатні до автономної реплікації?

1. нуклеоїд;
2. плазміда;
3. рибосома;
4. мезосома.

60. Як називають ензими, які впізнають і атакують відповідні «розрізають» ДНК на фрагменти?

1. рестриктази;
2. метилази;
3. лігази;
4. амілази.

61. Як називають перенесення генетичної інформації від клітини донора до клітини-реципієнта за допомогою віруса, бактеріофага?

1. кон'югацією;
2. трансформацією;
3. трансдукцією;
4. електропорацією.

62. Як називають ензими, які беруть участь у зшиванні фрагментів ДНК?

1. рестриктази;
2. метилази;
3. лігази;
4. полімерази.

63. Як називають процес перенесення генетичної інформації з клітини-донора у клітину-реципієнта за безпосереднього контакту клітин?

1. кон'югацією;
2. трансформацією;
3. трансдукцією;
4. електропорацією.

64. Що входить до складу оперона?

1. промотор, структурні та регуляторні гени, оператор;
2. поліцистронні структури, мРНК, полісоми;
3. субодиниці ензимів, фактори транскрипції;
4. протомери протеїнів, атенюатори, енхансери.

65. Промотор – це:

1. сайт, із яким зв'язується репресор;
2. нуклеотидна послідовність, із якою зв'язується РНК-полімераза;
3. сайт, із яким зв'язується термінатор;
4. поліпептидний ланцюг, який зв'язується з оператором.

66. У біотехнології при отриманні нових речовин використовують плазміди. Для яких процесів їх використовують?

1. перенесення генетичної інформації;
2. біосинтезу протеїнів;
3. біосинтезу ензимів;
4. біосинтезу гормонів.

67. Яку реакцію каталізує ДНК-залежна РНК-полімераза?

1. синтез іРНК на матриці ДНК;
2. реплікацію ядерних ДНК;
3. трансляцію коду іРНК в амінокислотну послідовність протеїнів;
4. перенесення інформації з РНК на ДНК (зворотня транскриптаза).

68. Написати нуклеотидну послідовність одного ланцюга ДНК, якщо другий ланцюг має послідовність -АЦГ-ЦЦГ-ТАТ-ГЦА-ЦЦ-:

1. – ЦАЦ-ГГЦ-АТА-ЦГТ-АА-;
2. – ГАЦ-ГГЦ-АТА-ЦГТ-АА-;
3. – ТГЦ-ГГЦ-АТА-ЦГТ-ГГ-;
4. – АТГ-ТЦГ-ТАТ-ГЦА-ТТ-.

69. Якою азотистою основою різниться РНК від ДНК?

1. цитозин;
2. гуанін;
3. аденін;
4. урацил.

70. Мономерами нуклеїнових кислот є

1. азотисті основи;
2. нуклеотиди;
3. нуклеозиди;
4. амінокислоти.

71. ДНК це -
1. поліпептид;
 2. полінуклеотид;
 3. нуклеотид;
 4. альфа-спіраль.
72. Хімічна сполука, до складу якої входить азотиста основа, залишок пентози та фосфорної кислоти?
1. нуклеоїд;
 2. нуклеотид;
 3. нуклеозид;
 4. аденінова кислота.
73. Пентоза, що входить до складу ДНК?
1. фруктоза;
 2. рибоза;
 3. дезоксирибоза;
 4. глюкоза.
74. Два полінуклеотидні ланцюги в молекулі ДНК орієнтовані
1. паралельно;
 2. антипаралельно;
 3. спірально;
 4. латерально.
75. Який принцип будови ДНК відображає наступне твердження: «В молекулі ДНК кожній азотистій основі одного ланцюга відповідає чітко визначена азотиста основа іншого ланцюга»?
1. квазікомплементарність;
 2. комплементарність;
 3. антикомплементарність;
 4. антипаралельність.
76. Ген –
1. це ділянка молекули білка, яка відповідає за його синтез;
 2. це ділянка молекули РНК, яка відповідає за її синтез;
 3. це ділянка молекули ДНК, яка відповідає за синтез молекули протеїну;
 4. усі відповіді вірні.

77. Мета міжнародного проєкту ENCODE:

1. Вивчення і аналіз усіх білків людини;
2. аналіз транскриптів геному людини;
3. аналіз власне ДНК людини;
4. усі відповіді вірні.

