

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КРЕМЕНЧУЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ МИХАЙЛА ОСТРОГРАДСЬКОГО



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ  
ЩОДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ  
З НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ  
**«БІОІНЖЕНЕРІЯ»**  
ДЛЯ СТУДЕНТІВ ДЕННОЇ ФОРМИ НАВЧАННЯ  
ЗА НАПРЯМОМ 6.051401 – «БІОТЕХНОЛОГІЯ»

КРЕМЕНЧУК 2017

Методичні вказівки щодо виконання лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Біоінженерія» для студентів денної форми навчання за напрямом 6.051401 – «Біотехнологія»

Укладач: к. т. н., ст. викл. О. А. Сагун

Рецензент к. т. н., доц. А. В. Пасенко

Кафедра біотехнології та здоров'я людини

Затверджено методичною радою Кременчуцького національного університету імені Михайла Остроградського

Протокол №\_\_ від\_\_\_\_\_ 2017.

Голова методичної ради

проф. В. В. Костін

## ЗМІСТ

Вступ.....	4
1 Перелік лабораторних робіт.....	6
Лабораторні роботи № 1, 2 Отримання калюсних тканин.....	6
Лабораторна робота № 3 Визначення динаміки росту калюсних культур .....	10
Лабораторна робота № 4 Культура ізольованих протопластів вищих рослин ...	13
2 Критерії оцінювання знань студентів.....	17
Список літератури.....	20

## ВСТУП

**Предметом вивчення навчальної дисципліни «Біоінженерія» є біоагенти, біопроцеси, біологічний інструментарій та інші складові біоінженерних технологій, які застосовують у різних галузях господарства, медицині та у виробництві практично цінних продуктів.**

**1.1. Метою викладання навчальної дисципліни «Біоінженерія» є ознайомлення студентів напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» з принципами та методологією біоінженерних технологій, що використовують для вирішення прикладних завдань у біотехнологічних виробництвах, медицині та інших галузях господарства.**

### **1.2. Основними завданнями вивчення дисципліни «Біоінженерія» є:**

- отримання знань щодо основних сучасних біоінженерних технологій;
- ознайомлення зі складовими біоінженерних технологій: біоагентами, біооб'єктами, біопроцесами, біологічним інструментарієм, субстратами, продуктами, процесами й обладнанням;
- формування базових знань з методології отримання рекомбінантних ДНК, клонування фрагментів ДНК, будови векторів на основі прокариот та еукаріот, створення бібліотек геномів, рестрикційних карт та ін.;
- ознайомлення студентів з біоінженерними рішеннями у біологічних технологіях, що застосовуються у виробництві продукції рослинницької і тваринницької галузей, у фармакології, медицині, харчовій промисловості, екології та ін.;
- формування у студентів теоретичної бази професійної підготовки щодо вільного орієнтування у вирішенні практичних задач в біотехнології із застосуванням біоінженерних методів;
- формування у студентів наукового практичного світогляду, аналітичного мислення, які сприятимуть вирішенню глобальних проблем сьогодення: екологічних, енергетичних, продовольчих і охорони здоров'я людини шляхом впровадження новітніх біоінженерних процесів.

**1.3. Згідно з вимогами освітньо-професійної програми студенти повинні:**

**знати:** теоретичні основи біоінженерних технологій; прикладні аспекти біоінженерії: білкової, генної, геномної, клітинної, тканинної; основні принципи, способи та засоби культивування *in vitro* в біоінженерних технологіях; методологічні основи селекції, мутагенезу та добору у рослинництві й тваринництві, отримання іммобілізованих препаратів, їх використання у сучасній біоінженерії; методологію одержання рекомбінантних ДНК, клонування фрагментів ДНК, побудови векторів на основі прокариот та еукаріот, створення бібліотек геномів, рестрикційних карт, отримання генетично модифікованих організмів, трансгенних рослин і тварин; основні напрями та перспективи сучасної біоінженерії.

