

Рабочий экземпляр № _____

БШ-4234/Р

Белорусский государственный университет



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

_____ А.Л. Толстик

« *07* » *октября* 2013 г.

Регистрационный № УД - 9774 /баз.

Спецпрактикум

**Учебная программа учреждения высшего образования
по учебной дисциплине для специальности:**

1-31 01 01 Биология (по направлениям)

направления 1-31 01 01-03 Биология (биотехнология),

специализаций 1-31 01 01-01 25 и 1-31 01 01-02 25 Молекулярная биология

2013 г.

СОСТАВИТЕЛИ:

Ольга Борисовна Русь, доцент кафедры молекулярной биологии
Белорусского государственного университета, кандидат химических наук,
доцент;

Александр Леонидович Лагоненко, доцент кафедры молекулярной биологии
Белорусского государственного университета, кандидат биологических наук,
доцент;

Дмитрий Валентинович Галиновский, старший преподаватель кафедры
молекулярной биологии Белорусского государственного университета,
кандидат биологических наук

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Марина Николаевна Шаптуренко, ведущий научный сотрудник лаборатории
экологической генетики и биотехнологии ГНУ «Институт генетики и
цитологии НАН Беларуси», кандидат биологических наук;

Владислав Евгеньевич Мямин, доцент кафедры микробиологии Белорусского
государственного университета, кандидат биологических наук, доцент

РЕКОМЕНДОВАНА К УТВЕРЖДЕНИЮ В КАЧЕСТВЕ УЧЕБНОЙ:

Кафедрой молекулярной биологии Белорусского государственного
университета
(протокол № 21 от 16.05.2013);

Научно-методическим советом Белорусского государственного университета
(протокол № 1 от 18.09.2013г.)

Ответственный за редакцию: Ольга Борисовна Русь

Ответственный за выпуск: Ольга Борисовна Русь

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Специальный практикум для студентов, специализирующихся на кафедре молекулярной биологии, является важной составной частью учебного процесса, направленного на подготовку высококвалифицированных специалистов в области молекулярной биологии, владеющих глубокими теоретическими знаниями и разнообразными практическими навыками научно-исследовательской работы.

Целью настоящего раздела учебной программы является освоение студентами современных методов микробиологических и молекулярно-биологических исследований, усвоение ими принципов лабораторной практики и формирование у них устойчивых навыков использования основных молекулярно-биологических методик. В соответствии с целью практикума, на занятиях предполагается решить следующие **задачи**, предполагающие освоение:

1. основных принципов составления, приготовления и стерилизации питательных сред и растворов для культивирования микроорганизмов
2. методических подходов, позволяющих выделять микроорганизмы из естественной среды обитания и охарактеризовывать их физиолого-биохимические свойства;
3. основных принципов определения и расчета активностей ферментов;
4. основных методов работы с ДНК и белками;
5. методов введения ДНК в клетки микроорганизмов;
6. основных компьютерных программ, используемых для планирования и обработки результатов экспериментальных исследований в области молекулярной биологии;

Программа курса составлена с учетом межпредметных связей и программ по смежным учебным дисциплинам («Микробиология», «Генная инженерия», «Биохимия» и др.).

В ходе выполнения спецпрактикума студенты должны **знать**:

- принципы приготовления и стерилизации питательных сред для культивирования микроорганизмов;
- принципы выделения микроорганизмов из их естественной среды обитания;
- особенности транспорта углеводов в бактериальную клетку, основные компоненты ФТС-системы энтеробактерий;
- принципы определения и расчета активностей ферментов;
- механизмы полимеразной цепной реакции и секвенирования ДНК по Сэнгеру;
- принципы трансформации бактерий;
- принцип электрофореза биополимеров в агарозном или полиакриламидном геле;
- типы рестриктаз и правила работы с ферментами; иметь представление о системах рестрикции и модификации;
- основные компьютерные программы, используемые для планирования и

обработки результатов экспериментальных исследований в области молекулярной биологии;

уметь:

- получать накопительную культуру, выделять чистую культуру микроорганизмов;
- определять уровни активностей ферментов;
- выделять плазмидную ДНК методом щелочного лизиса;
- выделять хромосомную ДНК из бактерий;
- осуществлять ферментативные реакции с ДНК (рестрикция, лигирование и др.);
- трансформировать бактерии кальциевым методом;
- проводить электрофорез ДНК в агарозном геле;
- осуществлять амплификацию ДНК посредством полимеразной цепной реакции;
- секвенировать ДНК;
- проводить электрофорез белков в системе Леммли;
- определять концентрацию белка в растворе методом Брэдфорда и спектрофотометрически в УФ-области;
- осуществлять диализ растворов белка;
- осаждать белки различными способами;
- детектировать белки в смесях методом вестерн-блоттинга.