78. Геном – це

1. сукупність генів, зосереджених в диплоїдному наборі хромосом;
2. сукупність генів, зосереджених в гаплоїдному наборі хромосом;
3. сукупність генів, зосереджених в молекулі протеїну;
4. сукупність РНК, зосереджених в гаплоїдному наборі хромосом.

79. Структурні гени:

1. визначають амінокислотну послідовність протеїнів;
2. контролюють транскрипцію;
3. контролюють трансляцію;
4. усі відповіді вірні.

80. Регулюючі гени:

1. визначають амінокислотну послідовність протеїнів;
2. контролюють транскрипцію;
3. контролюють трансляцію;
4. усі відповіді вірні.

81. Основні функції генів:

1. зберігання спадкової інформації;
2. реплікація – подвоєння генів у процесі мітозу шляхом біосинтезу нуклеїнових кислот;
3. біосинтез протеїнів та інших макромолекул у клітині;
4. усі відповіді вірні.

82. Кодон – це

1. одиниця генетичного коду, два послідовно розташовані нуклеотидні залишки в ДНК або мРНК, які кодують включення однієї амінокислоти до молекули протеїна;
2. одиниця генетичного коду, три послідовно розташовані нуклеотидні залишки в ДНК або мРНК, які кодують включення однієї амінокислоти до молекули протеїна;
3. одиниця генетичного коду, чотири послідовно розташовані нуклеотидні залишки в ДНК або мРНК, які кодують включення однієї амінокислоти до молекули протеїна;
4. одиниця генетичного коду, три послідовно розташовані нуклеотидні залишки в ДНК або мРНК, які кодують включення трьох амінокислот до молекули протеїна.

83. Рекомбінантна ДНК – це

1. молекула РНК, отримана за допомогою методів генетичної інженерії, яка поєднує в собі генетичний матеріал різних біологічних об'єктів;
2. молекула ДНК, отримана за допомогою методів генетичної інженерії, яка поєднує в собі генетичний матеріал різних біологічних об'єктів;
3. молекула ДНК, отримана за допомогою методів генетичної інженерії, зі специфічними мутаціями;
4. молекула РНК, отримана за допомогою методів генетичної інженерії, зі специфічними мутаціями.

84. Живий організм, в геном якого штучно введений ген іншого організму називають

1. трансгенним;
2. генетично модифікованим;
3. генетично зміненим;
4. усі варіанти вірні.

85. Скринінг – це:

1. відбір серед клонів трансформованих бактерій таких, які містять потрібний ген;
2. вирощування мікроорганізмів на живильному середовищі;
3. біосинтез протеїнів;
4. дослідження синтезу протеїнів.

86. Рекомбінантні ензими, які застосовують у молочній промисловості:

1. ренін;
2. лактаза;
3. ліпаза;
4. усі з названих.

87. Із застосуванням біотехнологічних методів досягають зменшення вмісту а-лактальбуміну у молоці з метою:

1. збільшення вмісту Кальцію;
2. покращення процесу дозрівання сиру;
3. підвищення стабільності казеїнових комплексів, зменшення розмірів міцел казеїну;
4. зменшення вмісту лактози, зниження ступеня кристалоутворення під час заморожування.

88. Із застосуванням біотехнологічних методів досягають збільшення концентрації κ-казеїну з метою:

1. збільшення вмісту Кальцію;
2. покращення процесу дозрівання сиру;
3. підвищення стабільності казеїнових комплексів, зменшення розмірів міцел казеїну;
4. зменшення вмісту лактози, зниження ступеня кристалоутворення під час заморожування.

89. Із застосуванням біотехнологічних методів досягають внесення протеолітичних сайтів у казеїни з метою:

1. збільшення вмісту Кальцію;
2. покращення процесу дозрівання сиру;
3. підвищення стабільності казеїнових комплексів, зменшення розмірів міцел казеїну;
4. зменшення вмісту лактози, зниження ступеня кристалоутворення під час заморожування.