**вміти:** використовувати теоретичні знання при реалізації біоінженерних технологій; застосовувати методологічну базу генетики, органічної та біологічної хімії, мікробіології при вирішенні прикладних завдань з біоінженерії; застосовувати технологічні прийоми культивування клітин різних організмів, складання живильних середовищ, отримання іммобілізованих препаратів, одержання рекомбінантних ДНК, клонування фрагментів ДНК, побудови векторів на основі прокариот та еукаріот, створення бібліотек геномів, рестрикційних карт, отримання генетично модифікованих організмів, трансгенних рослин і тварин та ін.; обирати оптимальні умови для отримання біоінженерного продукту в результаті рекомбінації ДНК та трансформації генетичного матеріалу; проводити аналіз і прогнозувати біоінженерні процеси, наслідки їх реалізації у біологічних технологіях різних галузей господарства; моделювати та впроваджувати біоінженерні рішення у різних галузях господарства.

Звіт до лабораторної роботи повинен включати в себе такі елементи: тема, мета роботи; обладнання; початкові елементи, якими має володіти студент; короткі та лаконічні відповіді на контрольні питання; зарисовки у лабораторному альбомі відповідно до поставлених у роботі завдань.

# 1 ПЕРЕЛІК ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

## Лабораторні роботи № 1, 2

### Тема. Отримання калюсних тканин

**Мета:** отримати стерильну калюсну тканину із експлантатів листкового, стеблового, черешкового і міжвузлового походження; порівняти частоту калюсоутворення на експлантатах різного походження.

**Обладнання та реактиви:** асептичні рослини картоплі, гвоздики або тютюну, чашки Петрі зі стерильним середовищем для калюсу, стерильні чашки Петрі, скальпелі, пінцети, леза, спирт, спиртівка, ламінар-бокс, парафільм.

**Навчальні елементи:** калюсні тканини, експлант, стерилізація.

**Техніка безпеки:** робота з хімічними речовинами, колючо-ріжучими предметами.

### Короткі теоретичні відомості

Калюсною тканиною вищої рослини називають тканину, яка виникла шляхом неорганізованої проліферації із експлантів органів рослин після першого субкультивування. Крім того, калюс утворюється в місцях пошкодження рослин

Калюсні тканини можна також отримати із ізольованих клітин та їх агрегатів із суспензійної культури. Якщо, наприклад, клітинна культура звикла до росту в умовах суспензії, то при висаджуванні на агар, ріст її значно покращується.

Насіння є чудовим вихідним матеріалом у наступних випадках:

– для отримання калюсу шляхом посадки цілих насінин на агаризоване середовище, яке містить регулятори росту;

– для отримання із проростаючого насіння, яке помістили на агаризоване середовище без регуляторів росту, стерильних пагонів, коренів і листя, які потім використовують, як експланти;

– для ізолювання тканин зародкового корінця і зародкової бруньки із насіння і подальшого їх використання як експлантів.

Загальними факторами, які визначають ефективність дедиференціації тканини експланту і розвитку первинного калюсу є:

1. Генотип вихідної рослини. При цьому сорти, лінії в межах виду можуть суттєво відрізнятися;

2. Епігенетична характеристика експланту, в тому числі однорідність і неоднорідність тканини за рахунок груп різних клітин.

3. Зовнішні умови, із яких найбільш важливі екзогенні регулятори росту (переважно фітогормони), а також речовини, що діють як засоби проти виділення експлантом блокуючих калюсогенез речовин (активоване вугілля, антиоксиданти).

Для отримання калюсу найчастіше використовують середовище Уайта, Мурасіге-Скуга, Гамборга, які доповнені 2 % сахарозою чи глюкозою, сумішшю вітамінів та регуляторами росту (таблиця 1.1). Для одержання первинного калюсу, експланти тканин рекомендують культивувати одночасно на декількох середовищах з різним співвідношенням регуляторів росту.

Успіх отримання калюсу залежить від підбору регуляторів росту, які індукують клітинне ділення. Як ауксини використовують 2,4 Д та індолілоцтову кислоту. Індолілоцтова кислота має меншу активність завдяки тому, що вона руйнується ІОК-оксидазою первинного експланту. Для індукції утворення калюсу речовини ауксинової природи використовують в 10 разів вищій, ніж та, яка використовується для підтримки його росту. Іноді необхідно вносити більш складні компоненти, такі як кокосове молоко (5-20%), гідролізат казеїну (200-800 мг/л), дріжджовий екстракт (50-100 мг/л).

