

Белорусский государственный университет

Факультет биологический

Кафедра физиологии человека и животных

СОГЛАСОВАНО

Председатель учебно-методической
комиссии биологического факультета



Поликсенова В. Д.

« 15 » 12 2017 г.

СОГЛАСОВАНО

Согласовано
Декан
биологического факультета



Лысак В. В.

« 15 » 12 2017 г.

ЭЛЕКТРОННЫЙ УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ

ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ФИЗИОЛОГИИ

Для специальности 1-31 01 01 Биология (по направлениям) специализаций
1-31 01 01-01 04 Физиология человека и животных и 1-31 01 01-02 04
Физиология человека и животных

Составитель: д.х.н., доцент В.А. Костюк

Рассмотрено и утверждено

на заседании Научно-методического совета БГУ « 10 » 12 2017 г.
протокол № 3

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Кафедра нормальной физиологии Учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Кульчицкий В.А., заместитель директора по научной и инновационной работе ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», д.м.н., академик

СОДЕРЖАНИЕ

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА	4
1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	5
2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	5
3. КОНТРОЛЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ	19
Структура рейтинговой системы	19
Задания и тесты для самоконтроля	19
Вопросы для подготовки к экзамену	20
4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ	22
Учебно-программные материалы	22
Список рекомендуемой литературы и Интернет-ресурсов	22

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Учебно-методический комплекс (УМК) по учебной дисциплине «Основы клеточной физиологии» создан в соответствии с требованиями Положения об учебно-методическом комплексе на уровне высшего образования и предназначен для студентов специальности 1-31 01 01 Биология (по направлениям) специализаций 1-31 01 01-01 04 и 1-31 01 01-02 04 Физиология человека и животных. Содержание разделов УМК соответствует образовательному стандарту высшего образования данной специальности. Главная цель УМК – оказание методической помощи студентам в систематизации учебного материала в процессе подготовки к аттестации по учебной дисциплине «Основы клеточной физиологии».

Структура УМК включает:

1. Учебно-методическое обеспечение дисциплины.

1.1. Теоретический раздел (учебные издания для теоретического изучения дисциплины).

1.2. Практический раздел (материалы для проведения лабораторных занятий по дисциплине в соответствии с учебным планом).

2. Контроль самостоятельной работы студентов (материалы текущей аттестации, позволяющие определить соответствие учебной деятельности обучающихся требованиям образовательного стандарта высшего образования и учебно-программной документации, в т.ч. задания для подготовки к экзамену, тесты, вопросы для самоконтроля и др.).

3. Вспомогательный раздел.

3.1. Учебно-программные материалы (учебная программа УВО).

3.2. Информационно-аналитические материалы (список рекомендуемой литературы, перечень электронных образовательных ресурсов и их адреса и др.).

Работа с УМК должна включать на первом этапе ознакомление с тематическим планом дисциплины, представленным в учебной программе. Для подготовки к лабораторным занятиям и промежуточным зачетам необходимо использовать материалы, представленные в разделе учебно-методическое обеспечение дисциплины, а также материалы для текущего контроля самостоятельной работы. В ходе подготовки к аттестации рекомендуется ознакомиться с требованиями к компетенциям по дисциплине, изложенными в учебной программе, структурой рейтинговой системы, а также перечнем вопросов к экзамену. Для написания рефератов могут быть использованы информационно-аналитические материалы, указанные в соответствующем разделе УМК.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Изданные учебные пособия и научные издания по клеточной физиологии для студентов биологических специальностей учреждений, обеспечивающих получение высшего образования:

Костюк В.А. Основы клеточной физиологии. Курс лекций. Минск: БГУ, 2016.

- доступно по адресу <http://elib.bsu.by/handle/123456789/163802>

В пособии в краткой форме изложены основы витальных процессов, протекающих на уровне клетки и отдельных внутриклеточных структур. Рассматриваются важнейшие структурно-функциональные элементы клетки как потенциальные мишени фармакологической терапии. Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», направления специальности 1-31 01 01-01 «Биология (научно-производственная деятельность)», 1-31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)», 1-31 01 02 «Биохимия».

Биорадикалы и биоантиоксиданты: Монография. В.А. Костюк, А.И.Потапович. – Мн.: БГУ, 2004. – 174 с.

- доступно по адресу: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/185159>

В монографии изложены современные представления о классификации, физико-химических свойствах, механизмах образования активных форм кислорода и других биорадикалов. Рассмотрены молекулярные основы их физиологического и патогенетического действия в организме, проанализированы пути детоксикации биорадикалов с помощью ферментативной защитной системы. Обобщены и проанализированы особенности взаимодействия биорадикалов с различными группами низкомолекулярных соединений-антиоксидантов, объединенных термином биоантиоксиданты. Особое внимание уделено флавоноидам, одной из наиболее интересных и интенсивно изучаемых групп природных антиоксидантов.

Предназначены для студентов биологических специальностей учреждений, обеспечивающих получение высшего образования, прежде всего для студентов биологического факультета специальности 1-31 01 01 «Биология», специализирующихся на кафедре физиологии человека и животных.

2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

В учебно-методических разработках приводятся рекомендации по выполнению лабораторных заданий по курсу «Основы клеточной физиологии», а также вопросы для самоподготовки к занятиям:

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА

к лабораторно-практическому занятию по курсу «Основы клеточной физиологии» для студентов IV курса.

