

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Майкопский государственный технологический университет»**

Кафедра морфологии

Дахужева З.Р., Неровных Л.П.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМУ ПО КУРСУ
«БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ»**

Для студентов специальностей

31.05.02 Педиатрия, 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.03 Стоматология,
33.05.01. Фармация

Майкоп - 2020

ББК 577.1(07)

УДК 28.707.2

Д 21

Печатается по решению научно-технического совета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Майкопский государственный технологический университет»

Составители:

канд. техн. наук

Дахужева З.Р.

канд. техн. наук

Неровных Л.П.

Рецензент:

канд.хим.наук

Голованова Т.Н.

Учебно-методическое пособие к лабораторному практикуму по курсу «Биологическая химия» для студентов специальностей 31.05.02 Педиатрия, 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.03 Стоматология, 33.05.01. Фармация / З.Р. Дахужева, Л.П. Неровных – Майкоп, 2020. - с.76

Лабораторный практикум, состоящий из 10 лабораторных работ. Каждая лабораторная работа включает теоретический материал, описание методик проведения анализов и вопросы для самоконтроля.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Работая в лаборатории, необходимо соблюдать меры предосторожности, придерживаясь следующих правил:

Общие сведения

- Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде.
- Работа в биохимической лаборатории допускается только в специальном халате, так как вероятна возможность загрязнения, порчи одежды при попадании на нее едких реактивов.

Обращение с реактивами

- Все концентрированные кислоты и щелочи должны находиться в вытяжном шкафу.
- Все опыты с ядовитыми и неприятно пахнущими веществами проводить в вытяжном шкафу.
- Наливать или насыпать реактивы следует только над столом.
- Не следует оставлять открытыми банки с реактивами.
- Пролитые или рассыпанные реактивы нужно немедленно удалить со стола, вытерев стол тряпкой и обмыв водой.
- Пролитые концентрированные кислоты следует засыпать песком, затем собрать песок лопаткой. Облитое место необходимо облить раствором соды и вытереть тряпкой.
- При работе с органическими растворителями (спирты, эфиры, ацетон, бензин и др.) нельзя определять вещество по запаху, так как может произойти отравление их парами.
- Наполнение пипеток растворами органических растворителей, кислот, щелочей проводят только при помощи груши.
- Внимательно следить за тем, чтобы реактивы (особенно кислоты и щелочи) не попадали на лицо, руки и одежду.

– Не ходить по лаборатории с концентрированными кислотами, а наливать их только в определенном, отведенном для этого месте.

– Не загрязнять реактивы во время работы (не путать пробки от склянок, содержащих разные реактивы; избыток взятого реактива не выливать обратно в склянку; пользуясь пипеткой, набирать каждый реактив только предназначенной для этого пипеткой, ни в коем случае не путать их).

– В случае попадания на кожу концентрированной кислоты облитое место нужно промыть большим количеством воды, а затем разбавленным раствором соды. При попадании растворов щелочей на кожу пораженное место нужно обмыть сначала разбавленной кислотой, а потом водой.

Обращение с нагревательными приборами

– Перед тем как зажечь спиртовку – убедиться, что поблизости нет горючих жидкостей (спирт, эфир и др.).

– Зажигать спиртовку можно только спичкой.

– В пробирке можно нагревать только небольшое количество раствора, жидкость должна занимать не более $\frac{1}{3}$ объема пробирки.

– Пробирку при нагревании нужно направить в сторону от себя и рядом находящихся людей.

– Нельзя наклоняться над спиртовкой. Вначале пробирку с раствором нужно прогреть всю, а затем нагревать в нужном месте, не вынимая из пламени спиртовки.

– Нельзя нагревать пробирку долго в одном месте, так как жидкость быстро закипит и выплеснется из пробирки.

– Нагревать пробирку нужно ниже уровня жидкости в ней.

– При нагревании жидкости держать пробирку отверстием в сторону от себя и тех, кто находится рядом, не касаться пробиркой горящего фитиля, всегда соблюдать большую осторожность при нагревании, не допускать выплескивания жидкости (время от времени отводить пробирку от пламени, не нагревать ее в вертикальном положении), не приближать лицо к сосуду, в котором нагревается жидкость.

- После нагревания следует сразу затушить спиртовку, накрыв пламя колпачком.
- Работа с водяной баней осуществляется только под тягой.
- При неосторожной работе могут быть ожоги нагретой стеклянной посудой. При ожогах на обожженное место нужно положить ватку, смоченную раствором марганцевокислого калия.

Закончив работу, привести рабочее место в порядок.

Лабораторная работа № 7

Тема: «Основы метода полимеразной цепной реакции»

Цель: изучение принципа действия метода полимеразной цепной реакции.

