

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Биологический факультет
Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений

СОГЛАСОВАНО

Председатель учебно-методической
комиссии биологического факультета
Поликсенова В.Д.



«26» октября 2016 г.

СОГЛАСОВАНО

Декан
биологического факультета
Лысак В.В.



«26» октября 2016 г.

Регистрационный номер № УД-548

**ЭЛЕКТРОННЫЙ УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ
КОМПЛЕКС ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ**

**Информационные структуры
растительной клетки**

для специальности
1-31 01 01 Биология (по направлениям)
специализаций 1-31 01 01-01 03 Физиология растений и
1-31 01 01-02 03 Физиология растений

Составитель: канд. биол. наук Чижик О.В.

Рассмотрено и утверждено
на заседании
Научно-методического совета БГУ

« 01 » ноября 2016 г.

протокол № 1

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Кафедра биотехнологии и биоэкологии УО «Белорусский государственный технологический университет»;

В.П. Шуканов, заведующий лабораторией физиологии патогенеза и болезнеустойчивости растений ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси», кандидат биологических наук

СОДЕРЖАНИЕ

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА	4
1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	5
2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	5
3. КОНТРОЛЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ	29
Темы рефератов и вопросы для самоконтроля	29
Задачи и тесты для проверки знаний	31
Вопросы для подготовки к зачету	36
Методика формирования итоговой оценки	37
4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ	38
Учебно-программные материалы	38
Список рекомендуемой литературы и Интернет-ресурсов	38

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Учебно-методический комплекс (УМК) по учебной дисциплине «Информационные структуры растительной клетки» 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 03 и 1-31 01 01-02 03 Физиология растений. 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.

Структура УМК включает:

1. Учебно-методическое обеспечение дисциплины.

1.1. Теоретический раздел (учебное издание для теоретического изучения дисциплины в объеме, установленном типовым учебным планом по специальности).

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 образовательному стандарту высшего образования и учебно-программной документации, в т.ч. вопросы для подготовки к зачету, задания, тесты, вопросы для самоконтроля, тематика рефератов 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, а также перечнем вопросов к зачету. Для написания рефератов могут быть использованы информационно-аналитические материалы, указанные в соответствующем разделе УМК.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Курс лекций для студентов биологического факультета БГУ

Решетников, В.Н. Информационные структуры растительной клетки: курс лекций / В.Н. Решетников, Е.В. Спиридович. – Минск БГУ, 2008. – 104 с. доступен по адресу:

<http://elib.bsu.by/handle/123456789/19802>

В курсе лекций рассматриваются информационные структуры растительной клетки, сосредоточенные в ядре, хлоропластах и митохондриях. Представлены современные данные об универсальной природе кода ДНК, специфичности «гистонового кода» и механизмах его расшифровки у растений.

2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Учебно-методическое пособие

Информационные структуры растительной клетки: метод. рекомендации к лаб. занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов / сост. О. В. Чижик, В.Н.Решетников.– Минск: БГУ, 2016. – 38 с. (в печати)

В пособии описаны теоретические основы и практические методики, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов по специальному курсу «Информационные структуры растительной клетки». Растительная клетка рассматривается с точки зрения биологии, согласно которой информационные сети локализованы в трех основных структурах: клеточном ядре, пластидах (характерные компоненты растительных клеток) и митохондриях, в которых ДНК осуществляет информационное обеспечение, описаны методы выделения этих органелл из растительной ткани.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Представленное методическое пособие входит в состав учебно-методического комплекса по специальному курсу «Информационные структуры растительной клетки», который читается студентам-биологам, специализирующимся на кафедре клеточной биологии и биоинженерии растений.

Пособие предлагает рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов-биологов. Тематика лабораторных работ определяется программой курса «Информационные структуры растительной клетки» и позволит закрепить и расширить полученные знания.

Задания для учащихся будут способствовать систематизации знаний и позволят самостоятельно проводить контроль усвоения теоретического материала.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ВЫДЕЛЕНИЕ ОРГАНЕЛЛ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Для того чтобы изучить состав и функции клеток и субклеточных органелл, применяют метод дифференциального центрифугирования.

Дифференциальное центрифугирование субклеточных органелл основано на различии в их размерах и плотности. Дифференциальное центрифугирование используется для разделения компонентов гомогената на ряд фракций (обычно пять): ядра, хлоропласты, митохондрии, рибосомы и надосадочная фракция (смесь растворимой фазы цитоплазмы с растворимым содержимым вакуоли и любых других разрушившихся органелл). Каждая из фракций осаждается при определенной скорости центрифугирования и времени. При высокоскоростном центрифугировании крупные компоненты клетки (например, ядра) быстро оседают (седиментируют) при относительно низких скоростях и образуют осадок на дне центрифужной пробирки. При более высоких скоростях в осадок выпадают более мелкие компоненты, такие как хлоропласты и митохондрии.

Разрушение клеток проводят в изотонической среде в гомогенизаторах. Полученную однородную массу (гомогенат) затем разделяют на фракции методом центрифугирования, теория которого излагается по Л. А. Остерману (Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование: Практич. пособие.– М., 1981.– С.286).

Лабораторная работа № 1

ВЫДЕЛЕНИЕ ИНТЕРФАЗНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ИЗ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Вводные пояснения.

В последние десятилетия значительно усилились и углубились исследования в области физиологии и биохимии клеточных ядер, что определяется их ведущей ролью в качестве основного центра наследственной информации (И.Б.Збарский, 1988; C.L.Woodcock, 1999; Е.А.Эренпрейса, 1990).

Важное место в таких исследованиях занимает детализация состава и структуры клеточного ядра, к которым относится изучение белковой составляющей, образующей основную часть ядра и характеризующейся высокой гетерогенностью, специфичностью и динамичностью.

Интерфазные клеточные ядра являются носителями наследственной информации. В них протекают важнейшие процессы, связанные с наследственным статусом организма – репликация и транскрипция. Кроме того, ядро является источником и местом локализации отдельных белков и ферментов, необходимых для жизнедеятельности дифференцированных тканей. Как правило, ядро функционирует дискретно, т.е. его активность периодически

изменяется (В.Н. Решетников /Клеточные ядра высших растений // Минск, наука і техника», 1992).

В клетках эукариот, имеющих ядра значительной величины, отделение их от других органелл достигается дифференциальным центрифугированием. При выделении ядер из растительного материала возникают значительные трудности, связанные с особенностями клеток растений. Введение в среду выделения гексиленгликоля (2-Methyl-2,4-pentanediol) и соли защищает ядра от разрушения, добавление неионного детергента (Triton X-100) облегчает высвобождение ядер из клеток и предотвращает агрегацию ядер. Дифференциальное центрифугирование помогает избавиться от загрязнений другими клеточными структурами – крахмалом, пластидами, митохондриями, обрывками клеток и мембран. Качество и чистота ядерных препаратов оценивается на основании целостности морфологической структуры ядра при помощи световой и электронной микроскопии, а также испытывается маркерными ферментами и красителями.

Методика выделения интерфазных клеточных ядер основана на выделении субклеточных структур растительных клеток с использованием разделения их на составные части центрифугированием.

При центрифугировании крупные ядра оседают (седиментируют) при относительно низких скоростях и образуют осадок на дне центрифужной пробирки.

В основе работ по получению препаратов изолированных клеточных ядер положены коллективные разработки лаборатории биохимии и биотехнологии растений, изложенные в ряде печатных работ [1,3,6].

Материалы и оборудование: 1) семена злаковых растений (*Secale cereale* L.) 2) гексиленгликоль (2-Methyl-2,4-pentanediol), 3) PIPES-KOH, 4) магний хлористый ($MgCl_2$), 5) Triton X-100, 6) меркаптоэтанол (2-mercaptoethanol), 7) ингибитор протеаз (PMSF), 8) фарфоровая ступка с пестиком, 9) miracloth (марля), 10) электронные весы, 11) рН-метр, 12) магнитная мешалка с якорем, 13) автоматические вариопипетки, 14) пробирки центрифужные (2 шт.), 15) центрифуга с охлаждением, 16) воронка, 17) колотый лед (хладозаполнитель), 18) глицерол, 19) детергент (мыльный раствор), 20) фильтровальная бумага, 21) поддон, 22) термостат, 23) перчатки, 24) шпатель, 25) ножницы

Ход работы

1. Подготовка растительного материала

1.1 Посадка семян. Семена злаковых обработайте детергентом (промойте мыльным раствором) и поместите на поддон, покрытый увлажненной водопроводной водой фильтровальной бумагой.