Занятие 1 «Культивирование клеток человека»

Культивирование клеток представляет собой процесс, посредством которого *in vitro* отдельные клетки (или единственная клетка) прокариот и эукариот искусственно выращиваются в контролируемых условиях. Клеточная культура является одним из основных методов в области наук о жизни. Это общий термин, используемый при выделении клеток, тканей или органов из животных или растений и их последующего размещения в искусственной среде, благоприятной для выживания и/или пролиферации. На практике термин «культура клеток» относится в основном к выращиванию клеток, относящихся к одной ткани, полученных от многоклеточных эукариот, чаще всего животных. Историческое развитие технологии и методик выращивания культур клеток неразрывно связаны с выращиванием тканевых культур и целых органов.

Культура клеток используется в различных научных и практических областях для:

- исследования молекулярных основ жизнедеятельности различных клеток, тканей и организма в целом;
- Получения вакцин, моноклональных антител, гормонов и других секретируемых материалов;
- тестирования и изучение механизма действия различных веществ, которые могут быть использованы в качестве лекарственных препаратов, детергентов, косметических средств, инсектицидов, консервантов.

Результаты, полученные на клеточных культурах, нельзя экстраполировать на целый организм, но не вызывает сомнений, что если то или иное вещество оказывает повреждающее действие в нескольких линиях культивируемых клеток, то следует ожидать неблагоприятного эффекта и при введении этого вещества целому животному.

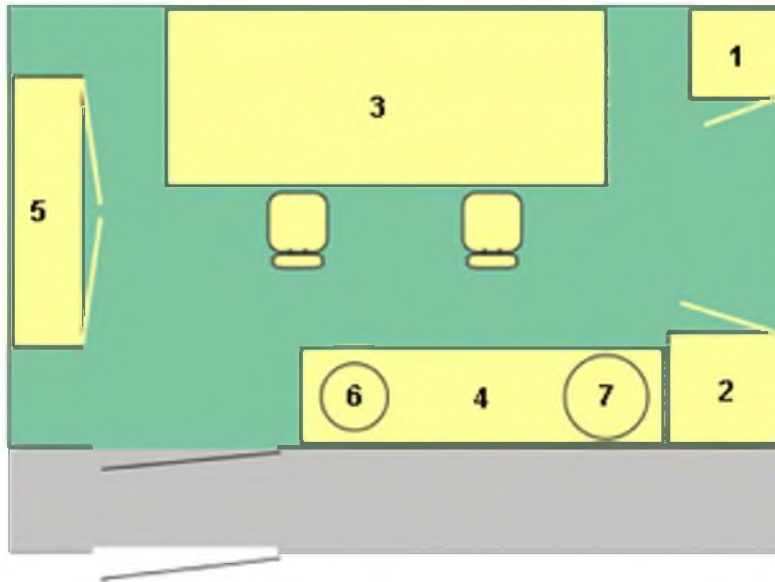
Культуры клеток, взятых непосредственно от объекта (*ex vivo*), называются первичными. Большинство первичных клеток имеют ограниченный срок использования. После определенного количества делений клетки такие стареют и прекращают делиться, хотя могут при этом сохранить жизнеспособность. Однако существуют иммортализованные («бессмертные») линии клеток, способные размножаться бесконечно. У большинства опухолевых клеток эта способность является результатом случайной мутации, но у некоторых лабораторных клеточных линий она приобретена искусственно, путём активации гена теломеразы. Клетки выращивают в специальных питательных средах, при постоянной температуре, а для клеток млекопитающих обычно необходима также специальная газовая среда, поддерживаемая в инкубаторе клеточных культур. Как правило, регулируется концентрация в воздухе углекислого газа и паров воды, но иногда также и кислорода. Для поддержания нормального функционирования культур клеток а также для предотвращения негативных явлений периодически проводят замену питательной среды, пассажирование и трансфекция клеток. Во избежание загрязнения культур бактериями, дрожжами, или другими линиями клеток, все манипуляции обычно проводят с соблюдением правил асептики в стерильном боксе. Для подавления микрофлоры в питательную среду могут быть добавлены антибиотики (пенициллин, стрептомицин) и противогрибковые препараты (амфотерицин Б).

Преимущества использования культуры клеток:

- дает возможность прижизненного наблюдения клеток с помощью микроскопа;
- культуры клеток являются генетически однородной популяцией клеток, находящихся в условиях, которые могут изменяться в соответствии с целями исследования;

- снимает многие этические и финансовые проблемы, возникающие при необходимости использовать для эксперимента большую группу животных

оборудование. культурального бокса



Помещение культурального блока:

предбоксник (серый цвет) и бокс (зеленый)

1 - CO₂-инкубатор

2 - холодильник

3 - ламинар

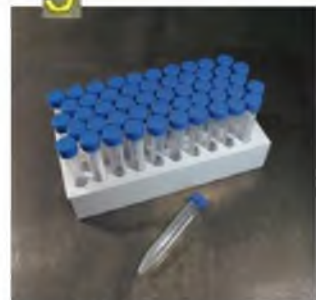
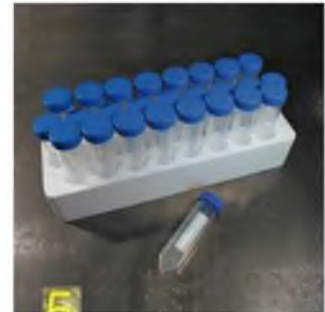
4 - стол с микроскопами:

световым (6)

и инвертированным световым (7)

5 - шкаф с посудой

Посуда, которая применяется при культивировании клеток



1. Пластиковые планшеты
2. Чашки Петри
3. Стеклянные флаконы
4. Плоскодонные бутылки
5. Стерильные пластиковые пробирки

Ход работы

Реактивы.