В соответствии с учебным планом продолжительность специального практикума на 3 курсе составляет 60 аудиторных часов, на 4 курсе – 170 часов. Программа практикума включает 4 взаимосвязанных раздела.

ПРИМЕРНЫЙ ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН

№ разделов и тем	Наименование разделов и тем	Аудиторные часы	
		Всего	Лабораторные занятия
3 курс			
1.	Микробиологические и биохимические методы исследования	40	40
2.	Особенности транспорта углеводов в клетки бактерий <i>Escherichia coli</i>	20	20
4 курс			
3.	Методы работы с ДНК	120	120
4.	Методы работы с белками	50	50
ИТОГО:		230	230

СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА

I. Микробиологические и биохимические методы исследования

Раздел I предполагает овладение наиболее общими методами исследования и методическими приемами в микробиологии, которые нашли широкое применение в молекулярной биологии. Раздел практикума, рассчитанный на 40 часов, включает 10 лабораторных занятий по темам:

1. Техника приготовления необходимых питательных сред, растворов, реактивов.
2. Взятие образцов из природных источников; получение накопительных культур.
3. Получение чистых культур бактерий на плотных питательных средах.
4. Изучение биологических свойств бактерий; описание роста исследуемой культуры на плотной и в жидкой питательной среде.
5. Изучение физиолого-биохимических свойств: отношение микроорганизмов к кислороду; определение роста при различных температурах.
6. Исследование способности бактерий образовывать внеклеточные ферменты и пигменты: определение лецитиназной активности, разжижение желатины, определение целлюлолитической, амилолитической, протеолитической активностей; выявление пигментов.
7. Построение кривой роста бактериальной культуры.
8. Измерение активностей внутриклеточных и внеклеточных активностей бактерий.
9. Количественное определение белка с Кумасси G-250 по методу Бредфорда.

II. Особенности транспорта углеводов в клетки бактерий *Escherichia coli*

Раздел II, рассчитанный на 20 часов занятий, знакомит студентов с основными особенностями транспорта углеводов в бактериальные клетки и позволяет получить навыки выявления мутантных штаммов и бактерий дикого типа. Для работы предложены 8 различных штаммов бактерий *Escherichia coli*: дикий тип, мутанты по *lac*-оперону, мутанты по ФТС-системе. В ходе прохождения спецпрактикума студентам предлагается определить, какие из данных штаммов являются мутантными и по каким генам.

Данный раздел спецпрактикума включает 5 лабораторных занятий по следующим темам:

1. Приготовление необходимых сред и реактивов. Приготовление растворов нужной концентрации (молярная концентрация, массовая доля вещества и др.).
2. Исследование способности бактерий утилизировать углеводы: ФТС-субстраты (глюкозу, фруктозу), не-ФТС субстраты I (лактозу), неФТС-

- субстраты II (ксилозу) с использованием индикаторной среды ЭМС.
3. Обнаружение эффекта диауксии у исследуемых бактерий *E. coli*.
 4. Измерение активности β -галактозидазы в клетках бактерий исследуемых штаммов.
 5. Количественное определение белка с Кумасси синим G-250 по методу Брэдфорда.

III. Методы работы с ДНК

Раздел, рассчитанный на 120 часов занятий, предполагает освоение студентами базовых методик выделения ДНК и ферментативных реакций с ней. На практических занятиях студенты также выполняют эксперименты, включающие последовательную постановку ферментативных реакций, анализ продуктов данных реакций методом гель-электрофореза, последующие выделение и рестрикционный анализом рекомбинантных молекул ДНК.

Данный раздел практикума включает 18 лабораторных занятий по следующим темам:

1. Выделение хромосомной и плазмидной ДНК из клеток бактерий (методы СТАВ, щелочного лизиса, очистка ДНК).
2. Электрофорез ДНК в агарозном геле (горизонтальный электрофорез в агарозном геле).
3. Полимеразная цепная реакция.
4. Клонирование продуктов амплификации в клетках *E. coli* (принципы работы с ферментами, освоение методов рестрикции, лигирования ДНК, кальциевой трансформации и электропорации бактериальных клеток).
5. Секвенирование ДНК.