Поддоны поместите в термостат при температуре 22°C и проращивайте в темноте в течение 2 суток.

1.2 Срезка проростков. Проростки срежьте и измельчите ножницами. Взвесьте 10 г растительного материала.

2. Приготовление буферов для выделения интерфазных клеточных ядер

2.1 Приготовьте буфер для гомогенизации растительного материала

Состав буфера для растирания (РБ):

1M 2-Methyl-2,4-pentanediol (гексиленгликоль)

10 mM PIPES-КОН (pH 7,0)

10 mM MgCl₂

0,2% Triton X-100

5 mM 2-mercaptoethanol

0,8 mM PMSF

2.2 Приготовьте буфер для отмывки клеточных ядер

Состав буфера для отмывки (ОБ):

0,5M 2-Methyl-2,4-pentanediol (гексиленгликоль)

10 mM PIPES-КОН (pH 7,0)

10 mM MgCl₂

0,2% Triton X-100

5 mM 2-mercaptoethanol

0,8 mM PMSF

3 Выделение интерфазных клеточных ядер

3.1 *Измельчение растительного материала.*

Навеску растительной ткани (10 г), измельченную ножницами на кусочки длиной 1–2 см в предварительно охлажденных ступках на холоду, разотрите пестиком с добавлением 40 мл РБ буфера до однородной массы. Консистенцию гомогената контролируйте визуально.

3.2 *Фильтрация.*

Перенесите гомогенат из ступки с помощью шпателя в воронку с 4 слоями miracloth (или 6 слоями марли) и профильтруйте в центрифужную пробирку. Полученный фильтрат – это клеточный сок, содержащий органеллы и загрязненный обрывками клеток и крахмала.

3.3. *Осаждение ядер.*

Экстракт отделите от осадка центрифугированием в бакет-роторе в течение 20 мин при 25g и температуре 4°C. При центрифугировании осаждаются

обрывки клеток и крахмал. Осторожно (т.к. осадок рыхлый) отделите супернатант от осадка. Далее супернатант, содержащий ядра и другие органеллы, центрифугируйте при 350g при температуре 4°C в течение 20 мин. При этом ядра осаждаются. Осторожно слейте супернатант. В дальнейшей работе используйте осадок.

3.4 *Отмывка ядер.*

Осадок осторожно ресуспендируйте с 8 мл ОБ буфера на льду, и центрифугируйте при 800g и температуре 4°C в течение 10 мин. Повторите отмывку еще 2 раза.

4. Получение препарата интерфазных клеточных ядер.

4.1 *Получение препарата клеточных ядер.*

К осадку добавьте 2 объема буфера для отмывки ядер (ОБ) (соотносительно с объемом осадка) и осторожно ресуспендируйте ядра.

4.2 *Хранение препарата.*

К полученному осадку с ОБ добавьте равный объем стерильного глицерола, разделите на равные аликвоты и храните в морозилке (-20°C).

Микроскопический контроль чистоты получаемых препаратов проводят с помощью микроскопа. Ядра должны иметь ненарушенную оболочку и не содержать примесей пластид и митохондрий.

Контрольные вопросы

1. *На чем основана методика выделения интерфазных клеточных ядер?*
2. *Как готовится буфер для выделения клеточных ядер?*
3. *Для чего в среду выделения добавляют Triton X-100?*
4. *С какой целью в среду для выделения ядер вводят гексиленгликоль?*
5. *Как хранят полученные препараты интерфазных клеточных ядер?*

Лабораторная работа № 2

ВЫДЕЛЕНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Вводные пояснения. Растительные клетки без пластид не существуют. Даже те растения, которые в процессе эволюции утратили способность к фотосинтезу, во всех своих клетках содержат лейкопласты, без которых невозможен обмен, накопление и транспорт углеводов. Фотосинтетический аппарат – это та часть клетки, которая содержит все компоненты, необходимые

для поглощения света и использования энергии возбужденных молекул пигментов в фотохимических и ферментативных реакциях. Сведения о субклеточных структурах, содержащих хлорофилл, были получены методами микроскопии и методом фракционирования компонентов растительной клетки.

Хлоропласты впервые были выделены Хиллом. Однако при исследовании полученного препарата под электронным микроскопом было обнаружено, что основная масса хлоропластов была лишена наружной оболочки и представляла собой обнаженные системы ламелл (хлоропласты типа С – broken). Позже Уолкер (Walker) разработал способ выделения целых хлоропластов типа А (complete). Значительный научный и методический вклад в изучение пластид внес А. С. Вечер (монография «Пластиды растений», Мн., Навука і тэхніка, 1968). В основе метода выделения хлоропластов лежит метод дифференциального центрифугирования. Принцип метода состоит в том, что при центрифугировании развивается центробежная сила, под воздействием которой взвешенные частицы оседают на дно центрифужной пробирки. При высокоскоростном центрифугировании крупные компоненты клетки (ядра) быстро оседают при относительно низких скоростях и образуют осадок. При более высоких скоростях в осадок выпадают более мелкие компоненты, такие как хлоропласты и митохондрии.

При получении изолированных хлоропластов среда выделения должна быть изоосмотической с цитоплазмой для предотвращения набухания и разрыва оболочки хлоропластов. Подбор подходящей осмотической концентрации среды производят, используя разные концентрации сахарозы или сорбитол, а рН среды изолирования должно соответствовать значениям рН соответствующих компартментов клетки. Чтобы не произошло сильного подкисления при разрушении клеток и разрыва вакуолей, в среду вводятся буферные добавки.

Контроль целостности хлоропластов проводят с помощью микроскопа, подсчитывая количество целых и разбитых пластид в поле зрения или в квадрате камеры Горяева. Для предотвращения окисления в среду выделения можно добавлять высокомолекулярные адсорбирующие вещества – полиэтиленгликоль, сывороточный альбумин, ингибиторы протеаз (PMSF), вводят антиоксиданты – аскорбат, глутатион, тиоловые производные.

В лабораторной практике существует несколько методов выделения пластид, зависящих от особенностей состава материала и наличия реактивов. Наиболее универсальные и распространенные методы представлены ниже.

Материалы и оборудование: 1) листья зеленых растений, 2) трис(оксиметил)-аминометан ($C_4H_{11}NO_3$), 3) магний хлористый ($MgCl_2$), 4) сахароза ($C_{12}H_{22}O_{11}$), 5) кальций хлористый ($CaCl_2$), 6) меркаптоэтанол (β -Mercaptoethanol), 7) глицерин, 8) фарфоровые ступка и пестик (гомогенизатор), 9) капроновая ткань, 10) электронные весы, 11) рН-метр, 12) магнитная мешалка с якорем, 13) автоматические вариопипетки 14) мерный цилиндр (100 мл), 15) пробирки центрифужные, 16) центрифуга с охлаждением 17) маркер, 18) воронка, 19) колотый лед (хладоэлемент), 20) кисточка, 21) шпатель, 22) ножницы.

1 Приготовление сред для выделения хлоропластов

Предохранение от окисления ферментами лизосом и эндогенными фенолами достигается охлаждением. Поэтому все операции проводите на холоду. Химическая посуда, среда и инструменты должны быть предварительно охлажденными.

1.1 Приготовьте среды для выделения хлоропластов I и II

Состав среды выделения I

0,01М Трис- HCl, pH 7,4

0,4М сахарозы;

1мМ MgCl₂×6H₂O;

3мМ CaCl₂;

4 мМ β-Merkaptoethanol;

50% глицерин

Состав среды выделения II

0,01М Трис- HCl, pH 7,4

0,4М сахарозы;

1мМ MgCl₂×6H₂O;

3мМ CaCl₂;

4 мМ β-Merkaptoethanol

2. Подготовка растительного материала

Растительный материал перед процедурой выделения хлоропластов помещают на 2 часа в холодильник.

2.1 Измельчение листьев

Охлажденные зеленые листья (20 г) мелко нарежьте и инкубируйте в холодной среде выделения I в соотношении 1:1,5 в течение 20 мин при +4°C.

Далее полученную смесь нарезанных листьев (грубый гомогенат) смешайте со средой выделения II в соотношении 1 : 2,5 (по отношению к исходной навеске листьев).