1. Питательная среда DMEM;
2. Бычья сыворотка;
3. Стерильный фосфатно-солевой буфер (PBS; pH 7,4);
4. Раствор трипсина (0,25%);

Специальное оборудование.

1. Ламинарный бокс (ламинар);
2. CO₂-инкубатор;
3. Инвертированный световой микроскоп с камерой Горяева для подсчета клеток;
4. Центрифуги;
5. Набор автоматических дозаторов с различной калибровкой;
6. Флаконы для культивирования клеток;
7. 6-, 24-, 96-луночные круглодонные планшеты для культур клеток;
8. Персональный компьютер и камера для выполнения микрофотографий.

1. Пересев клеток в 75 см флакон и 6-луночные планшеты

Подготовка

Надеть перчатки и разместить в ламинарном боксе:

- DMEM+10%FCS (СРЕДА) ≈ 40мл в 50 мл пробирке
- 0,05% трипсин+0,02% ЭДТА ≈ 4 в 15 мл пробирке
- PBS(-) (буфер) ≈ 25мл в 50 мл пробирке
- Необходимые флаконы и планшеты. Флаконы устанавливаем в вертикальное положение, откручиваем, но не снимаем пробки на флаконах и пробирках.

Пересев:

- Удаляем среду аспирацией
- Вносим 10 мл PBS(-) и промываем поверхность монослоя
- Удаляем буфер аспирацией
- Вносим 3 мл трипсина, плотно закрываем флакон
- Выключаем компрессор
- Относим флакон в инкубатор и инкубируем 10 мин
- В 50 мл пробирку добавляем 6 мл DMEM+10%FCS
- Забираем флакон, энергично встряхиваем, открываем и отбираем клетки и переносим суспензию в 50 мл подготовленную пробирку
- Промываем флакон 10 мл буфера и переносим его в 50 мл пробирку

- Центрифугируем 10 мин при 1500
 - Подписываем новый флакон и планшеты
 - Аспирируем надосадов и разбиваем осадок, проведя пробиркой вдоль решетки ламинара
 - 2 мл пипеткой добавляем 2 мл DMEM+10%FCS и осторожно пипетируем не допуская образования пузырей
 - Добавляем еще 3 мл среды и считаем клетки
 - Вносим в новый флакон 2 миллиона клеток и доводим объем среды до 20 мл
 - Разводим клетки средой до 50 000/мл, вносим 1 мл полученной суспензии и 1 мл среды в каждую лунку 6-луночного планшета
2. Снятие клеток (6-луночные планшеты)

Подготовка

Надеть перчатки и разместить в ламинаре:

- **DMEM+10%FCS (СРЕДА) 25-30мл в 50 мл пробирке**
- 0,05% трипсин+0,02% ЭДТА ≈ 14 в 15 мл пробирке
- PBS(-) (буфер) ≈45мл в 50 мл пробирке
- Откручиваем, но не снимаем пробки на флаконах и пробирках.

Снятие клеток:

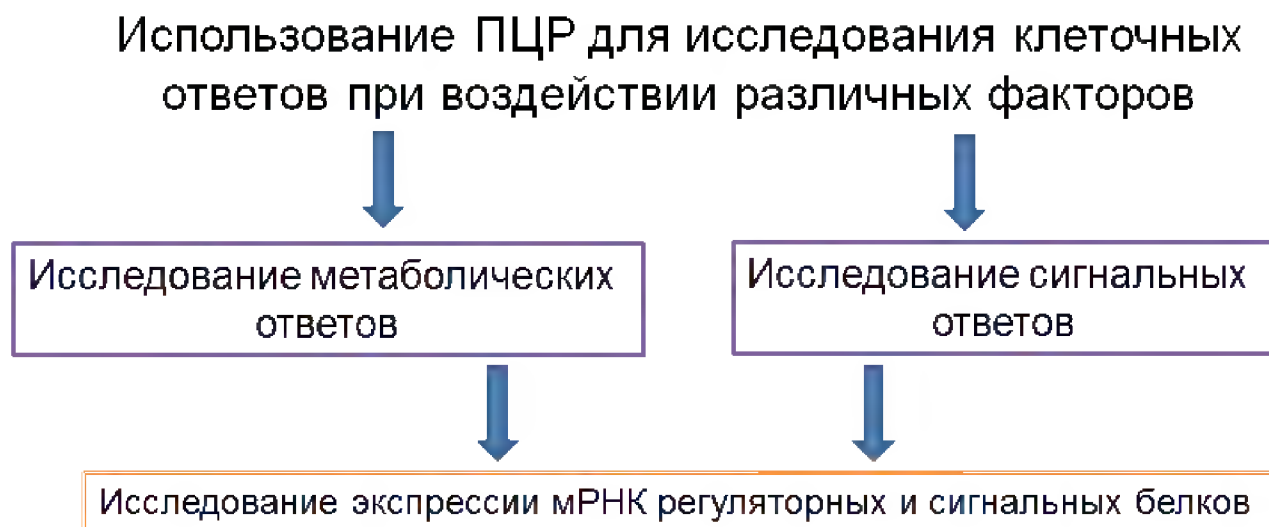
- Удаляем PBS(+) аспирацией
- Вносим 1 мл трипсина в каждую лунку, закрываем планшет
- Выключаем компрессор
- Относим планшет в инкубатор и инкубируем 12-15 мин
- Подготавливаем 6 15 мл пробирок, маркируем от 1 до 6 и добавляем в каждую 4 мл DMEM+10%FCS
- Забираем планшет, энергично встряхиваем, объединяем клетки из двух лунок в соответствии со схемой и переносим суспензию в соответствующую 15 мл подготовленную пробирку
- Промываем каждую лунку 2 мл PBS(-) и переносим его в соответствующую 15 мл пробирку, осторожно пипетируем
- Центрифугируем 10 мин при 1500
- Аспирируем надосадов и добавляем 1 мл PBS(-), осторожно пипетируем и переносим в предварительно маркированный эпендорф.
- **Центрифугируем 10 мин при 2500-3000**
- Аспирируем надосадов и добавляем добавляем 200 мкл H₂O+EDTA.