90. Із застосуванням біотехнологічних методів досягають збільшення сайтів фосфорилювання в казеїнах з метою:

1. збільшення вмісту Кальцію;
2. покращення процесу дозрівання сиру;
3. підвищення стабільності казеїнових комплексів, зменшення розмірів міцел казеїну;
4. зменшення вмісту лактози, зниження ступеня кристалоутворення під час заморожування.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ДО ЗАЛІКУ

1. Визначення «біотехнологія», предмет вивчення біотехнології.
2. Об'єкти дослідження у біотехнології.
3. Передумови виникнення біотехнології.
4. Рік виникнення біотехнології. Яка подія знаменує появу науки біотехнології?
5. Історія розвитку біотехнології.
6. Завдання, які вирішує біотехнологія.
7. Якими методами вирішують свої завдання біотехнологи?
8. Найсучасніші методи біотехнології.
9. Напрямки біотехнології.
10. Застосування біотехнологій у харчовій промисловості.
11. Клітинна інженерія.
12. Прикладне і фундаментальне значення методу культивування клітин.
13. Обладнання біотехнологічної лабораторії, його функціональне значення.
14. Характеристика боксу, структура і правила поведінки у ньому.
15. Основні умови культивування клітин.
16. Посуд для культивування клітин.
17. Як дотриматись стерильності при роботі з культурами клітин?
18. Що таке банк клітинних культур?
19. Що таке біотехнологія рослин?
20. Практичне значення біотехнології рослин?
21. Постачання яких матеріалів, речовин для харчової промисловості забезпечує біотехнологія рослин?
22. Способи культивування рослин в умовах *in vitro*.
23. Особливості культивування калюсних культур.
24. Що таке антиген, аноїтіло?
25. Використання антитіл.
26. Що таке моноклональні антитіла?
27. Процес одержання гібридом.
28. Характеристика селективного середовища ГАТ.
29. Що таке гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансфераза?
30. Суть селективного відбору гібридом.
31. Що таке гібридизація клітин?
32. Що таке синкаріон?

33. Методи гібридизації клітин.
34. У яких дослідженнях використовується ІФА?
35. Суть ІФА.
36. У продуктах харчування які речовини можна ідентифікувати ІФА?
37. Що таке тест-система ІФА?
- 38.
39. Практичні досягнення генетичної інженерії.
40. Як відбувається реалізація генетичної інформації у клітині?
Будова ДНК.
41. Що таке рекомбінантні ДНК?
42. Основні продукти, які отримують за допомогою генетичної інженерії.
43. Процес одержання рекомбінантних ДНК.
44. Взаємозв'язок біотехнології з іншими науками?
45. Біобезпека використання біотехнологій.
46. Які методи клітинної інженерії вам відомі?
47. Назвіть методи генетичної інженерії?
48. Генетична інженерія – це.....
49. Азотисті основи, їх класифікація. Структура похідних азотистих основ.
50. Що таке ген?
51. Будова оперону.
52. Екзонно-інтронна будова генів.
53. Практичні досягнення генетичної інженерії.
54. Структура гуаніну.
55. Як з'єднані між собою азотисті основи.
56. Що таке промотор?
57. Класифікація генів.
58. Що таке ДНК, РНК, їх відмінності, функції.
59. Структура урацилу.
60. Як з'єднані між собою нуклеотиди.
61. Що таке оператор?
62. Основні функції генів.
63. Що таке локус?
64. Правило Чаргаффа.
65. Структура тиміну.
66. Що таке кодон?
67. Що таке термінатор?

68. Класифікація генів.
69. Які елементи містить генетична конструкція для ГМ-сої?
70. Етапи одержання ГМ-сої.
71. Промотор та термінатор ГМ-сої?
72. З якою метою модифікують сою?
73. Як одержати цільовий ген?
74. Для чого конструюють вектор?
75. Які є методи трансформації рослин?
76. Як відібрати рослини зі зміненою генетичною інформацією?
77. Для чого використовують ПЛР?
78. Суть ПЛР.
79. Склад реакційної суміші для ПЛР.
80. Що таке праймер?
81. Етапи ПЛР.
82. Які елементи ГМ-сої ідентифікують ПЛР?
83. Структура ПЛР-лабораторії та правила роботи у ній.
84. Організми-продуценти речовин для харчової промисловості, які одержують біотехнологічним шляхом.
85. Біотехнологія одержання амінокислот.
86. Біотехнологія одержання підсолоджувачів.
87. Біотехнологія одержання підсилювачів смаку.
88. Біотехнологія одержання ліпідів.
89. Біотехнологія одержання згущувачів.
90. Біотехнологія одержання барвників.
91. Біотехнологія одержання оцтової кислоти.
92. Біотехнологія одержання молочної кислоти.
93. Біотехнологія одержання лимонної кислоти.
94. Одержання безлактозного молока.
95. Одержання цукрів з молочної сироватки.
96. Значення процесу іммобілізації.
97. Використання іммобілізованих ензимів.
98. Процес осадження альбумінів і глобулінів.
99. Процес одержання гонадотропінів.
100. Біотехнології переробки відходів харчової промисловості.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Базова