Деякі тканини мають фізіологічну полярність. Очевидно в зв'язку з цим калюс утворюється більш інтенсивно на стороні експланту, яка на материнській рослині повернена до кореня, тому при отриманні калюсу на фрагментах стебла, шматочках коренеплоду моркви, пастернаку, петрушки, експланти поміщають на агар апікальною стороною. У випадку ізоляції експлантів із бульбоплодів (топінамбур, картопля) полярність значення не має.

Інтенсивність росту окремих калюсів одного і того ж варіанту може значно варіювати. Тому окремі варіанти дослідів з калюсними тканинами повинні мати не менше шести повторностей.

Таблиця 1.1

Середовища для культивування *in vitro* рослин і калюсної тканини

Компоненти	Середовище для рослин - МС	Калюсне середовище №1*	Калюсне середовище №2**
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1650	1650
KNO <sub>3</sub>	1900	1900	1900
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	440	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	170
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	37,3	37,3	37,3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6	6	6
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	8,6
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
KI	0,83	0,83	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	22,3
Мезоінозит	100	100	100
PP	0,5	0,5	0,5
B <sub>1</sub>	0,1	0,1	0,1
B <sub>6</sub>	0,5	0,5	0,5
НОК			2
2,4-Д		3	2
Кінетин		1	1
Сахароза	30000	25000	25000
Агар	0,7%	0,7%	0,7%
pH	5,6 – 5,8		

\* - середовище для калюсу картоплі

\*\* - середовище для калюсу гвоздики, тютюну, топінамбура, сої, моркви

## Стерилізація та отримання калюсу з рослинного матеріалу

## I. Насіння

1. Приготувати розчини “білизни” необхідної концентрації:

2. Промити насінини сої мильним розчином. У марлеві мішечки покласти по 10 насінин. Промиті насінини у боксі на 1 хв помістити у стаканчик з 70 % етанолом.



3. Стерильним пінцетом перенести мішечки з насінинами у стаканчики з відповідною концентрацією стерилізуючого розчину і витримати 15 хв. Об'єм насіння має займати 1/4 об'єму стерилізуючого розчину. Мішечки потрібно перевертати кожні 2 хвилини, щоб розчин гарно змочував насіння.

4. Простерилізоване насіння промити у стерильній дистильованій воді. Стерильним пінцетом перенести мішечки із стакана зі стерилізуючим розчином у стакан із стерильною дистильованою водою. Витримати 10 хв. Промивання повторити 3 рази використовуючи нову порцію води. Мішечки з промитим насінням стерильним пінцетом перенести у стерильну чашку петрі з проавтоклавованими паперовими фільтрами, щоб забрати надлишок води.

5. Стерильним пінцетом перенести один із мішечків до іншої чашки петрі, розгорнути його двома пінцетами і згребти насіння у чашку петрі. Стерильним пінцетом перенести насінини на безгормональне живильне середовище у пробірки.

6. Відкрити пробірку, обпалити горло пробірки у полум'ї спиртівки, стерильним пінцетом помістити насінину на середовище, знову обпалити горло пробірки і пробку у полум'ї спиртівки, після чого закрити пробірку пробкою. Підписати пробірку, зазначивши середовище, вид або сорт рослини і дату посадки.

7. Пробірки з насінням помістити у термостат при температурі  $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Перевірити чистоту посіву і схожість насіння. Після проростання насіння пробірки перенести у термостат з освітленням і температурою  $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

## II. Бульб, коренеплодів і кореневищ

1. Бульби вимити проточною водою. Обчистити бульби від шкірки. Бульби вимити у мильному розчині, а потім ополоснути дистиллятом.

2. У боксі бульбу на кілька секунд занурити у спирт, дати йому стекти і обпалити бульбу у полум'ї спиртівки.

3. Покласти обпалену бульбу у стерильну чашку Петрі.

4. Притримуючи картоплину стерильним пінцетом, скальпелем відрізати частину бульби. Стерильним пробковим свердлом вичленити циліндр з бульби.

Циліндр тканини порізати скальпелем на диски, які помістити на середовище для калюсогенезу. Два крайні диски відкинути.

5. Чашки Петрі підписати і закрити парафілом. Чашки з експлантатами культивувати у термостаті без освітлення при  $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### **Хід роботи**

Завдання 1. Отримати первинний калюс із різних експлантатів рослин

1. Приготувати середовище для отримання калюсної культури.
2. Підготувати стерильний експлант. Підтримуючи рослину пінцетом, скальпелем розрізати її на експлантати: стебло, міжвузля, листок і черешок ( 5-10 мм ).
3. Помістити стерильний експлант у стерильну чашку з калюсогенним середовищем.
4. Провести культивування. Чашки з рослинним матеріалом культивувати у термостаті при температурі  $25\pm 10^{\circ}\text{C}$ .
5. Систематично контролювати процес калюсоутворення.