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА

к лабораторно-практическому занятию по курсу «Основы клеточной физиологии» для студентов IV курса.

Занятие 2 «Выделение общей РНК, для последующего проведения ПЦР в реальном времени»

В последние годы для исследования клеточных ответов при воздействии на организмы различных факторов как внешних, так и внутренних используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с помощью которой оценивают уровень экспрессии генов, кодирующих белки-регуляторы физиологических процессов:



- Выделение общей РНК
- Реакция обратной транскрипции, получение кДНК
- ПЦР в реальном времени

В цитоплазме находится большое количество молекул матричной РНК (мРНК), образовавшихся в ядре в результате процесса транскрипции и кодирующих структуру всех белков, синтезируемых в клетке. Экспрессия гена приводит к увеличению в клетке количества соответствующей мРНК и соответственно к возрастанию синтеза определенного белка в рибосомах. Однако подавляющее большинство РНК содержащееся в клетке не кодируют белок. Эти некодирующие РНК могут транскрибироваться с отдельных генов (например, рибосомальные РНК) или быть производными интронов. Классические, хорошо изученные типы некодирующих РНК — это транспортные РНК (тРНК) и рРНК, которые участвуют в процессе трансляции. Существуют также классы РНК, ответственные за регуляцию генов, процессинг мРНК и другие роли. Для использования в последующих аналитических этапах из биологического материала и в частности культивируемых клеток выделяют фракцию общей РНК. Один из наиболее распространенных методов выделения основана на использовании Trizol Reagent.

Выделение РНК фенол-хлороформным методом с использованием TRIzol Reagent (Invitrogen)

(Chomczynski P., Sacchi N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156)

Реактивы.

5. Trizol Reagent ([Invitrogen](#), #15596018, #15596026);
6. изопропиловый спирт;
7. этиловый спирт (70 %);
8. деионизированная вода.

Специальное оборудование.

9. Ламинарный бокс (ламинар);
10. Центрифуги;
11. Набор автоматических дозаторов с различной калибровкой;
12. 6-луночные планшеты для культивирования клеток;

Подготовка

Надеть перчатки и разместить в ламинарном боксе планшет с клетками и необходимые реактивы

Ход выделения:



Интактные или замороженные клетки (-20 -80 C)




Добавление TRIzol Reagent к клеткам

**Лизис клеток (TRIzol, разрушая клеточные мембраны, сохраняет целостность РНК)**


1. Во флакон с клетками (монослой) добавить **TRIzol** (содержит фенол и гуанидин изотиоционат) из расчета 1 мл на 10 см², не учитывая количество клеток.
2. 15-30 °C / 5 мин
3. Перенести лизат в микроцентрифужную пробирку

Разделение органической и водной фаз


4. Добавить хлороформ из расчета (0,2 мл на 1 мл **TRIzol**)
5. Интенсивно встряхивать флакон 15 сек.
6. 15-30 °C / 3 мин
7.  / 10 000 g / 15 мин / 4 °C

8. Получаем внизу фенол-хлороформную красную фазу, интерфазу белого цвета и сверху – водную прозрачную фазу, содержащую РНК. Объем верхней фазы должен составлять 60 % от добавленного **TRIzol**.

Преципитация РНК

9. Переносим водную фазу в новую чистую микропробирку
 10. Добавляем изопропанол (0,5 мл изопропанола на 1 мл **TRIzol**)
 11. 15-30 °С / 10 мин
 12.  / 10 000 g / 10 мин / 4 °С

Промывка РНК

13. Удалить супенатант
 14. Добавить 75 %-ый этанол (1 мл на 1 мл **TRIzol**)
 15. Тщательно перемешать
 16.  / 7 500 g / 5 мин / 4 °С

Перевод РНК в раствор

17. Удалить этанол
 18. Подсушить РНК, оставив на 5-10 минут пробирку открытой в ламинарном боксе.
 19. Добавить 40 мкл деионизированной воды.