3 Получение препарата хлоропластов

3.1 Гомогенизация и фильтрация растительного материала

Грубый гомогенат растирайте в ступке или измельчайте в гомогенизаторе до однородной массы, которую профильтруйте через 2 слоя капроновой ткани.

Полученный фильтрат – это клеточный сок, содержащий органеллы и загрязненный обрывками клеток. Центрифугирование при 25g в течение 20 мин позволяет осадить обрывки клеток, крахмал и ядерные конгломераты. Осадок отбросьте и работайте с супернатантом (супернатант I).

3.2 Выделение хлоропластов

Супернатант I, содержащий органеллы, центрифугируйте при 350g в течение 20 мин. При этом осаждаются ядра, а хлоропласты остаются в супернатанте II. Хлоропласты из супернатанта II осаждайте при 3000g в течение 20 мин. Полученный супернатант III слейте, хлоропласты заморозьте при -70°C в остатках среды выделения II.

ВЫДЕЛЕНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ С ОЧИСТКОЙ В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ САХАРОЗЫ

Материалы и оборудование: 1) листья зеленых растений, 2) трис(оксиметил)-аминометан ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), 3) магний хлористый (MgCl_2), 4) сахароза ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), 5) этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) 6) цистеин, 7) ножницы, 8) гомогенизатор, 9) капроновая ткань, 10) электронные весы, 11) pH-метр, 12) магнитная мешалка с якорем, 13) автоматические вариопипетки, 14) мерный цилиндр, 15) пробирки центрифужные, 16) центрифуга с охлаждением 17) маркер, 18) воронка, 19) колотый лед (хладоэлемент), 20) кисточка, 21) шпатель, 22) мерные цилиндры (200 мл), 23) колбы (200–250 мл).

1 Приготовление буфера для выделения хлоропластов

Предохранение исходного материала от окисления ферментами лизосом и эндогенными фенолами, достигается охлаждением. Поэтому все операции проводите на холоду. Химическая посуда, среда и инструменты должны быть предварительно охлажденными.

1.1 Приготовьте буфер для гомогенизации

Состав буфера для гомогенизации

0,25 М трис-HCl буфер (pH 7,8)
0,01 М MgCl_2
1 М этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)
4 мМ цистеин
0,4 М сахароза

1.2 Приготовьте буфер для отмывания хлоропластов

Состав буфера для отмывания хлоропластов

0,25М трис-НСl буфере (рН 7,8)
0,01М MgCl₂
10 мМ ЭДТА
4 мМ цистеин

2 Гомогенизация растительного материала

Растительный материал перед процедурой выделения хлоропластов помещают на 2 часа в холодильник.

Навеску листьев (10 г) измельчите в ступке (или гомогенизаторе в течение 1–1,5 мин.) в присутствии холодного буфера. Соотношение среды гомогенизации и веса листовой ткани 10 : 1.

3 Очистка гомогената

Гомогенат профильтруйте через двойной слой капрона и центрифугируйте при 20 минут при 1500 г для удаления остатков разрушенных клеток, крахмала и ядерной фракции. Осадок отбросьте.

4 Получение препарата хлоропластов

Полученный супернатант повторно центрифугируйте при 3000 г в течение 20 минут.

Полученный осадок, содержащий хлоропласты, ресуспендируйте в половинном от начального объеме буфера для экстракции и центрифугируйте при том же режиме (3000 г в течение 20 минут).

Затем слейте супернатант, а осадок растворите в 1 мл той же среды выделения и центрифугируйте при 3000 г 20 минут. Последнюю операцию повторите дважды.

5 Очистка хлоропластов

Очистку хлоропластов проводите, используя ступенчатый градиент сахарозы.

5.1 Приготовьте ступенчатый градиент сахарозы

Ступенчатый градиент сахарозы готовьте на буфере для отмывания хлоропластов (0,25М трис-НСl буфер, (рН 7.8) с 0,004М цистеином, 0,0001М ЭДТА и 0,01М MgCl₂):

верхний слой – 25% сахароза – средний слой
средний слой – 34% сахароза – средний слой
нижний слой – 51% сахароза – нижний слой

Суспензию хлоропластов с помощью пипетки осторожно наложите на градиент сахарозы в центрифужную пробирку. Пробирки с градиентом сахарозы центрифугируйте 30 мин при 4000 g. Наиболее густая суспензия хлоропластов с большим числом средних и примесью крупных хлоропластов составляет среднюю фракцию, а крупные целые хлоропласты с небольшой примесью средних – нижнюю фракцию.

Эти две фракции объедините и отмойте от сахарозы центрифугированием в двойном объеме буфера для отмывки (0,25М трис-HCl буфер (pH 7,8) с 0,004М цистеином, 0,0001М ЭДТА и 0,01М MgCl₂) в течение 15 мин при 2000 g. Полученный осадок хлоропластов растворите в небольшом количестве того же буфера.

Контрольные вопросы

1. *Дайте определение фотосинтетического аппарата клетки*
2. *С помощью каких методов были получены сведения о субклеточных структурах, содержащих хлорофилл?*
3. *Какой метод изучения клеточных органелл положен в основу метода выделения хлоропластов?*
4. *В чем заключается принцип дифференциального центрифугирования?*
5. *При какой скорости центрифугирования оседают хлоропласты?*
6. *Каким должно быть pH среды изолирования?*
7. *С какой целью в среду выделения добавляют сывороточный альбумин и аскорбат?*

Лабораторная работа № 3

ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Вводные пояснения. Митохондрии занимают значительную часть цитоплазмы почти во всех эукариотических клетках. Хотя митохондрии настолько велики, что их можно увидеть в обычный световой микроскоп, и впервые были обнаружены еще в прошлом веке, все же реальная возможность разобраться в их функции появилась только после 1948 г., когда были разработаны методы выделения интактных митохондрий.

Получение функционально активных митохондрий из растений связано с рядом определенных трудностей. В первую очередь, к ним относится наличие плотных и жестких клеточных оболочек, вызывающих механические повреждения при растирании клеток. Отрицательную роль играют кислая реакция клеточного сока, выделяющегося в процессе гомогенизации ткани, а также содержащиеся в значительном количестве во многих растительных клетках фенольные соединения, являющиеся разобщающими агентами и

ингибиторами. Другие особенности растительных тканей (например, высокое содержание крахмала, хлорофилла, масел и т.д.) также оказывают влияние на качество и чистоту изолированной митохондриальной фракции. Поэтому для получения интактных митохондрий в каждом конкретном случае, в зависимости от объекта и его физиологического состояния, необходимо подбирать оптимальные условия выделения органелл.

Существующие методы выделения митохондрий из различных тканей, в принципе, очень похожи. Клетки тщательно разрушают в подходящей среде выделения, гомогенат фильтруют и полученный супернатант фракционируют. Митохондриальную фракцию, которую получают центрифугированием, затем отмывают и ресуспендируют.

Процедура выделения митохондрий включает четыре этапа: 1) гомогенизация; 2) отделение митохондриальной фракции методом дифференциального центрифугирования; 3) очистка полученной фракции путем повторного промывания; 4) определение чистоты и качества полученного препарата. Все операции по выделению митохондрий должны проводиться в строго контролируемых условиях, при температуре 0–40С.

Для предотвращения повреждения мембран митохондрий и создания изотонических условий среда гомогенизации (выделения) должна включать осмотик (сахарозу, манит, сорбит), способствующий лучшей сохранности митохондрий. С целью нейтрализации органических кислот, окисляющих гомогенат, наиболее часто используется буфер, имеющий слабощелочной рН. В среду гомогенизации также добавляют восстанавливающие агенты (цистеин, аскорбиновую кислоту), снижающие скорость окислительных процессов.

В среду промывания и при инкубации цистеин не вносится, а для удаления избытка двухвалентных катионов, ингибирующих окисление и фосфорилирование, используют хелатирующие агенты (комплексообразователи) – ЭДТА.

Полученная на первом этапе фракция митохондрий не является чистой, а содержит в качестве примеси пропластиды и микротельца.

Для получения более чистой фракции используют прием повторного промывания. Для этого осадок органелл суспендируют в среде промывания и центрифугируют в течение такого же времени и при тех ускорениях, которые были использованы для осаждения.