### **Контрольні питання**

1. Поняття «калюсна тканина».
2. Фактори, від яких залежить утворення первинного калюсу.

**Література:** [1, с. 132–150; 2, с. 84–89; 3, с. 60–80; 4, с. 112–180; 5, с. 373–388; 6, с. 24–25; 7, с. 139–389; 9; 11, с. 110–140; 13, с. 30–100; 15, с. 100–200; 20, с. 80–160; 23, с. 210–364; 30, с. 67–108; 31].

### **Лабораторна робота № 3**

**Тема. Визначення динаміки росту калюсних культур**

**Мета:** визначити вагову динаміку калюсних культур.

**Обладнання та реактиви:** мікроскопи, мікропрепарати тканин організму людини.

**Навчальні елементи:** щільність клітинної популяції, питома швидкість росту, мінімальний час подвоєння клітинної популяції, вага сирої речовини, вага сухої речовини, об'єм біомаси клітин, середній об'єм клітини.

## Короткі теоретичні відомості

Фактори, які впливають на дисоціацію калюсу:

- 1) тип вихідної калюсної тканини (оптимальною є калюсна тканина рихлого типу, яка легко піддається фрагментації. Рихлість калюсної тканини досягається виключенням цитокінінів із середовища на якому культивується калюс);
- 2) умови росту калюсної або суспензійної культури, які зменшують механічну стабілізацію сусідніх клітинних стінок, також сприяють їх рихлості;
- 3) видалення пектинату кальцію – основного матеріалу, який пов'язує рослинні клітини. Видалення пектинату кальцію може бути здійснено шляхом вилучення кальцію із середовища ферментативно або зв'язуванням його хелатами. При цьому як хелатуючий агент використовують оксалат амонію.

Основні параметри росту культури клітинних суспензій.

1. Щільність клітинної популяції – концентрація клітин в 1мл суспензії. По величині щільності клітинної популяції можна визначити питому швидкість росту і час генерації клітин.
2. Питома швидкість росту – швидкість збільшення одиниці біомаси популяції за певний проміжок часу, визначається по формулі.
3. Максимальна питома швидкість росту, відноситься до характеристики росту клітинних популяцій в турбідостатній культурі, де поживні елементи середовища містяться в нелімітованій кількості.
4. Мінімальний час подвоєння клітинної популяції – час, необхідний для того, щоб концентрація біомаси популяції подвоїлась. Ріст рослинних суспензійних культур вимірюється визначенням сухої і сирої речовини клітин, кількості клітин, об'єму біомаси клітин, розміру клітин, середнього об'єму клітин, вмісту білку.
5. Вага сирої речовини визначається після розміщення клітин на попередньо зважений фільтр із нейлонової тканини після промивання водою від залишків поживного середовища.

6. Вага сухої речовини встановлюється після висушування певної наважки сирової біомаси клітин на попередньо зваженому паперовому фільтрі при 60-70°C протягом доби.

7. Кількість клітин визначаємо в 1 мл дисоційованої суспензії по методу Брауна.

8. Об'єм біомаси клітин виражають в мл клітинного осаду на 1 мл культури. Визначають центрифугуванням суспензії і подальшим її відстоюванням.

9. Середній об'єм клітини визначають відношенням величини об'єму біомаси клітин до кількості клітин.

10. Розмір клітин визначають вимірюванням їх довжини і ширини під мікроскопом з допомогою шкали окуляр-мікрометра та об'єкт мікрометра.

11. Вміст білку визначають відношенням кількості білку в суспензійній культурі до кількості клітин.

12. Життєздатність культури визначаємо відношенням кількості життєздатних клітин до загальної кількості клітин в 1 мл культури.

### **Хід роботи**

Завдання 1. Визначити динаміку росту калюсу

1. Кожний шматочок калюсу вийняти із флакончика, відокремити від нього агар і зважити.