Определение количества и качества общего РНК

Для определения количества общего РНК к 10 мкл раствора РНК добавляют 990 мкл деионизированной воды и определяют поглощение полученного раствора при 260 и 280 нм в 1 см кварцевых кюветках. Качество общей РНК считается приемлемым для дальнейших исследований если соотношение поглощения при 260 нм к поглощению при 280 нм равно или выше 1,8.

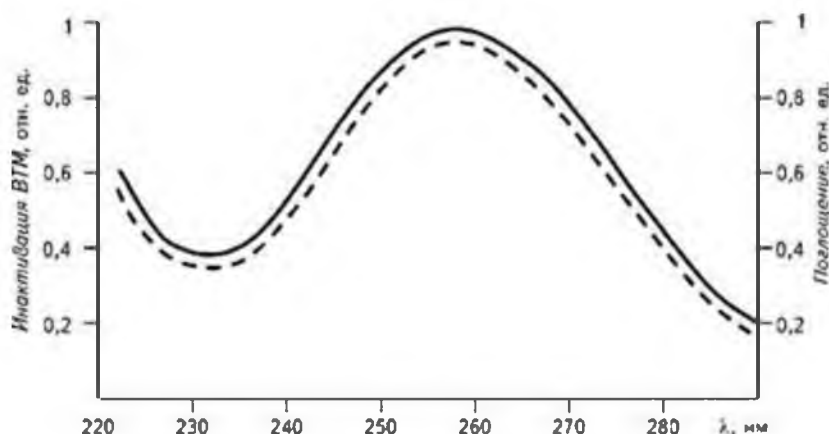


Рисунок. УФ-спектр поглощения раствора общей РНК, концентрация 40 мкг/мл

При расчете количества РНК исходят из того, что при концентрации общей РНК в растворе 40 мкг/мл поглощение при 260 нм (A_{260}) равно 1 (рисунок).

Отсюда:

$$\text{концентрация РНК (мкг/мл)} = A_{260} \times 40$$

$$\text{концентрация РНК (мг/мл)} = A_{260} \times 0,040$$

$$\text{Концентрация РНК в элюате (мг/мл)} = A_{260} \times 0,040 \times 100 = A_{260} \times 4$$

МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА

к лабораторно-практическому занятию по курсу «Основы клеточной физиологии» для студентов IV курса.

Занятие 3 «Количественное определение относительной экспрессии мРНК медиаторов воспаления в культивируемых клетках» (Симуляционное обучение).

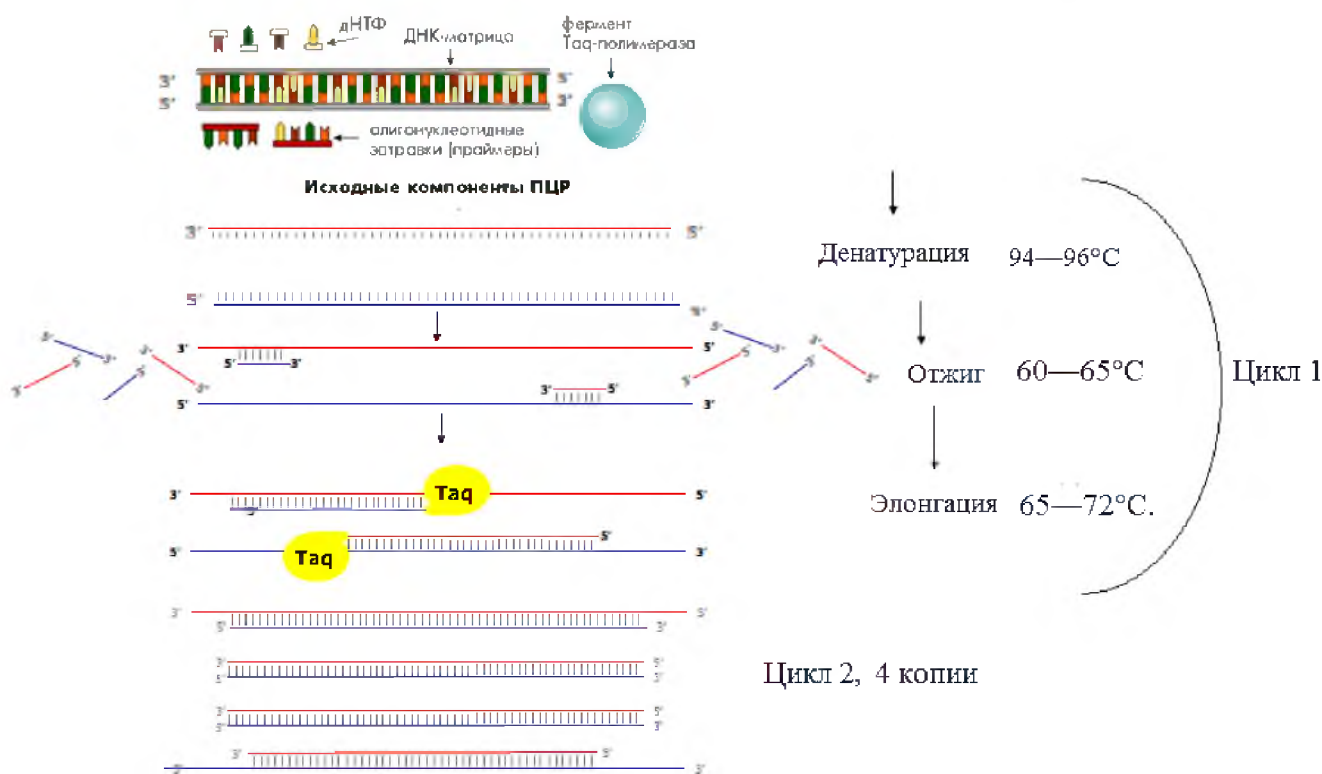
Полимеразная цепная реакция

метод молекулярной биологии, значительно увеличивающий концентрацию определённых фрагментов ДНК в биологическом материале (пробе).