IV. Методы работы с белками

Раздел IV предполагает ознакомление студентов с основными методами работы с белками, которые наиболее часто используются в молекулярно-биологических экспериментах, и рассчитан на 50 часов.

Данный раздел практикума включает 9 лабораторных занятий по следующим темам:

1. Электрофорез белков в системе Леммли. Построение зимограммы.
2. Фракционирование белков, методы осаждения и концентрирования белков.
3. Диализ растворов белков.
4. Определение концентрации белка в растворе.
5. Вестерн-блоттинг.

ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

ЛИТЕРАТУРА

О с н о в н а я :

1. *Досон Р.* Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. М.: Мир, 1991. 543с.
2. *Маниатис Т.* Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. М.: Мир, 1984.
3. Методы общей бактериологии: В 3 т. / Под ред. Герхардта Ф. и др. М.: Мир, 1984.
4. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер. М.: Мир, 1976. 436 с.
5. Новое в клонировании ДНК. Методы. / Под ред. Д. Гловера. М.Мир., 1989.
6. *Остерман Л.А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А. Остерман. М.: Наука. 1981.
7. *Патрушев Л. И.* Экспрессия генов / Л. И. Патрушев. М.: Наука, 2000.
8. *Русь О.Б.* Особенности транспорта углеводов в клетки бактерий *Escherichia coli*: метод. указания к лабораторным занятиям по разделу спецпрактикума / О.Б. Русь. Мн.: БГУ, 2007. 25с.
9. *Скоупс Р.* Методы очистки белков / Р. Скоупс. М.: Мир. 1985.
10. *Mathews С.К.* Biochemistry / С.К. Mathews, К.Е. van Holde, К. Ahern, 3d edition. 1999. 1200p.
11. *Postma Р.В.* Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria / Р.В. Postma, J.W. Lengeler, G.R. Jacobson. Microbiol reviews. 1993. V. 57, №3. P. 543-594.
12. Western Blotting. Handbook and troubleshooting guide. PIERCE. www.pierceenet.com/wb95d.

Д о п о л н и т е л ь н а я :

1. Аминокислоты, пептиды и белки. Дэвени Т., Гергей Я. Москва, Мир, 1976.
2. *Дамбре А.М.* Химия белка / А.М. Дамбре. М.: Мир, 1990.
3. *Скворцова И.Н.* Методы идентификации и выделения почвенных бактерий *Pseudomonas* / И.Н. Скворцова. М.: Изд-во МГУ, 1981. – 78 с.
4. Current protocols in molecular biology / Ed. by F.A.Ausubel, R.Brent, R.F.Kingston e.a. – New York: Greene Publishing, Wiley–Intersciens, 1992.
5. *Ishizuka H.* A lowered concentration of cAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in *Escherichia*

- coli* / H. Ishizuka, A. Hanamura, T. Kunitura, H. Alba. Mol Microbiol. 1993. V. 10, № 2. P. 341-50.
6. *Kundig W.* Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system / W. Kundig, S. Ghosh, S. Roseman. Proc Natl Acad Sci USA 1964. V. 52. P. 1067-1074.
 7. The protein protocols handbook. Second edition. Walker J.M. Humana Press, Hatfield, UK, 2002.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОРГАНИЗАЦИИ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

Для организации самостоятельной работы студентов по учебной дисциплине следует использовать современные информационные технологии: разместить в сетевом доступе комплекс учебных и учебно-методических материалов (программа, методические указания к лабораторным занятиям по разделам практикума, список рекомендуемой литературы и информационных ресурсов).

Эффективность самостоятельной работы студентов целесообразно проверять в ходе текущего и итогового контроля знаний.

ПЕРЕЧЕНЬ РЕКОМЕНДУЕМЫХ СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ

Учебным планом специальности 1-31 01 01 Биология (по направлениям) в качестве формы итогового контроля по учебной дисциплине рекомендован зачет. Для текущего контроля качества усвоения знаний студентами можно использовать следующий диагностический инструментарий:

- защита индивидуальных заданий при выполнении лабораторных работ;
- защита подготовленного студентом реферата;
- устные опросы.