2. Відносний приріст маси калюсної тканини визначити за формулою:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot 100\% ,$$

де  $\Delta W$  – відносний приріст маси,

$W_0$  – початкова маса калюсу,

$W_t$  – кінцева маса калюсу.

## Завдання 2. Занести дані до таблиці

№ п/п	Експлант	Термін росту калюсу	Середня вага калюсу, мг		Відносний приріст маси калюсу, %
			початкова	кінцева	

### Контрольні питання

1. Охарактеризуйте параметри росту культури клітинних суспензій.
2. Спосіб визначення відносного приросту культури.

**Література:** [8, с. 100–120; 10, с. 70–100; 12, с. 80–120; 16, с. 50–180; 18, с. 70–98; 22, с. 70–130; 24, с. 101–237; 28, с. 110–199; 32].

### Лабораторна робота № 4

#### Тема. Культура ізолюваних протопластів вищих рослин

**Мета:** отримати ізолювані протопласти із мезофілу листка рослин картоплі.

**Обладнання та реактиви:** асептичні рослини картоплі, ферментні препарати, глюкоза, сахароза, ксилоза, манітол,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , мезоінозит, гліцин, нікотинова кислота, фолієва кислота, біотин, аденін сульфат, гідролізат казеїну, тіамін, піридоксин, ІОК, НОК, 2,4-Д, БАП, зеатин, 1N КОН, агар, стакани на 200 мл, мірні циліндри, мірні піпетки, пастерівські піпетки, чашки Петрі діаметром 60 мм і 100 мм, колби Ерленмейера на 250 мл і 50 мл, колбочки зі скляними лійками і нейлоновими фільтрами (діаметр пор 50-100 мкм), центрифужні пробірки з гумовими пробками, шприц з насадкою з фільтрами “Millipore” з діаметром пор 0,22 мкм або 0,45 мкм, стерильний фільтр Зейтца, ваги, шпатель, пінцети, скальпелі, лезо у держаку, магнітний змішувач, рН-метр, настільна центрифуга, інвертований мікроскоп, плитка, автоклав, ламінар-бокс, спиртівка, вата, фольга, спирт, парафілм.

**Навчальні елементи:** культура ізолюваних тканин і клітин, виділення протопластів, ферментні розчини.

**Техніка безпеки:** робота з оптикою, з хімічними речовинами, колючо-ріжучими предметами.

### **Короткі теоретичні відомості**

Культура ізольованих тканин і клітин – це метод вирощування відокремлених від організму тканин і клітин на відповідних поживних середовищах за умов стерильності. Засновниками цього методу є американські вчені Р. Гаррісон (1907) і А. Каррель (1912). Методи вирощування рослинних тканин були розроблені значно пізніше Ф. Уайтом і Р. Готре.

У культурі ізольовані клітини і тканини зберігають характерні властивості того виду, з якого вони були взяті. Це зумовлюється стабільністю їх основних генетичних характеристик, адже соматичні клітини мають такий самий генотип, як і зигота, з якої вони виникли. Здебільшого клітини зберігають здатність до специфічних для певного виду синтезів. Наприклад, клітини нирок людини *in vitro* можуть синтезувати урокіназу, клітини ссавців — противірусний білок інтерферон, а клітини женьшеню — фармакологічно активні сполуки, які мають значний стимулюючий ефект. Крім того, в культурі тканин адекватно відбиваються навіть комплексні фізіологічні властивості виду, такі як стійкість до низьких температур. Так, калусні клітини лимону виявляються нестійкими до низьких температур, а клітини яблуні сибірської та ялини витримують проморожування до  $-50^{\circ}\text{C}$ .

При виділенні протопластів із культури тканин (калюс або клітинна суспензія) необхідно враховувати:

1) вік вихідної тканини у циклі вирощування: краще використовувати тканину, що перебуває на стадії раннього експоненціального росту, коли у популяції значна кількість клітин, які здатні почати поділ;

2) особливості росту тканини – для виділення протопластів краще використовувати пухку, недиференційовану тканину, яка утворює невеликі агрегати клітин при культивуванні у рідкому середовищі.

Важливе значення для успішного виділення життєздатних, нативних протопластів має підбір осмотичного стабілізатора.

Відсутність оболонки полегшує надходження у клітину різних фізіологічно активних речовин і дозволяє спостерігати за первинною реакцією клітини на вплив цих речовин, досліджувати метаболізм у контрольованих умовах. Так як в ізольованих протопластах одразу починається регенерація клітинної оболонки, то вони є дуже зручним об'єктом для вивчення формування целюлозних мікрофібрил.