Компоненты реакции

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (*Taq*-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-полимераза), *Pyrococcus woesei* (*Pwo*-полимераза), *Thermus thermophilus* (*Tth*-полимераза) и другие.
- Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствор



Праймеры

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами, короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18—30 оснований. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка.

После гибридизации матрицы с праймером (отжиг), последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы. Важнейшая характеристика праймеров — температура плавления (T_m) комплекса праймер-матрица.

При выборе праймеров желательно придерживаться следующих критериев:

- GC-состав ~ 40—60 %;
- T_m праймеров 55°C - 60°C
- близкие T_m праймеров (отличия не более, чем на 3 °C);
- отсутствие неспецифических вторичных структур — шпилек и димеров;
- желательно, чтобы на 3'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.

Последовательность действий по подбору специфичных праймеров на примере фермента супероксиддисмутаза 2 (СОД 2):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>
SOD2 superoxide dismutase 2 Homo sapiens

See SOD2 superoxide dismutase 2, mitochondrial in the Gene database
sod2 reference sequences Genomic (1)Transcript (3)Protein (3)

Homo sapiens superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2), transcript variant 1, mRNA
NCBI Reference Sequence: NM_000636.2

Analyze this sequence
Run BLAST
Pick Primers
Highlight Sequence Features
Find in this Sequence

Задание: используя ресурс <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> подобрать олигомерные праймеры для определения экспрессии мРНК интерлейкинов 6 и 8, циклооксигеназы 2 (ЦОГ 2) методом ПЦР в реальном времени.

Анализ экспрессии медиаторов воспаления в эндотелиальных клетках человека с помощью
ПЦР в реальном времени

Протокол эксперимента 1

Дата

1. Таблица используемых праймеров:

N/N	Primers	N/N	Primers
1	COX-2 sense	7	10 IL-1 α f
	COX-2 antisense		10 IL-1 α f
2	TNF- α sense	8	SOD2 sense
	TNF- α antisense		SOD2 antisense
3	β -actin sense	9	MCP1 sense
	β -actin antisense		MCP1 antisense
4	18S rRNA sense	10	IL-8 sense
	18S rRNA antisense		IL-8 antisense
5	IL-6 sense	11	NOX1 sense
	IL-6 antisense		NOX1 antisense
6	iNOS: sense		
	iNOS: antisense		

2. Анализируемые образцы

Образец 1	Эндотелиальные клетки + ДМСО (контроль) Время инкубации 6 ч
Образец 2	Эндотелиальные клетки + окисленные ЛПНП (окЛПНП). Время инкубации 6 ч

3. Приготовление реакционной смеси для проведения ПЦР в реальном времени

Реакционная смесь 1

Реагенты	Объем на 1 лунку, мкл	Общее кол-во на 25 лунок
H ₂ O	6,5	162,5
кDNA образец 1	1,0	50
IQ SYBR Green SuperMix	12,5	312
Всего в ячейку	20,0	499,5
Кол-во праймера в лунке		5,0 мкл

Реакционная смесь 2

Реагенты	Объем на 1 ячейку, мкл	Общее кол-во на 25 ячеек
H ₂ O	6,5	162,5
кDNA образец 2	1,0	50
IQ SYBR Green SuperMix	12,5	312
Всего в ячейку	20,0	499,5
Кол-во праймера в лунке		5,0 мкл

4. Подготовка 48-луночного планшета для проведения ПЦР в соответствии со следующей схемой:

	1	2	3	4	5	6	
A	COX	TNF	18S rRNA	IL-6	iNOS	β Actin	Образец 1
B	COX	TNF	18S rRNA	IL-6	iNOS	β Actin	
C	IL-1αf	SOD2	MCP1	IL-8	NOX1	β Actin	
D	IL-1αf	SOD2	MCP1	IL-8	NOX1	Blank	
E	COX	TNF	18S rRNA	IL-6	iNOS	β Actin	Образец 2
F	1 COX	TNF	18S rRNA	IL-6	9 iNOS	β Actin	
G	IL-1αf	SOD2	MCP1	IL-8	NOX1	β Actin	
H	IL-1αf	SOD2	MCP1	IL-8	NOX1	Blank	

5. Проведение ПЦР на приборе "Opticon Monitor 3"