Суспензия промытых митохондрий может быть использована для очистки в градиенте сахарозы, перколла и других веществ. В настоящее время для очистки митохондрий используют центрифугирование в градиенте плотности перколла. Перколл, представляющий собой взвесь коллоидных частиц силикагеля (диаметр 15-30нм), покрытых поливинилпирролидоном, который может активно связывать гидролазы, почти идеальный материал для разделения митохондрий высших растений. Суть метода состоит в наслоении суспензии неочищенных митохондрий на поверхность градиента и центрифугирования при высоких режимах ускорения. Под действием центробежной силы компоненты

митохондриальной фракции проходят через градиент перколлы и разделяются на отдельные зоны (полосы) в соответствии с их относительной плотностью.

Определение чистоты и качества полученной фракции митохондрий можно проводить различными путями: по величинам дыхательного контроля по Чансу – Вилльямсу и отношения АДФ/О; путем определения ферментативной активности 3) путем электронно-микроскопического исследованием.

Материалы и оборудование: 1) семена растений озимой ржи или др. злаков, детергент, перманганат калия (KMnO_4), 2) бидистиллированная вода, сахара, 3) MOPS (буфер – морфолинопропан-1-сульфониевая кислота), 4) ЭДТА (этилендиаминтетраацетат), хлорид калия (KCl), 5) хлорид магния (MgCl_2), 6) цистеин, 7) бычий сывороточный альбумин (БСА), 8) соляная кислота (HCl), 9) гидроксид калия (KOH), 10) ступка и пестик (гомогенизатор), 11) капроновая ткань, 12) электронные весы, 13) рН-метр, 14) магнитная мешалка с якорем, 15) автоматические вариопипетки 16) мерный цилиндр (100 мл), 17) пробирки центрифужные, 18) центрифуга с охлаждением 19) кисточка (стеклянная палочка с резинкой), 20) воронка, 31) колотый лед (хладоэлемент), 32) фильтровальная бумага, 33) шпатель, 34) ножницы, 35) термостат, 36) стеклянный стакан (50, 100, 200 мл), 37) воронка

Ход работы

1 Получение растительного материала

Семена злаков (озимой пшеницы) промойте детергентом, слабым раствором KMnO_4 , затем водой. Выращивайте в кювете на влажной фильтровальной бумаге в термостате (в темноте) при 24-26⁰С. По истечении 3-х суток срежьте побеги. Нарезанные побеги длиной 2–3 см промойте дистиллированной водой, обсушите и поместите на несколько минут в холодильник. Взвесьте 30 г растительного материала.

2 Приготовление сред для получения препарата митохондрий

Все растворы для выделения митохондрий готовятся на бидистиллированной воде.

Во время всей процедуры выделения растворы и посуда должны быть хорошо охлажденными (находиться в воде со льдом, холодильнике или на хладоэлементе). Все среды готовят накануне выделения митохондрий и на ночь оставляют в холодильнике (их состав приведен в п. 2.1 – 2.3).

Вначале рассчитайте необходимый объем всех сред.

Среда выделения готовится в соотношении 1:4 (на 30 г растительного материала требуется 120 мл среды). Перед процедурой выделения митохондрий в среду выделения добавляют цистеин (50 мг/100 мл).

Среда промывания – приготовьте 20 мл среды (10-12 мл используется).

Среда ресуспендирования – приготовьте 10 мл среды (к митохондриям добавляется 0,6 мл).

рН всех сред доводят до 7,4.

Раствор 20% БСА готовится на среде промывания и хранится в морозильной камере. БСА связывает жирные кислоты и фенольные вещества, которые интерферируют с митохондриальной фракцией, а также работает как субстрат для протеаз для защиты митохондриальных белков от повреждений.

В стеклянном стакане растворите указанные компоненты, за исключением цистеина, доведите рН (при постоянном перемешивании) до значения 7,4 и бидистиллированной водой доведите до нужного объема. Затем раствор профильтруйте, отлейте объем, необходимый для среды промывания и для среды ресуспендирования.

В среду ресуспендирования добавьте необходимые компоненты, доведите рН до значения 7,4. В оставшуюся после фильтрации среду (объем среды выделения) добавьте цистеин, перемешайте, доведите рН до значения 7,4 и профильтруйте. Растворы поместите в холодильник.

2.1 Приготовьте среду для выделения митохондрий

Состав среды выделения (рН 7,4, г/100 мл)

Концентрация вещества	Количество в г/100 мл среды
300 мМ сахара	10,260
40 мМ MOPS	0,837
5 мМ ЭДТА	0,186
10 мМ KCl	0,075
1 мМ MgCl ₂	0,009
0,1% БСА	0,100
0,05% цистеин	0,050

2.2 Приготовьте среду для промывания митохондрий

Состав среды для промывания, рН 7,4

Среда для промывания состоит из тех же компонентов, что и среда выделения, за исключением цистеина. Концентрация БСА – 0,4%.

300 мМ сахара

40 мМ MOPS

5 мМ ЭДТА

10 мМ KCl

1 мМ MgCl₂

0,4% БСА

2.3 Приготовьте среду для ресуспендирования митохондрий

Состав среды ресуспендирования, рН 7,4

Среды для ресуспендирования имеет такой же состав, что и среда промывания, но не содержит БСА.

300 мМ сахараза

40 мМ MOPS

5 мМ ЭДТА

10 мМ KCl

1 мМ MgCl₂

3 Выделение митохондрий

30 г растительного материала поместите в стакан, замороженный в лед (или помещенный на хладоэлемент) и залейте средой выделения (60 мл).

В среду выделения предварительно добавьте раствор 0,1% БСА (0,6 мл 20% раствора БСА на 120 мл среды выделения = 0,1% БСА).

Навеску измельчите ножницами, быстро и тщательно разотрите в ступке пестиком (или измельчите в гомогенизаторе). Полученный гомогенат профильтруйте через капроновую ткань, залейте оставшейся средой выделения и отожмите пинцетом в химический стакан с воронкой.

Отфильтрованный гомогенат разлейте по центрифужным пробиркам, которые попарно уравновесьте.

В течение всей процедуры выделения химический стакан с воронкой и капроновой тканью, центрифужные пробирки находятся на льду или холодильнике.

Уравновешенные пробирки центрифугируйте при 2000 x g в течение 3 мин при 40С. Надосадочную жидкость (супернатант) быстро и осторожно перелейте в чистые охлажденные центрифужные пробирки, уравновесьте и центрифугируйте при 3000 x g в течение 5 мин. Супернатант слейте и отбросьте.

Центрифужные пробирки опрокиньте на фильтровальную бумагу, чтобы дать стечь оставшейся жидкости.

Одну центрифужную пробирку поместите в стаканчик со льдом, залейте половиной объема среды промывания и аккуратно промойте осадок с помощью охлажденной кисточки.

Общий объем среды промывания – 12 мл (перед промыванием в среду добавьте 0,4% БСА (0,3 мл 20% БСА на 12 мл среды = 0,4% БСА). Слейте промытый осадок в следующую пробирку с осадком, опять промойте и так до тех пор, пока не останется только одна пробирка. Оставшейся средой вторично промойте уже промытые пробирки и слейте в одну.

Центрифужную пробирку уравновесьте такой же пробиркой, наполненной водой и центрифугируйте при 3000 x g в течение 5 мин. Супернатант слейте и отбросьте, осадок ресуспендируйте с помощью кисточки в 0,6 мл охлажденной

среды ресуспендирования. Пробирка с суспензией митохондрий поместите в стакан со льдом и используйте для работы. Суспензию митохондрий можно хранить в холодильнике в течение 30-60 мин.

Выделение и очистка растительных митохондрий в градиенте плотности перколла

Материалы и оборудование, получение растительного материала и общий принцип приготовления сред аналогичны предыдущей методике. Дополнительно в материалы включается перколл.

Ход работы

1 Приготовьте среду для выделения митохондрий

Состав среды выделения, рН 7.4

300 мМ сахараза,
40 мМ MOPS-КОН (рН 7.4),
2мМ ЭДТА,
0.1% БСА.
0.5% цистеин

2 Приготовьте среду для промывания митохондрий

Состав среды промывания, рН 7,4

Среда для промывания состоит из тех же компонентов, что и среда выделения, за исключением цистеина.