Протопласти вищих рослин можна отримувати механічним і/або ферментативним методом. Виділити протопласти можна з клітин рослинних тканин, культури калусів і суспензійної культури. Оптимальні умови для ізоляції протопластів для різних об'єктів індивідуальні, що вимагає кропіткої попередньої роботи по підборі концентрацій ферментів, їх співвідношення, часу обробки. Дуже важливим чинником, що дозволяє виділяти цілі життєздатні протопласти, є підбір осмотичного стабілізатора. Як стабілізатори зазвичай використовують різні цукру, іноді іонні осмотики (розчини солей  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ). Концентрація осмотиків повинна бути небагато гіпертонічна, щоб протопласти знаходилися в стані слабого плазмолізу. У цьому випадку гальмуються метаболізм і регенерація клітинної стінки.

Незважаючи на модифікації і вдосконалення механічний метод і сьогодні має певні обмеження:

- 1) цим методом можна виділити тільки невелику кількість протопластів;
- 2) використовуються тільки ті тканини, в яких відбувається інтенсивний плазмоліз, тобто ті які мають вакуолізовані клітини паренхімного типу;
- 3) метод тривалий і трудомісткий, а тому зараз використовується дуже рідко.

### **Хід роботи**

Завдання 1. Розгляньте під мікроскопом готові мікропрепарати з елементами механічної тканини. Виявіть особливості її будови, форму клітин.

#### **1. Виділення протопластів**

Тканину рослин обробити ферментними розчинами. Розчини ферментів стерилізують, продавлюючи 75 їх через мембранні фільтри фірми „Millipore”.

Для ферментації використовують молоді листочки, з яких попередньо знімають нижній епідерміс для кращого проникнення ферментів між клітинами.

Очищене від епідермісу листя розмістити на поверхні рідкого ферментного розчину в чашки Петрі та помістити у термостат, де відбувається інкубація при температурі 28-30°C протягом 15-18 годин.

## 2. Посів

Отримані суспензії протопластів фільтрують через нейлонові фільтри з метою очищення від крупних фрагментів тканин і переносять у центрифужні пробірки. Повного очищення протопластів від фрагментів зруйнованих тканин і клітин, а також ферментів досягають за допомогою трьохкратного центрифугування суспензії протопластів при 1000 об/хв протягом 3 хвилин в розчині, що не містить ферментів. При таких умовах життєздатні протопласти спливають на поверхню і їх відбирають за допомогою пастерівської піпетки. Відібрані протопласти ресуспендують у невеликій кількості (0,5 мл) середовища, яке будуть використовувати для культивування протопластів (Мурасиге і Скуга, Као і Михайлюка), після чого акуратно переносять в чашку Петрі (6-10 см в діаметрі), в яку попередньо вносять 6-10 мл ідентичного середовища. Оптимальна щільність висіву протопластів має складати біля 10<sup>3</sup> клітин в 1 мл середовища. Контроль за щільністю висіву здійснюють за допомогою камери Горяєва або Фукса-Розенталя.

3. Культивування протопластів здійснюється на розсіяному світлі або в термостаті при температурі 26-28 °С. Якість протопластів і контроль за їх поділом здійснюють за допомогою інвертованого мікроскопа.

Завдання 2. Замалювати ізольовані протопласти і клітинні колонії.

## Контрольні питання

1. Особливості виділення протопластів.
2. Умови посіву протопластів.

**Література:** [1, с. 132–150; 2, с. 89–112; 4, с. 213–240; 7, с. 202–394; 9; 13, с. 180–200; 14; 17, с. 250–306; 19, с. 60–130; 21, с. 180–200; 25; 27, с. 70–118; 29, с. 64–181].



## **2 КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ ЗНАНЬ СТУДЕНТІВ**

### **A 5 (відмінно) 90–100**

Студент має глибокі, міцні і системні знання з усього теоретичного курсу, може чітко сформулювати та використовує у своїх відповідях спеціальну термінологію, володіє латинськими назвами, володіє понятійним апаратом; уміє застосувати здобуті теоретичні знання під час розв'язання практичних завдань, що стосується нових технологій дослідження структури клітини; самостійно може підготувати змістовний реферат і захистити основні його положення.