Теоретическая часть

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод, который позволяет найти в исследуемом клиническом материале небольшой участок генетической информации любого организма, специфичный только для данного вида организмов, среди огромного количества других участков и многократно размножить его.

Принцип метода: Метод ПЦР основан на естественной репликации ДНК, включающей расплетение двойной спирали ДНК, расхождение нитей ДНК и комплиментарное дополнение обеих.

Репликация ДНК в ПЦР-методе может начаться не в любой точке, а только в определенных **стартовых блоках** – коротких двунитевых участках ДНК. Суть метода заключается в том, что, маркируя такими блоками специфический только для данного вида организмов участок ДНК, можно многократно воспроизвести (**амплифицировать**) именно этот участок.

Для того чтобы осуществить такой процесс *in vitro* (в пробирке), используют две генетические пробы, называемые **праймерами**, которые служат в качестве затравки для синтеза выбранного участка ДНК. При внесении в исследуемую пробу праймеры подобно паре генетических детективов прочесывают раствор в поисках участка, которому они комплементарны и, следовательно, способны присоединиться, образовав двунитчатый стартовый участок. После присоединения праймеров (**отжиг**) начинается воспроизведение специфического фрагмента ДНК с помощью фермента **Taq-полимеразы**. Вновь

синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации – это и есть цепная полимеразная реакция в ПЦР-методе. В результате ее количество копий специфического участка ДНК увеличивается в геометрической прогрессии и через 25 циклов амплификации синтезируются 10^6 копий фрагмента. В течение 30-40 циклов нарабатывается количество ДНК, достаточное, чтобы визуально учитывать результаты реакции после электрофореза в агарозном геле. Протекание ПЦР (т.е. переход от стадии к стадии и от цикла к циклу) регулируется изменением температуры рабочей смеси:

1. **температура денатурации ДНК** является функцией ионной силы используемого буфера;
2. **температура отжига** – температура, при которой возможно связывание праймера с матрицей, зависит от длины праймера и его первичной структуры;
3. **температура элонгации**, зависит от типа используемой ДНК-полимеразы.

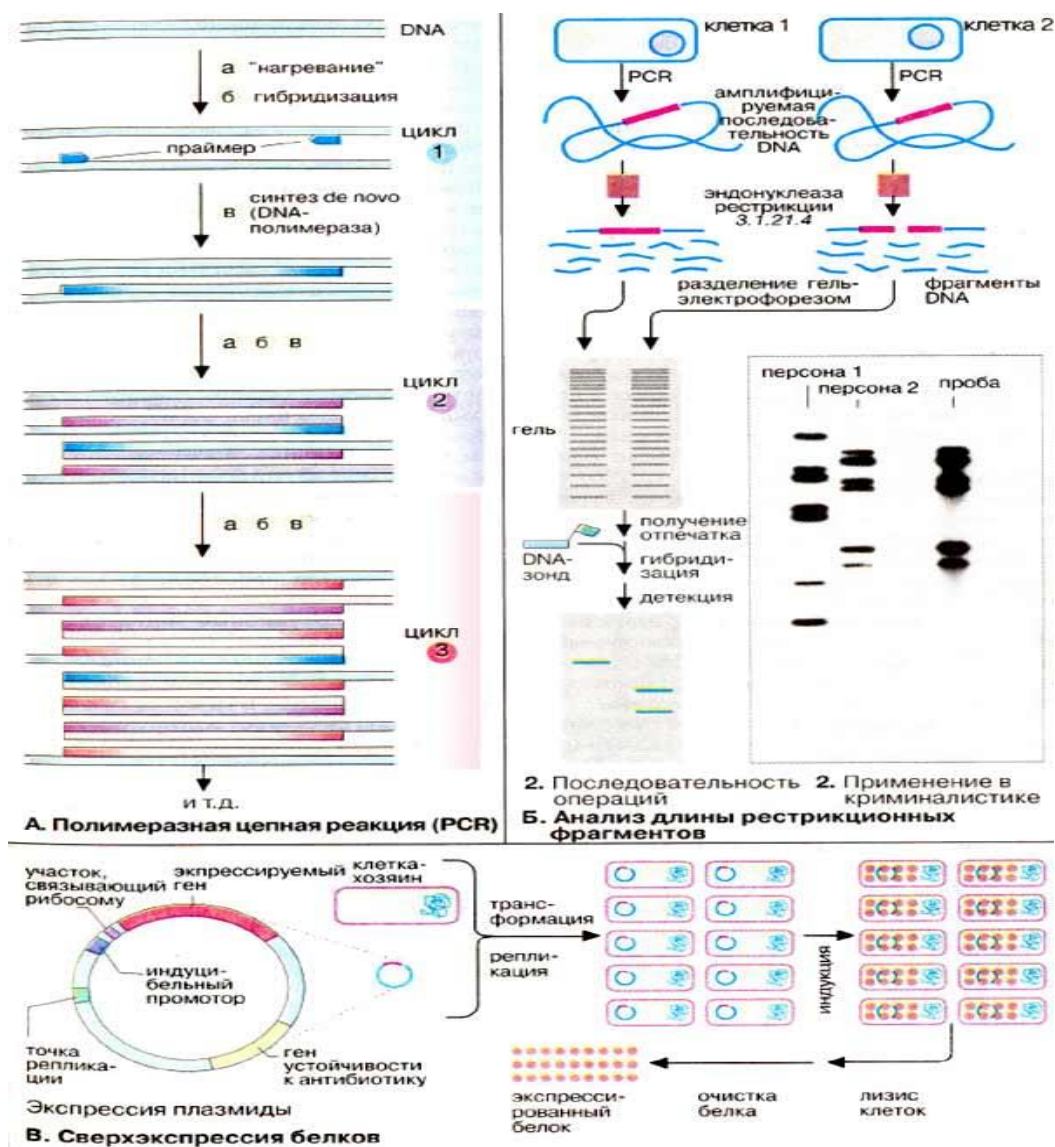
Чувствительность: очень высокая: около 10 бактериальных клеток, в то время как чувствительность иммунологических и микроскопических тестов колеблется в пределах 10^3 - 10^6 клеток.

