

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, использующихся 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, использующиеся 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
<b>ИТОГО:</b>		<b>230</b>	<b>230</b>

## 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  $\beta$ -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](http://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. Kunimura, 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.