Среда для промывания, рН 7.4

300 мМ сахараза,
40 мМ MOPS-КОН (рН 7.4),
2мМ ЭДТА,
0.1% БСА

3 Приготовьте среду для ресуспендирования митохондрий

Суспензию промытых митохондрий ресуспендируют в 1 мл среды ресуспендирования

Состав среды ресуспендирования, рН 7.4

300 мМ сахаразы и
40 мМ MOPS-КОН (рН 7.4).

Очистка митохондрий

1 Приготовьте среду для градиента перколла

Очистку митохондрий проводите в градиенте перколла (Побежимова и др., 2001), приготовленном на среде следующего состава:

Среда для приготовления градиента перколла, рН 7.4

300 мМ сахараза,
10 мМ MOPS-KOH (рН 7.4),
0.1% БСА.

Градиент для очистки митохондрий состоит из 3, 14 и 8 мл 18%, 23% и 35% (объем/объем) перколла (“Sigma”, США), соответственно.

Суспензию промытых митохондрий наслоите на градиент перколла и центрифугируйте при 22000 x g в течение 45 мин. При фракционировании митохондрий получают четыре фракции клеточных компонентов.

Фракция интактных митохондрий находится на границе 23% и 35% перколла.

2 Отмойте митохондрии от перколла

Освобождение митохондрий от перколла осуществляйте разбавлением последнего в 20 раз средой ресуспендирования (объем/объем).

Осаждение митохондрий из разбавленной суспензии проводите центрифугированием при 24000g в течение 10 мин.

Осадок очищенных митохондрий повторно промойте 10 объемами среды ресуспендирования и переосадите при 24000 x g. в течение 5 мин.

Полученный препарат очищенных митохондрий имеет высокую степень интактности (около 95%) и не загрязнен другими субклеточными фракциями.

Контрольные вопросы

1. *Какую функцию выполняют митохондрии?*
2. *С какими трудностями связано выделение митохондрий?*
3. *Перечислите этапы выделения митохондрий*
4. *С целью нейтрализации органических кислот, окисляющих гомогенат, Какой рН должен быть у буфера для выделения митохондрий?*
5. *Как очищают препарат митохондрий?*
6. *Что представляет собой перколл?*
7. *В чем состоит суть метода очистки митохондрий?*
8. *В какую среду и зачем добавляют БСА?*
9. *На каком этапе выделения митохондрий в среду добавляют цистеин?*

**ИССЛЕДОВАНИЕ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ И
КОМПОНЕНТОВ ЯДРА ПРИ ЭКСПРЕССИИ
И РЕКОНСТРУКЦИИ ГЕНОМА.
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ
РАСТЕНИЙ ПРИ ТРАНСГЕНЕЗЕ**

Лабораторная работа № 4

**ВЫДЕЛЕНИЕ КОМПАРТМЕНТОВ
ИНТЕРФАЗНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР.
АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ**

Вводные пояснения. Одной из функций ядерных белков является образование нуклеопротеидных комплексов, позволяющих произвести укладку гигантской по линейным размерам молекулы ДНК в объеме ядра. В биохимии и цитологии активность ядра отождествляют с наличием диффузного хроматина (эухроматина), в котором ДНК слабо связана с белками; высшие порядки компактизации отождествляются с конденсацией хроматина (гетерохроматина), где ДНК «закрыта» белками и липидами и мало активна. Особо отметим, что степень укладки (конденсации) динамична, постоянно сохраняется возможность ее модуляции, следовательно, имеется возможность экзо- и эндогенной регуляции. В структуру нуклеосом ядра входят гистоны H2a, H2b, H3 и H4, которые характеризуются консервативностью. Модификация гистонов *in vitro* может осуществляться метилированием, фосфорилированием, ацетилизацией, окислением-восстановлением SH-групп некоторыми другими реакциями, что и может быть предметом регуляции структуры нуклеосом. Однако наиболее динамичным и «отзывчивым» на воздействия является линкерный гистон H1. Эта изменчивость коррелирует с экспрессией генома при росте и развитии растений.

Поскольку основная информация развития организма сосредоточена в клеточном ядре, важно иметь конкретные сведения об этой центральной части клетки в активном и репрессированном состоянии.

Показателем экспрессии генома является увеличение гетерогенности белков кариоплазмы ядра, активности протеиназ, уменьшение доли ДНП высших уровней компактизации, снижение доли гистона H1, рост низкомолекулярной части белков ядерного матрикса.

В Отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси был разработан метод избирательного (ступенчатого) выделения компартментов ядра, его «разборки» растворами разной ионной силы и детергентов с последующим исследованием получаемых фракций. Последовательная обработка этими растворами суммарного препарата клеточных ядер позволяет экстрагировать белки кариоплазмы и хроматина разной степени компактизации и связывания с ядерным матриксом и самого ядерного матрикса.

В настоящее время широкое распространение получили работы по генноинженерной реконструкции генома, получению трансгенных растений, несущих в себе ген (или гены) чужеродных организмов.

ДНК каждого организма имеет специфические участки, которые “привязываются” к матриксу, причем у каждого вида по-своему, обеспечивая индивидуальную “архитектуру” внутриядерной организации дезоксирибонуклеопротеида (ДНП). Замена участка ДНК при трансгенезе изменяет эти уникальные ДНК-белковые связи, изменяя тем самым топографию ДНП-фибрилл, следствием чего может быть иная интенсивность ядерных процессов. Встраивание даже небольшого участка чужеродной ДНК может привести к изменению высших порядков структуры ядра, что, в общем итоге, может отразиться на ходе метаболизма, росте и развитии растения.

Учитывая то обстоятельство, что конкретным объектом генно-инженерных работ является ДНК клеточного ядра, следует ожидать биохимических проявлений трансгенеза именно в этой структуре клетки.

Экспрессия чужеродных генов в общем геноме может привести к модификации свойств ядра хозяина, которое выразится в изменении компактизации нуклеопротеидного комплекса и проявится в составе, интенсивности или гетерогенности отдельных белковых фракций ядра. Поэтому одним из этапов исследований трансгенеза является определение гетерогенности ядерных белков.

Однако следует подчеркнуть, что явная реакция ядра на встраивание отдельных генов, составляющих небольшой процент генома ядра, как правило, не ярко отражается на общих, интегральных биохимических показателях клетки и ткани. На отдельных этапах развития растений наблюдаются морфофизиологические особенности, касающиеся интенсивности роста, времени начала цветения, общей массы растений, динамики накопления пигментов.

Материалы и оборудование: 1) препарат клеточных ядер, 2) трис-оксиметиламинометан (Tris(hydroxymethyl)aminometane), 3) хлорид натрия (NaCl), 4) Triton X-100, 5) соляная кислота (HCl), 6) додецилсульфат натрия (ДСН, SDS) 7) рН-метр, 8) магнитная мешалка с якорем, 9) автоматические вариопипетки 10) мерный цилиндр, 10) пробирки центрифужные, 11) ультразвуковой гомогенизатор (Bandelin Sonoplus), 12) центрифуга с охлаждением 13) воронка, 14) стеклянные стаканы

Ход работы

1 Приготовление растворов для разборки интерфазных клеточных ядер на компартменты

Для экспериментальных работ используйте полученные ранее препараты интерфазных клеточных ядер. Разрушение ядерных оболочек проводите

кратковременной обработкой ультразвуком (до 15 сек), чтобы не нарушить структуру эухроматина, участков гетерохроматина и ядрышек в процессе обработки.

Уровни структурной организации ядра изучают методом ступенчатой экстракции, “разборки” ядра растворами разной ионной силы и детергентов с последующим исследованием получаемых растворов.

1.1 Приготовьте растворы для разделения белков ядра на компартменты

Таблица – Состав растворов для фракционирования ядер

№	Состав растворов	Компартмент ядра
1	0,14M NaCl + трис-HCl pH 7,5	<i>Кариоплазма</i>
2	0,6 M NaCl + трис-HCl pH 7,5	<i>Диффузный хроматин (эухроматин)</i>
3	2,0 M NaCl + трис-HCl pH 7,5	
4	1% Triton X-100	<i>Компактный хроматин (гетерохроматин)</i>
5	0,5% SDS (лизирующий раствор)	<i>Ядерный матрикс</i>

Первый и второй растворы (таблица) позволяют получать фракцию кариоплазмы и нуклеопротеидного комплекса, не связанного со скелетом ядра (это, в основном, диффузный хроматин). Включение 2M NaCl в состав третьего раствора дает возможность разрыхлить непрочносвязанный ДНП и экстрагировать его из состава ядра. Присутствующий в четвертом растворе детергент тритон X-100 позволяет сольубилизовать прочносвязанный ДНП (компактный хроматин). И, наконец, лизирование остатка 0,5% SDS дает нам белки скелетной структуры ядра – матрикса.