Специфичность: 100 %.

Для ПЦР-анализа пригоден любой материал, в том числе и гистологические препараты.

Количество исследуемого материала составляет несколько десятков мл, но при низкой концентрации возбудителя может быть увеличен в сотни и тысячи раз за счет необходимости экстракции ДНК и РНК.

Исследуемый материал можно дезинфицировать химической или термической обработкой в момент его забора, и, следовательно исключается возможность инфицирования персонала в процессе проведения ПЦР.



Оборудование и реагенты:

В настоящее время метод ПЦР автоматизирован, довольно прост в исполнении и доступен любой молекулярно-биологической лаборатории. Для получения ответа на интересующие вопросы диагностики достаточно лишь смешать в пробирке:

- 1) ДНК-мишень, 10 нг/мкл;
- 2) Праймеры – короткие олигонуклеотиды (20-30 нукл.) – затравки, комплиментарные 3'-концевым последовательностям антипараллельных цепей ДНК гена, 2 шт., концентрация каждого 5 пмоль/мкл;
- 3) Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты 4 типов, смесь 2мМ;

- 4) *Taq*-ДНК-полимераза термостабильная, 5 Е/мкл (название свое фермент получает по имени штамма-продуцента);
- 5) ПЦР-буфер (ТРИС-буфер (рН 8.4), 200мМ; KCl, 500мМ; 0.01% Tween 20);
- 6) раствор MgCl₂, 25мМ;
- 7) Вода деионизованная;
- 8) Программируемый термостат (**амплификатор**), который по заданной программе автоматически проводит смену температур реакционной среды.

Определение можно проводить в разнообразном клиническом материале (кровь, сыворотка, лаважные массы, мокрота, слюна, желудочный сок, биопсийный материал, мазки, смывы) и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва).

Проведение анализа

ПЦР состоит из 3 основных процедур:

1. подготовки исследуемой пробы материала (изоляция ДНК или РНК);
2. собственно ПЦР;
3. детекция продукта ПЦР (амплифицированной ДНК).

Пятью основными компонентами ПЦР являются следующие:

- a. фермент *Taq*-ДНК-полимераза;
- b. пара олигонуклеотидных праймеров;
- c. 4 типа дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATФ, dГТФ, dЦТФ, dТТФ);
- d. копируемая ДНК;
- e. ионы Mg⁺².

Вспомогательными компонентами являются буферный раствор и минеральное масло.

Поскольку праймеры каждый раз встраиваются в амплифицируемые фрагменты ДНК-матрицы (**амплификоны**), то они в реакционной смеси ПЦР присутствуют в избытке.

Как правило, праймеры для ПЦР-детекции инфекционных возбудителей создают на консервативные участки их ДНК, которые редко подвергаются

генетическим перестройкам. Поиски таких участков осуществляют при помощи специальных компьютерных программ.

Результаты получают через несколько часов, то есть в течение одного рабочего дня.

Методика:

Рассмотрим ПЦР-анализ на примере амплификации участка плазмиды pBluescript II SK, размером ~ 180 п.н.