1. Біотехнологія: Навч.-метод. посіб. Ч. 1. Генетична інженерія мікроорганізмів / за ред. В. М. Тоцький. Одеса: Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2004. 76 с.
2. Галяс В., Колотницький А. Біохімічний і біотехнологічний словник. Львів, 2005. 488 с.
3. Герасименко В. Г. Біотехнологічний словник. Київ: Вища школа, 1991. 343 с.
4. Герасименко В. Г. Біотехнологія: підруч. Київ : Вища школа, 2008. 343 с.
5. Гиль М. І., Сметана О. Ю., Юлевич О. І. Молекулярна генетика та технології дослідження геному : навч. посіб. Миколаїв : МНАУ, 2014. 280 с.
6. Карпов О. В., Демидов С. В., Кир'яченко С. С. Клітинна та генна інженерія: підруч. Київ : Фітосоціоцентр, 2010. 208 с.
7. Кравців Р. Й., Колотницький А. Г., Буцяк В. І. Генетична інженерія: посіб. Львів, 2008. 214 с.
8. Мартиненко, О.І. Методи молекулярної біотехнології: лаб. Практикум. Київ: Академперіодика, 2010. – 232 с.
9. Мельничук М. Д. Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин : підруч. Київ : ПоліграфКонсалтинг, 2003. 520 с.
10. Ніколайчук В. І., Горбатенко І. Ю. Генетична інженерія: Підруч. Ужгород, 1999. 188с.
11. Слободян В. О. Основи біотехнології: Навч. посіб. Івано-Франківськ, 2002. 188 с.
12. Федоренко В. О., Осташ Б. О., Гончар М. В., Ребець Ю. В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. 279 с.
13. Шевчук В. Я., Чеботько К. О., Разгуляев В. М. Біотехнологія одержання органомінеральних добрив із вторинної сировини. Київ, 2001. 201 с.
14. Юлевич О. І. Біотехнологія : курс лекцій. Миколаїв : МДАУ, 2007. 156 с.

Допоміжна

1. Біотехнологія. Освіта. Наука: Зб. тез Другої всеукр. наук.-практ. конф., присвяч. 160-річчю Нац. ун-ту «Львів. Політехніка», Львів, 6 - 8 жовт. 2004р. / ред. В. П. Новіков; О. В. Швед. Львів: Нац. ун-т «Львів. політехніка». Ін-т хімії та хім. Технологій, 2004. 176 с.
2. Димань Т. М. Шляхи використання трансгенних сільськогосподарських тварин (огляд). *Вісн. Білоцерків. держ. аграр. ун-ту*. 1999. Вип. 8, ч. 2. С. 63-68.
3. Дишкантюк О. В., Капрельянц Л. В. Біотехнологія одержання молочної кислоти та її солей на основі вторинних продуктів переробки зерна. *Укр. біохім. журн.* 2002. 74, № 4б (дод. 2). С. 181.
4. Довідник з репродуктивної біотехнології великої рогатої худоби / В. П. Буркат та ін. Львів, 2004. 150 с.
5. Шевчук В. Я., Чеботько К. О., Разгуляєв В. М. Біотехнологія одержання органомінеральних добрив із вторинної сировини. Київ, 2001. 201 с.

Шемедюк Наталія Петрівна

**Основи біотехнології
навчально-методичний посібник
для студентів спеціальності
181 «Харчові технології»**

Підписано до друку 15.09.2021 р. Формат 60x84
Папір офсетний. Тираж 100 прим.
Видавництво “Папірус”