Задание А. Запустить на компьютере программу Opticon Monitor 3

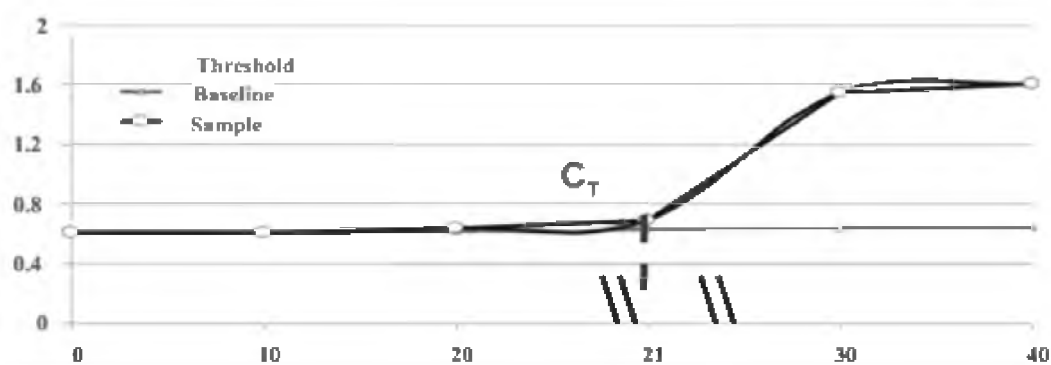
Задание Б. В режиме "Master" выбрать опцию "Plate Setup", затем "Edit" и обозначить лунки с образцами и Blank (холостая проба без добавления праймеров), выбрать тип планшета (MJ White) и флуоресцентного красителя (SYBR Green, SBG1)

Задание В. В режиме "Master" выбрать опцию "Protocol Setup", затем "Edit". Ввести объем анализируемого образца в каждой лунке (25 мкл) и протокол проведения ПЦР и последующего плавления образовавшегося продукта:

1. Инкубация при 94°C 3 сек
2. Инкубация при 94°C 15 сек
3. Инкубация при 55°C 60 сек
4. Инкубация при 65°C 5 сек
5. Считывание флуоресцентного сигнала
6. Повтор от пункта 2 до пункта 5 - 30 раз
- 7 Плавление от 65°C до 94°C

6. Анализ полученных результатов:

А. После завершения процесса ПЦР и плавления в режиме "Quantification" используя опции "Graphs" и "Calculation" определить значения порогового цикла (C_T) (см. рисунок).



Пороговый цикл (C_T) соответствует точке (циклу) на кривой зависимости флуоресценции от количества циклов ПЦР при котором уровень флуоресценции заметно выше базового уровня

Пример расчета относительного уровня экспрессии (ген MCP 1)

Условия эксперимента	C _T		$\Delta C_T = C_T \text{ MCP1} - C_T \beta\text{actin}$	$\Delta\Delta C_T$	Уровень экспрессии к контролю
	MCP1	HKG (βactin)			
Эндотелиальные клетки (контроль)	30,26	14,70	15,57	0,00	1,00
Эндотелиальные клетки + окЛПНП (опыт)	26,99	14,48	12,51	-3,06	8,34

Где: $\Delta\Delta C_T = O\Delta C_T - K\Delta C_T = \text{Опыт}\Delta C_T - \text{Контроль}\Delta C_T$

относительный уровень экспрессии = $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Задание А. Определить значения C_T для всех анализируемых кДНК.

Задание Б. Рассчитать относительный уровень экспрессии мРНК медиаторов воспаления в эндотелиальных клетках после их инкубации с окисленными липопротеидами низкой плотности

3. КОНТРОЛЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

Структура рейтинговой системы

Структура рейтинговой системы приведена в учебной программе по дисциплине «Основы клеточной физиологии» по специальности 1-31 01 01 Биология (по направлениям) специализаций 1-31 01 01-01 04 и 1-31 01 01-02 04 Физиология человека и животных, которая доступна по адресу:

<http://elib.bsu.by/handle/123456789/169374>

Задания для самоконтроля

Основные темы курса	Вопросы для самоконтроля
1. Молекулярная организация и физиологические функции внутриклеточных структур.	<ul style="list-style-type: none"> • Клеточные мембраны, молекулярная организация и основные функции; • Энергетические процессы в цитоплазме и митохондриях; • Микросомальная монооксигеназная система и детоксикация ксенобиотиков.
2. Общие принципы функционирования системы меж и внутриклеточной сигнализации.	<ul style="list-style-type: none"> • Нервная и гуморальная регуляция как единая система регуляции обмена веществ в ответ на изменение условий существования живых организмов; • механизмы интеграции и модуляции межклеточных сигналов. Модульный принцип в формировании трехмерной структуры внутриклеточных компонентов сигнальной трансдукции.
3. Сигнальные молекулы.	<ul style="list-style-type: none"> • Современные представления о сигнальной трансдукции посредством гидрофобных молекул; • особенности передачи сигналов гидрофильными молекулами, молекулярная структура ядерных рецепторов; • биосинтез и физиологическая роль простагландинов в клетке. Циклооксигеназы, как мишень нестероидных противовоспалительных препаратов; • классификация и физиологическая роль цитокинов.
4. рецепция и внутриклеточная трансдукция	<ul style="list-style-type: none"> • Основные типы поверхностных клеточных рецепторов, их структурные и функциональные особенности;

<p>биосигналов.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • фосфатидилинозитольный путь внутриклеточной коммуникации, инозитол 1,3,4-трифосфат и диацилглицерол - вторичные посредники передачи сигнала; • Ионы кальция как второй посредник внутриклеточной передачи сигналов, регуляция уровня кальция в цитоплазме клетки, кальмодулин; • митоген-активируемые протеинкиназы (МАП-киназы).
<p>5. Биорадикалы и их роль в физиологии и патофизиологии клетки</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Классификация биорадикалов и пути их образования в клетке; • окислительный стресс и факторы способствующие его развитию; • Сигнальная роль АФК и пероксидов, образование и физиологическая роль монооксида азота в нервной системе, эндотелии и клетках иммунной системы.
<p>6. Старение и смерть клетки.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Биологическое значение апоптоза. Морфологические и биохимические признаки апоптоза и некроза; • сигнальная трансдукция при внешнем иницировании апоптоза. Сигнальная трансдукция в случаях внутриклеточного иницирования апоптоза.