ПЦР проводится в объеме 10-100 мкл. Рабочая концентрация праймеров в реакционной смеси составляет 0.2-1 пмоль/мкл. Количество матричной ДНК, добавляемой в реакцию колеблется в пределах от 10 до 1000 нг. Рабочая концентрация *Taq*-ДНК-полимеразы в реакционной смеси составляет 0.01-0.05 Е/мкл. Считается, что "скорость" достраивания у *Taq*-ДНК-полимеразы составляет 1000 нуклеотидов в минуту .

Ход работы

1. В стерильном эппендорфе на 0,5 мл смешать указанные выше компоненты, довести объем при помощи деионизованной воды до 20 мкл, аккуратно перемешать реакционную смесь пипетированием.
2. Наслоить на реакционную смесь немного минерального масла (приблизительно 30 мкл).
3. Поместить пробирки в амплификатор. Реакцию проводить в следующем режиме:

Температура, С	Стадия	Время	Число циклов
96	Денатурация	40 сек	25
50	Отжиг	30 сек	
72	Элонгация	30 сек	
72		10 мин	1
0		хранение	1

4. Детекция продуктов амплификации проводится методом электрофореза на агарозном геле.

Работать следует только в одноразовых перчатках и сменной обуви.

Чувствительность ПЦР может достигать математически возможного предела (детекция 1 копии ДНК-матрицы), поэтому существует высокая степень опасности получения ложно-положительного результата в силу переноса через предметы и реагенты как самой ДНК-матрицы (реже), так и амплификатов (очень часто), получаемых в больших количествах во многих пробирках в течение ежедневной работы. В связи с этим нами разработаны специальные требования к планировке и режиму работы ПЦР-генодиагностической лаборатории. Поэтому детекция продуктов ПЦР должна проводиться в изолированной комнате сотрудником, не производящим обработку клинических образцов и не готовящим реактивы для ПЦР. Приготовление основных растворов также должно производиться в отдельной чистой комнате. Все растворы должны храниться и использоваться в небольших порциях.

Клинико-диагностическое значение: ПЦР в настоящее время является наиболее совершенным диагностическим методом, позволяющим выявлять единичные клетки возбудителей многих инфекционных заболеваний за счет амплификации специфических для этих возбудителей фрагментов ДНК.

ПЦР позволяет обнаруживать патогенные для человека бактерии и вирусы даже в тех случаях, когда другими способами (иммунологическим, бактериологическим, микроскопическим) их выявление невозможно.

Тест-системы на основе ПЦР эффективны при диагностике трудно культивируемых, не культивируемых и персистирующих форм патогенных бактерий. С этим приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, а также при тестировании объектов внешней среды.

Метод позволяет определять число копий возбудителя в пробе и тем самым контролировать вирусологию или бактериологию в процессе лечения.

Метод также пригоден для выявления носителей дефектных генов (например ген HbS серповидно-клеточной анемии).

ПЦР-диагностикумы, в отличие от иммунологических тест-систем, позволяют избежать проблем, связанных с перекрестно-реагирующими антигенами, тем самым обеспечивая абсолютную специфичность определения патогенного организма.

Сделать **выводы** относительно клинико-биологического значения метода ПЦР.

Список литературы:

1. Биохимия [Электронный ресурс]: учебник / под ред. Е. С. Северина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 768 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970433126.html>
2. Биохимия [Электронный ресурс]: учебник / под ред. Е. С. Северина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 768 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427866.html>
3. Биологическая химия с упражнениями и задачами [Электронный ресурс]: учебник / под ред. С.Е. Северина - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014.-624 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970430279.html>
4. Биологическая химия. Ситуационные задачи и тесты [Электронный ресурс]: учебное пособие / А. Е. Губарева [и др.]; под ред. А. Е. Губаревой. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 528 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970435618.html>
5. Биохимия с упражнениями и задачами [Электронный ресурс]: учебник / Северин Е.С. и др. / под ред. Е.С. Северина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 384 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970417362.html>
6. Биохимия. Руководство к практическим занятиям [Электронный ресурс]: учебное пособие / Н.Н Чернов и др.; под ред. Н.Н. Чернова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 240 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970412879.html>
7. Клиническая биохимия: учебное пособие / под ред. В.А. Ткачука. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 264 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970407332.htm>
8. Вавилова Т.П. Биологическая химия в вопросах и ответах [Электронный ресурс]: учебное пособие / Т.П. Вавилова, О.Л. Евстафьева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 128 с. – ЭБС

СОДЕРЖАНИЕ

Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории	4
Лабораторные работы	7
Лабораторная работа № 1.	7
Лабораторная работа № 2.	12
Лабораторная работа № 3.	17
Лабораторная работа № 4.	24
Лабораторная работа № 5.	29
Лабораторная работа № 6.	38
Лабораторная работа № 7.	43
Лабораторная работа № 8.	50
Лабораторная работа № 9.	58
Лабораторная работа № 10.	56
Список литературы	76