Далее белковый состав каждого компартмента ядра исследуют методом электрофореза по Лэммли.

АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

Вводные пояснения. Трансгенными называются растения, в которых успешно функционируют гены (или ген), перенесенные из растений или животных других видов.

Получение трансгенных организмов с новыми или усиленными свойствами и признаками широко используются в фундаментальных исследованиях. Основным направлением применения трансгенеза для генетической

модификации культурных растений является повышение их устойчивости к неблагоприятным воздействиям окружающей среды, вирусам и гербицидам.

Современная биология растений не может обойтись без методов культуры органов, тканей и клеток *in vitro*. Огромное значение принадлежит методам получения каллусной ткани, которую используют или как источник получения протопластов, или как источник растений-регенератов.

Каллус представляет собой неорганизованную растущую ткань, состоящую из относительно однородных недифференцированных клеток. Дифференциация и дедифференциация тканей обуславливаются различной экспрессией генома. Поэтому изменение гормонального баланса у трансгенных растений может иметь разные физиологические проявления, одним из которых является реакция на культивирование *in vitro*.

В основе большинства систем трансформации растений лежит тотипотентность их соматических клеток.

При введении в растительную клетку чужеродной ДНК используются два основных подхода. Первый из них – агробактериальная трансформация – это слегка модифицированный естественный процесс горизонтального (между отдаленными в систематическом отношении группами организмов) переноса генов от бактерий в растения. Однако метод агробактериальной трансформации недостаточно эффективен для большинства однодольных растений. Поэтому для введения чужеродной ДНК в клетки таких растений чаще всего используют другой метод – бомбардировки клеток микроскопическими частицами из золота или вольфрама, на поверхность которых нанесена ДНК.

Однако только малая часть клеток-мишеней в течение процедуры трансформации принимает ДНК, и только небольшая часть этих клеток выдерживает трансформационные обработки, стабильно интегрируя интродуцированную в свой геном ДНК с последующей регенерацией растения. Процесс переноса и включения в генетический материал клеток растений чужеродной ДНК происходит с небольшой частотой: трансформированной оказывается одна клетка на тысячу. Поэтому необходимо отделить трансформированные клетки от остальных. Для этих целей вместе с желаемым геном (например, устойчивости к насекомым вредителям, вирусам, гербицидам) вводят и второй ген – селективный. Чаще всего для этого используют гены устойчивости к антибиотикам. Если поместить клетки после введения чужеродной ДНК на питательную среду с антибиотиком, то на ней будут расти только трансформированные клетки.

Тип экспланта, а также различные компоненты питательной среды, такие как сахар, регуляторы роста растений, *vir*-индуцирующие соединения, также являются важными факторами, которые влияют на частоту трансформации. В зависимости от вида растения используют разные типы эксплантов, среды и число субкультивирований.

Также необходимо отметить, что при создании трансгенных растений приходится преодолевать ряд трудностей, связанных с их видовой принадлежностью.

Этапы получения трансформированных растений:

1. Выбор гена и подготовка вектора
2. Введение вектора методом, подходящим для вида растения
3. Отбор трансформантов, экспрессирующих введенный ген
4. Проверка наследуемости встроенного гена.

Материалы и оборудование: оборудование, посуда и реактивы, используемые при работе с культурой ткани в стерильных условиях, растения *Nicotiana tabacum* L., штамм *Agrobacterium tumefaciens*, содержащий генетическую конструкцию, среда MS, среда LB, микробиологическая петля, ножницы

1 Культивирование растений *Nicotiana tabacum* L. для проведения генетической трансформации

Маточные растворы для культивирования растений *Nicotiana tabacum* L. готовят по Мурасиге-Скугу*.

Маточные растворы микро- и микросолей – каждую соль последовательно растворяют в отдельном сосуде, затем сливают вместе и доводят до нужного объема. В смесь макросолей последним добавляют раствор солей магния, из микросолей – соли молибдена.

Маточные растворы хлористого кальция и хелата железа (сернокислое железо+ЭДТА) готовят, растворяя компоненты по отдельности, затем сливают и подогревают раствор, не доводя до кипения до образования раствора темного желтого цвета. Хранят отдельно.

Концентрированные растворы витаминов готовят на дистиллированной воде, регуляторы роста – на диметилсульфоксиде (растворяют на ДМСО).

Водорастворимые антибиотики растворяют в дистиллированной воде.

1.1 Приготовление среды Мурасиге-Скуга (MS)

Среду MS готовят по Мурасиге и Скугу, автоклавируют и разливают по чашкам Петри.

1.2 Приготовление сред для регенерации и укоренения растений табака (на 1 л), рН сред перед автоклавированием 5,5-5,8

Таблица – компоненты сред для морфогенезе и укоренения

Компоненты среды	Состав для морфогенеза	Состав для укоренения
Макросоли MS	50 мл	25 мл
Микросоли MS	1 мл	1 мл
CaCl ₂ 20%	3,3 мл	3,3 мл
Хелат железа	5 мл	5 мл
Сахароза	30 г	10 г
Инозит	100 мг	0
Витамины		
Тиамин	2 мг	-
Никотиновая кислота	2 мг	-
Пиридоксин	2 мг	-
Регуляторы роста		
БАП	2 мг	-
НУК	0,2 мг	-

*Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 478-497.

Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений, Москва, ВИНОМ. Лаборатория знаний.– 2012.– С.21 –23.

2 Приготовление среды для посева бактерии

Содержащую генетическую конструкцию агробактерию выращивают на среде Лурия-Бертрани (LB) с добавлением антибиотиков, необходимых для селекции имеющегося штамма [Maniatis T., Fritch F., Sumbrook. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor. Lab., 1982. 545 p.].

Состав среды LB на 1 л

Пептон – 10 г

Бакто-дрожжевой экстракт – 5 г

NaCl – 10 г

NaOH – 167 мкл 10 н раствора

Агар – 15г
 H₂O – до 1л
 рН среды перед автоклавированием 7,7

Проавтоклавированную среду разлейте по чашкам Петри. После застывания среды с помощью стерильной петли посадите агробактерию.

При переносе ДНК в клетки растений используется метод кокультивирования (совместного культивирования) эксплантов с суспензией агробактерии (от 2 часов до 3-х суток). После кокультивации экспланты переносят на среды для регенерации или прямого побегообразования на среду, содержащую антибиотик (для подавления роста бактерии).

3 Трансформация растений табака при помощи супервирулентного штамма *Agrobacterium tumefaciens*

Стерильные молодые листья растений табака скальпелем разрежьте на сегменты 0,5–1 см² и уложите нижней стороной на бактериальный газон в чашки Петри на среду для каллусогенеза (таблица).

Культивируют 2-3 суток при температуре 25-27⁰С без освещения.

Для регенерации растений *in vitro* экспланты переносят на среду для морфогенеза табака (табл.), добавляя антибиотики: цефотаксим (Цт), цефазолин (Цз) и канамицин (Км) и культивируют при температуре 25-27⁰С с фотопериодом 16/8 часов (день/ночь) и интенсивности освещения 5 клк.

Каждые 3 недели экспланты переносят на свежую среду того же состава. Концентрацию Цт и Цз постепенно снижают до 100 мг/л.

Через 2-3 пассажа начинает формироваться первичный каллус, затем – почки и регенеранты. Сформированные растения отделяют скальпелем и переносят на среду для укоренения табака (таблица).

На последней стадии антибиотики не добавляют для выявления не элиминированной бактерии. Км в среде в концентрации 100 мг/л присутствует постоянно, т.к. является селективирующим фактором на стадии корнеобразования.