### **B 4,5 (добре) 85–89**

Студент має глибокі, міцні та системні знання з усього теоретичного курсу, може чітко сформулювати та використовує у своїх відповідях спеціальну термінологію, володіє понятійним апаратом, латинськими назвами, але у своїх відповідях може допустити неточності, зустрічаються незначні помилки під час виконання завдань; самостійно може підготувати змістовний реферат і захистити основні його положення.

### **C 4 (добре) 75–84**

Студент знає програмний матеріал у повному обсязі, має практичні вміння, але не вміє самостійно логічно мислити, зокрема, підготувати реферат і захищати його положення. Відповідь його повна, змістовна, але з певними неточностями.

### **D 3,5 (задовільно) 65–74**

Студент відтворює значну частину теоретичного матеріалу, виявляє знання і розуміння основних положень, за допомогою викладача може аналізувати матеріал, виправляти помилки, серед яких є значна кількість суттєвих. За допомогою викладача може підготувати реферативну роботу.

### **Е 3 (задовільно) 60–64**

Студент має початковий рівень знань, володіє необхідними уміннями та навичками для вирішення стандартних завдань; виявляє розуміння основних положень навчального матеріалу на репродуктивному (відтворюючому) рівні; здатний з помилками дати визначення понять та термінів, що вивчаються; може самостійно оволодівати частиною навчального матеріалу, але висновки робить нелогічні, непослідовні.

### **FX 2 (незадовільно) 35–59**

Студент мало усвідомлює мету навчально-пізнавальної діяльності; слабо орієнтується в поняттях, визначеннях; самостійне опрацювання навчального матеріалу викликає значні труднощі; робить спробу розповісти суть заданого, але відповідає лише за допомогою викладача на рівні «так» чи «ні»; однак може самостійно знайти в підручнику відповідь.

### **X 1 (незадовільно) 1–34**

Студент зовсім не володіє необхідними знаннями, уміннями, навичками та науковими термінами з дисципліни, що вивчається, зовсім не здатний до самостійного вивчення дисципліни.

Підсумковий контроль з дисципліни здійснюється у вигляді заліку, що проводиться після закінчення семестру (закінчення курсу). Отримана кількість балів переводиться в національну шкалу відповідно до таблиці, наведеної нижче, та виставляється в екзаменаційну відомість.

Відповідність рейтингових балів і національної шкали оцінювання:

Оцінка за 100-бальною шкалою	Оцінка за національною шкалою
60–100	«зараховано»
1–34	«не зараховано»

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

### Основна

1. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды : [пер. с англ.] ; под ред., с предисл. и дополн. В. Г. Дебабова. – М.: Мир, 1987. – 422 с.
2. Герасименко В. Г. Биотехнология : учеб. пособие / В. Г. Герасименко. – К.: Вища школа, 1989. – 343 с.
3. Бекер М. Е. Биотехнология / М. Е. Бекер, Г. К. Лиепиньш, Е. П. Райпулис. – М.: Агропромиздат, 1990. – 334 с.
4. Клунова С. М. Биотехнология / С. М. Клунова и др. – М.: Академия, 2010. – 256 с.
5. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – Москва: Мир, 2002. – 488 с.
6. Пинаев Г.П. Клеточная биотехнология / Г. П. Пинаев, М. И. Блинова, Н. С. Николаенко, Г. Г. Полянская, Т. Н. Ефремова, Н. С. Шарлаимова, Н. А. Шубин. – СПб: Изд-во Политех-го ун-та, 2011. – 224 с.
7. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии : учебник / В. Н. Рыбчин; 2-е изд., перераб. и доп. – СПб: СПбГТУ, 2002. – 522 с.
8. Руденко С. С. Генетична інженерія: навч. посібник / С. С. Руденко. – Чернівці: Рута, 1997. – 182 с.
9. Ніколайчук С. І. Генетична інженерія / С. І. Ніколайчук, І. Ю. Горбатенко. – Ужгород, 1999. – 101 с.
10. Кучук Н. В. Генетическая инженерия высших растений / Н. В. Кучук. – Киев: Наук. думка, 1997. – 152 с.
11. Валиханова Г. Ж. Биотехнология растений / Г. Ж. Валиханова. – Алматы: Конжик, 1996. – 154 с.
12. Мельничук М. Д. Основи біотехнології рослин: підручник / [М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, Б. О. Левенко]. – К.: Вища шк., 2000. – 248 с.

13. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / В. А. Сидоров. – Киев: Наук. Думка, 1990. – 280 с.
14. Глеба Ю. Ю. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений / Ю. Ю. Глеба, К. М. Ситник. – Киев: Наук. думка, 1982. – 102 с.
15. Калинин Ф. Л. Культура клеток и тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, Л. П. Полищук. – Киев: Наук. думка, 1989. – 332 с.
16. Левенко Б. А. Трансгенные растения. Современное состояние. Проблемы. Перспективы / Б. А. Левенко. – Киев, 2000. – 305 с.
17. Лутова Л. А. Генетика развития растений / Л. А. Лутова, Н. А. Проворов, О. Н. Тиходеев и др. – СПб: Наука, 2000. – 359 с.
18. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений / Л. А. Лутова. – СПб: Изд-во С.-Петербур.ун-та, 2003. – 228 с.
19. Рудишин С. Д. Основи біотехнології рослин / С. Д. Рудишин. – Вінниця, 1998. – 224 с.
20. Вечернина Н. А. Биотехнология растений / Н. А. Вечернина. – Барнаул: АлтГУ, 2009. – 224 с.
21. Биотехнология растений: культура клеток / Под ред. Р. А. Диксон. – М.: ВО Агропромиздат, 1989. – 280 с.
22. Вечернина Н. А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений / Н. А. Вечернина. – Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2004. – 205 с.
23. Сельскохозяйственная биотехнология: векторные системы молекулярного клонирования / Под ред. В. И. Негрука ; пер. с англ. Г. И. Эйснер. – М.: Агропромиздат, 1991. – 534 с.
24. Генная инженерия растений: лабораторное руководство; пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера и др. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
25. Пузік В. К. Культура ізольованих органів, тканин і клітин в біотехнології рослин: навч. посіб. / В. К. Пузік. – Х.: ХДАУ, 1997. – 98 с.

26. Черепенко Е. И. Проблема репликации ДНК и генетические манипуляции с растениями / Е. И. Черепенко, А. П. Галкин. – К.: Наук. думка, 1987. – 160 с.

27. Албертс Брюс Молекулярная биология клетки : в 3. т. / Албертс Брюс, Брей Деннис, Льюис Джулиан, Рэфф Мартин, Робертс Кейт, Уотсон Джеймс Д. : пер. Т. Н. Власик. – 2. изд., перераб. и доп.; Т. 1. – М. : Мир, 1994. – 517 с.

28. Стрельчук С. І. Генетика з основами селекції: підручник / С. І. Стрельчук, С. В. Демідов, Г. Д. Бердишев, Д. М. Голда. – К.: Фітосоціоцентр, 2000. – 291 с.

29. Варфоломеев С. Д. Биотехнология: Кинетические основы микробиологических процессов / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калюжный. – М.: Высш. шк., 1990. – 296 с.

30. Бужієвська Т. І. Основи медичної генетики: навч. посіб / Т. І. Бужієвська. – К.: Здоров'я, 2001. – 136 с.

### **Додаткова**

31. Глазко В. И. Словарь терминов по прикладной генетике и ДНК технологиям / В. И. Глазко. – К.: КВЦ, 1999. – 342 с.

32. Глазко В. И. Русско-англо-украинский толковый словарь по прикладной генетике, ДНК-технологии и биоинформатике / В. И. Глазко, Г. В. Глазко. – К.: Нора-принт, 2000. – 464 с.

Методичні вказівки щодо лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Біоінженерія» для студентів денної форми навчання за напрямом 6.051401 – «Біотехнологія»

Укладач: к. т. н., ст.. викл. О. А. Сакун

Відповідальний за випуск доц. кафедри біотехнологія і здоров'я людини  
А. В. Пасенко

Підп. до др. \_\_\_\_\_ 2017. Формат 60x84 1/16. Папір тип. Друк ризографія.  
Ум. друк. арк. \_\_\_\_\_. Наклад \_\_\_\_\_ прим. Зам. № \_\_\_\_\_. Безкоштовно.

Видавничий відділ  
Кременчуцького національного університету  
імені Михайла Остроградського  
вул. Першотравнева 20, м. Кременчук, 39600