Вопросы для подготовки к экзамену

1. Клеточные мембраны, молекулярная организация и основные функции.
2. Цитоплазма и клеточные органеллы. Энергетические процессы в цитоплазме и митохондриях.
3. Лизосомы: классификация, структура и функции. Роль лизосом в патологии и терапии.
4. Эндоплазматический ретикулум (ЭР). Микросомальная монооксигеназная система и детоксикация ксенобиотиков.
5. Аппарат Гольджи, его структура и физиологическая роль.
6. Цитоскелет, общая характеристика. Структура и функции актиновых филаментов, микротрубочек и промежуточных филаментов.
7. Клеточные контакты и внеклеточные структуры.
8. Нервная и гуморальная регуляция как единая система регуляции обмена веществ в ответ на изменение условий существования живых организмов. Гуморальное звено в нервной регуляции. Клеточные рецепторы гуморальных сигналов и их роль в селективном «считывании» информации.

9. Основные системы межклеточной коммуникации: эндокринная, паракринная, аутокринная.
10. Концепция первого и второго посредников. Внутриклеточный каскадный механизм. Механизмы интеграции и модуляции межклеточных сигналов.
11. Модульный принцип в формировании трехмерной структуры внутриклеточных компонентов сигнальной трансдукции.
12. Многообразие сигнальных молекул, гидрофильные и гидрофобные сигнальные молекулы.
13. Современные представления о сигнальной трансдукции посредством гидрофобных молекул.
14. Специфика передачи сигналов гидрофильными молекулами.
15. Общие представления о роли гормонов в системе межклеточной коммуникации и регуляции метаболизма. Классификация гормонов по химическому строению (биогенные амины, стероиды, пептиды) и биологическим функциям.
16. Основные гормоны, регулирующие метаболизм и развитие.
17. Общие представления о паракринной и аутокринной коммуникации. Простагландины и лейкотриены. Химическая структура, номенклатура и классификация. Биосинтез и биodeградация простагландинов в клетке.
18. Монооксид азота, пути образования и типы NO-синтаз. Физиологическая роль монооксида азота.
19. Цитокины и факторы роста.
20. Основные типы поверхностных клеточных рецепторов, их структурные и функциональные особенности. Рецепторы, управляющие трансмембранными ионными каналами.
21. Рецепторы, связанные с G-белками. G белки.
22. Рецепторы, связанные с ферментами: классификация и важнейшие лиганды.
23. Циклические АМФ и ГМФ как вторичные посредники, роль протеинкиназ и фосфорилирования белков.
24. Роль фосфатидилинозитольного цикла во внутриклеточной коммуникации, инозитол 1,4,5-трифосфат, инозитол 1,3,4-трифосфат и диацилглицерол - вторичные посредники передачи сигнала.
25. Ионы кальция - вторичный посредник, регуляция уровня кальция в цитоплазме клетки, биологическая роль кальция, кальмодулин, Ca^{2+} -каналы.
26. Митоген-активируемые протеинкиназы (МАП-киназы).
27. Классификация биорадикалов и пути образования в клетке.
28. Физиологические механизмы антиокислительной защиты. Биохимические механизмы антиокислительной защиты. Антиоксидантная ферментная система: ключевые ферменты и молекулярные механизмы действия.
29. Система низкомолекулярных антиоксидантов.
30. Роль биорадикалов в процессах биосигнализации. Биорадикалы в системе неспецифического иммунитета.
31. Окислительный стресс и факторы способствующие его развитию.
32. Понятие об остром и хроническом воспалении. Биосигнализация

- воспаления.
33. Атеросклероз - результат хронического воспаления сосудистой стенки магистральных сосудов.
 34. Основные пути гибели клеток. Апоптоз и некроз. Биологическое значение апоптоза.
 35. Морфологические признаки апоптоза и некроза. Биохимические признаки апоптоза и некроза. Каспазы.
 36. Пути передачи сигналов при внешнем инициировании апоптоза и внутриклеточном инициировании апоптоза.

4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

Учебно-программные материалы

Учебная программа учреждения высшего образования по учебной дисциплине для специальности 1-31 01 01 Биология (по направлениям) специализаций 1-31 01 01-01 04 Физиология человека и животных и 1-31 01 01 02 04 Физиология человека и животных доступна по адресу

<http://elib.bsu.by/handle/123456789/169374>

Список рекомендуемой литературы и Интернет-ресурсов

Список рекомендуемой литературы и Интернет-ресурсов приведен в учебной программе учреждения высшего образования по учебной дисциплине для специальности 1-31 01 01 Биология (по направлениям) специализаций 1-31 01 01-01 04 Физиология человека и животных и 1-31 01 01 02 04 Физиология человека и животных и доступен по адресу:

<http://elib.bsu.by/handle/123456789/169374>