ДНК полученных растений можно тестировать на наличие трансгена при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Контрольные вопросы

1. *Какие гисоны входят в структуру нуклеосом?*
2. *Что является показателем экспрессии генома?*
3. *Белки каких фракций (компаратментов) можно получить методом избирательной (ступенчатой) экстракции белковых комплексов ядра?*
4. *Какие растения называются трансгенными?*
5. *Какие гены обычно составляют генетическую конструкцию?*
6. *На каких средах культивируют растения табака для проведения агробактериальной трансформации?*

МЕТОДИЧЕСКАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие).. М.: Изд-во Наука, 1981. – 536 с.
2. Техника биохимического исследования субклеточных структур и биополимеров растительной клетки // Мн.: Наука и техника.– 1986.– С. 197.
3. Cell Organelles / Ed. R.G. Herrmann. Wien; N.Y.: Springer, 1992. 467 p.
4. Фотосинтез: Методические рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов / Авт.-сост. Л. В. Кахнович. – Мн.: БГУ, 2003. – 88 с.
5. Т.П. Побежимова, А.В. Колесниченко, О.И. Грабельных. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез./ (Отв. ред. Р.К. Салаяев) – Москва: ООО "НПК "ПРОМЭКОБЕЗОПАСНОСТЬ", 2004. – 98 с.
6. Андреева И.Н. Методы выделения физиологически активных митохондрий из растительных тканей // Клетка и клеточные структуры / Отв. ред. Молотковский Ю.Г. – М.: Наука, 1968. – С.16-24.
7. Draper J., Scott R., Armitage P., Walden R. Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual. Oxford: Blackwell Sci. 1988. 408 p
8. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 478-497.
9. Кн. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений, Москва, ВИНОМ. Лаборатория знаний.– 2012.– 487с. , с.21-23.
10. Maniatis T., Fritsch F., Sambrook. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. Lab.– 1982.– 545 p.
11. Биотехнология. Учебное пособие для вузов./под ред. Катлинского, М., Изд-во «Академии», 2007. с. 204-218.

3. КОНТРОЛЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

Темы рефератов и вопросы для самоконтроля

ВВЕДЕНИЕ

Темы рефератов

1. Характеристика информационных структур растительной клетки.
2. Биоинформатика – понятие, резервы, перспективы.
3. ДНК как носитель наследственной информации. Информационная емкость ДНК.

Вопросы

1. Что такое «биоинформатика»?
2. При наличии каких трех основных факторов может существовать и развиваться живой организм?
3. Перечислите информационные структуры растительной клетки
4. Назовите основные функции ДНК
5. Какова информационная емкость ДНК у эукариот?

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНФОРМАЦИОННЫХ СТРУКТУР И СИСТЕМ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Темы рефератов

1. Молекулярно-биологические основы хранения и реализации наследственной информации растительной клетки. ДНК как носитель наследственной информации
2. Специфика растительной клетки, ее органелл и их компартментов, содержащих информационные молекулы

Вопросы

1. Перечислите места локализации ДНК в растительной клетке
2. Назовите основные функции ДНК
3. Дайте характеристику ДНК с точки зрения информатики и химии
4. Каким двум основным требованиям должен удовлетворять носитель генетической информации?

II. КЛЕТОЧНОЕ ЯДРО РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ И ЕГО НУКЛЕОПРОТЕИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Темы рефератов

1. Состав, свойства и структурная организация клеточных ядер растительной клетки
2. Уровни компактизации ДНК в составе клеточного ядра растительной клетки

3. Роль гистонов, HMG-белков, негистоновых белков, липидов в обеспечении уровней компактизации ДНК

Вопросы

1. В каком компартменте растительной клетки содержится основная наследственная информация, необходимая для развития целого организма?
2. Ядро и цитоплазма с точки зрения биоинформатики
3. Что такое дезоксирибонуклеопротеид – ДНП?
4. Что такое хроматин?
5. Перечислите соединения липидной природы, входящие в состав хроматина?
6. Перечислите уровни компактизации ДНК в составе клеточного ядра растительной клетки
7. Назовите методы получения препаратов интерфазных клеточных ядер и изучения их состава

III. ИНФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА ПЛАСТИД

Темы рефератов

1. Пластиды. Структура и локализация ДНК в пластидах
2. Особенности строения и информационная емкость пластидной ДНК

Вопросы

1. Что такое пластиды?
2. Перечислите типы пластид
3. Какова информационная емкость пластидной ДНК?
4. Из каких зон состоит кольцевая молекула хлоропластной ДНК?
5. Назовите основное свойство пластидной ДНК

IV. ИНФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА МИТОХОНДРИЙ

Темы рефератов

1. Митохондрии. ДНК митохондрий, локализация, особенности строения и информационная емкость
2. Методы изучения митохондрий

Вопросы

1. Что такое митохондрии?
2. Какова основная функция митохондрий?
3. Как наследуется митохондриальная ДНК?
4. Какой % от общего содержания ДНК клетки составляет ДНК всех митохондрий?
5. Какова информационная емкость митохондриальной ДНК?

V. ОРГАНИЗАЦИЯ И СВОЙСТВА НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПРИ ЭКСПРЕССИИ И РЕКОНСТРУКЦИИ ГЕНОМА

Темы рефератов

1. Изменения структуры ядра при естественной экспрессии генома и трансгенезе
2. Культура клеток и тканей высших растений *in vitro* при проведении генетической трансформации
3. Создание компьютерных баз данных по биохимическому тестированию биоразнообразия растений
4. Молекулярно-генетическая паспортизация растений

Вопросы

1. Что такое ДНК-узнающий модуль?
2. Перечислите 4 класса белков, связывающихся с ДНК, согласно классификации по функции?
3. Что такое генетическая трансформация?
4. Что такое тотипотентность?

ЗАДАЧИ И ТЕСТЫ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ЗНАНИЙ

1. «Биоинформатика» – это:
 - A. Наука о передаче сведений, хранящихся на определенных носителях, исполнительным системам и механизмам
 - B. использование информационных технологий для хранения данных
 - C. прикладное использование информационных технологий для хранения, систематизации и сравнительного анализа данных, полученных в ходе молекулярных, геномных, протеомных исследований для моделирования процессов, создания баз данных, электронных библиотек и др.
 - D. прикладное использование информационных технологий для создания баз данных

2. Информационные сети локализованы в следующих структурах растительной клетки:
 - A. клеточное ядро
 - B. клеточное ядро – пластиды
 - C. клеточное ядро – митохондрии
 - D. пластиды – митохондрии
 - E. клеточное ядро – пластиды – митохондрии

3. Информационная емкость молекулы эукариотической ДНК составляет (бит/см² информации):
 - A. 10¹⁴ бит/см² информации

- В. 100 бит/см²
 С. 10⁶-10⁷ бит/см²
4. Молекула ДНК обеспечивает:
 А. хранение генетической программы развития и функционирования живых организмов
 В. передачу из поколения в поколение генетической программы развития и функционирования живых организмов
 С. передачу и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов
 Д. хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов
5. Чем выше организован организм, тем:
 А. меньше в его геноме некодирующей части нуклеотидов
 В. больше в его геноме некодирующей части нуклеотидов
 С. больше в его геноме кодирующей части нуклеотидов
6. Носитель генетической информации должен удовлетворять следующим основным требованиям:
 А. воспроизводиться (реплицироваться)
 В. воспроизводиться (реплицироваться) с высокой точностью и детерминировать (кодировать) синтез РНК и белка.
 С. воспроизводиться (реплицироваться) с высокой точностью и детерминировать (кодировать) синтез РНК
7. Дезоксирибонуклеопротеидный комплекс (ДНП) состоит из:
 А. нуклеиновых кислот
 В. ДНК-связывающих белков
 С. ДНК в комплексе с белками ядра
8. Основные функции ядра:
 А. хранение наследственной информации клетки
 Б. участие в делении (размножении)
 В. регуляция процессов обмена веществ в клетке
 Г. хранение наследственной информации клетки и участие в ее делении (размножении)
 Д. хранение наследственной информации клетки, участие в делении (размножении), регуляция процессов обмена веществ в клетке
 Е. хранение наследственной информации и регуляция процессов обмена веществ в клетке
9. Клеточные ядра растений имеют следующий химический состав:
 А. ДНК – 60%; РНК – 20 %; белки 10%

- В. ДНК – 20%; РНК – 10 %; белки 60%
- С. ДНК – 10%; РНК – 60 %; белки 20%

10 Какие из перечисленных белков участвуют в образовании нуклеосомных сердцевин (кор-частиц) хромосомной фибриллы:

- А. гистон H2a и H2b
- В. гистон H2a, H2b, H3 и H4
- С. гистон H3
- Д. гистон H4
- Е. гистон H1

11 Какие из перечисленных белков взаимодействует преимущественно с межнуклеосомной (линкерной) ДНК:

- А. гистон H2a
- В. гистон H2b
- С. гистон H3
- Д. гистон H4
- Е. гистон H1

12 Расположите уровни компактизации ДНК в клеточных ядрах в порядке возрастания степени компактизации

- А. нуклеомерный (30-нм фибрилла)
- В. хромонемный
- С. релаксированная ДНК
- Д. хромомерный (петельный, розеточный)
- Е. нуклеосомный
- Ф. хроматидный

13 Хроматин разделяют на эухроматин и гетерохроматин

- А. эухроматин – сильно компактизирован
- В. гетерохроматин – мало компактизирован
- С. гетерохроматин – сильно компактизирован
- Д. эухроматин – мало компактизирован

14 Компактизация ДНК определяется в значительной мере ее взаимодействием с белками:

- А. негистоновыми белками
- В. гистонами
- С. гистонами и фракциями негистоновых белков ядра

15 Нуклеосома состоит из:

- А. четырех молекул гистонов: H2a, H2b, H3 и H4
- В. восьми молекул комплекса гистонов по два гистона H2a и H2b и по два гистона H3 и H4

- С. гистона H1
- 16 Отметьте наиболее консервативные гистоны
- А. гистон H1
 В. гистон H2a
 С. гистон H2b
 D. гистон H3
 E. гистон H4
- 17 Пропластиды это:
- А. предшественники хлоропластов
 В. неструктурированные клеточные органеллы, которые, постепенно дифференцируясь, превращаются в разные типы пластид
 С. предшественники хромопластов
 D. предшественники амилопластов
 E. собственно пластиды
- 18 ДНК пластид располагается
- А. На ламеллах
 В. в нуклеоидах
 С. распределена по всей пластиде
- 19 Репликация пластидной ДНК:
- А. не синхронизирована с репликацией ядерной ДНК
 В. синхронизирована с репликацией ядерной ДНК
- 20 общее соотношение ядерной ДНК к пластидной: примерно
- А. 100 : 1
 В. 1 : 1
 С. 50 : 50
 D. 2 : 1
 E. 1 : 2
- 21 Кольцевая молекула хлоропластной ДНК состоит из
- А. двух зон: большого и малого однокопийных районов
 В. трех зон: большого и малого однокопийных районов и инвертированного района (LSC, SSC, IR)
 С. четырех зон: большого и малого однокопийных районов и 2-х инвертированных районов (LSC, SSC, 2 IR)
 D. большого однокопийного района
- 22 Основной особенностью хлоропластной ДНК является:
- А. небольшой размер
 В. многокопийность

- С. нуклеотидный состав
- 23 Большинство белков хлоропластов кодируется:
А. пластидной ДНК
В. ядерной ДНК
- 24 ДНК хлоропластов:
А. содержит повторяющиеся нуклеотидные последовательности
В. не содержит повторяющихся нуклеотидных последовательностей
- 25 Митохондриальная ДНК наследуется
А. только по отцовской линии
В. по материнской и отцовской линиям
С. только по материнской линии
- 26 Митохондриальная ДНК локализована:
А. в оболочке митохондрий
В. в нуклеоиде
С. рассеяна в немембранном пространстве митохондрий
D. рассеяны по внутренней структуре митохондрий – кристам
- 27 ДНК митохондрий обеспечивает:
А. некоторую генетическую автономность
В. в целом работа митохондрий координируется ДНК ядра
С. полную генетическую автономность
- 28 Общее количество ДНК (у всех митохондрий одной клетки)
А. менее 1% общего содержания ДНК клетки
В. 50% общего содержания ДНК клетки
С. более 50 % общего содержания ДНК клетки
- 29 Молекула митохондриальной ДНК имеет форму:
А. кольцевую
В. линейную
С. разветвленную
D. розеткообразную
Е. замкнутых колец
F. открытых колец
G. линейную и кольцевую
- 30 Для связывания белка с ДНК необходимы следующие условия:
А. поверхность белка должна быть комплементарна поверхности спирали ДНК

- В. наличие ДНК-узнающего модуля
- С. рН среды

31 Процесс переноса и включения в генетический материал клеток растений чужеродной ДНК происходит:

- А. с большой частотой
- В. с небольшой частотой

С. с частотой одна трансформированная клетка на 1000 нетрансформированных

32 Чтобы отделить трансформированные клетки от нетрансформированных, в состав генетической конструкции вводят:

- А. Селективный ген
- В. Ген устойчивости к бактериальной инфекции
- С. Ген устойчивости к антибиотикам

33 Осаждение клеточных ядер проводят с помощью центрифугирования, при следующих скоростях вращения ротора:

- А. Низкой (до 50 x g)
- В. Высокой (более 1000 x g)

34 Осаждение митохондрий проводят с помощью центрифугирования, при следующих скоростях вращения ротора:

- А. Низкой (до 1000 x g)
- В. Высокой (более 20 тыс. x g)

35 Показателем экспрессии генома является:

- А. увеличение гетерогенности белков кариоплазмы ядра
- В. увеличение активности протеиназ
- С. уменьшение доли ДНП высших уровней компактизации
- Д. снижение доли гистона H1
- Е. рост низкомолекулярной части белков ядерного матрикса
- Г. уменьшение гетерогенности белков кариоплазмы ядра
- Г. уменьшение активности протеиназ
- Н. увеличение доли ДНП высших уровней компактизации
- И. увеличение доли гистона H1

Вопросы для подготовки к зачету

1. Что такое «биоинформатика»?
2. При наличии каких трех основных факторов может существовать и развиваться живой организм?
3. Перечислите информационные структуры растительной клетки
4. Назовите основные функции ДНК

5. Какова информационная емкость ДНК у эукариот?
6. Перечислите места локализации ДНК в растительной клетке
7. Назовите основные функции ДНК
8. Дайте характеристику ДНК с точки зрения информатики и химии
9. Каким двум основным требованиям должен удовлетворять носитель генетической информации?
10. В каком компартменте растительной клетки содержится основная наследственная информация, необходимая для развития целого организма?
11. Ядро и цитоплазма с точки зрения биоинформатики
12. Что такое дезоксирибонуклеопротеид – ДНП?
13. Что такое хроматин?
14. Перечислите соединения липидной природы, входящие в состав хроматина?
15. Перечислите уровни компактизации ДНК в составе клеточного ядра растительной клетки
16. Назовите методы получения препаратов интерфазных клеточных ядер и изучения их состава
17. Что такое пластиды?
18. Перечислите типы пластид
19. Какова информационная емкость пластидной ДНК?
20. Из каких зон состоит кольцевая молекула хлоропластной ДНК?
21. Назовите основное свойство пластидной ДНК
22. Что такое митохондрии?
23. Какова основная функция митохондрий?
24. Как наследуется митохондриальная ДНК?
25. Какой % от общего содержания ДНК клетки составляет ДНК всех митохондрий?
26. Какова информационная емкость митохондриальной ДНК?
27. Что такое ДНК-узнающий модуль?
28. Перечислите 4 класса белков, связывающихся с ДНК, согласно классификации по функции?
29. Что такое генетическая трансформация?
30. Что такое тотипотентность?

МЕТОДИКА ФОРМИРОВАНИЯ ИТОГОВОЙ ОЦЕНКИ

Студент допускается к зачету, если имеет оценку текущего контроля знаний (средний балл по лабораторным занятиям и УСР) не ниже «четыре». Допускается определение результатов текущей аттестации по дисциплине на основании результатов текущего контроля знаний без проведения опроса на зачете в случае отсутствия пропусков занятий и среднего балла по лабораторным занятиям и УСР «восемь». При этом явка обучающегося на зачет является обязательной.

4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

Учебно-программные материалы

Учебная программа УВО по учебной дисциплине для специальности 1-31 01 01 Биология (по направлениям) специализаций 1-31 01 01-01 03 Физиология растений и 1-31 01 01-02 03 Физиология растений доступна по адресу:

<http://elib.bsu.by/handle/123456789/157940>

Список рекомендуемой литературы и Интернет-ресурсов

Список рекомендуемой литературы и Интернет-ресурсов приведен в учебной программе УВО по учебной дисциплине для специальности 1-31 01 01 Биология (по направлениям) специализаций 1-31 01 01-01 03 Физиология растений и 1-31 01 01-02 03 Физиология растений доступна по адресу:

<http://elib.bsu.by/handle/123456789/157940>