

Міністерство освіти і науки України  
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна  
Кафедра фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів

“ЗАТВЕРДЖУЮ”  
Проректор з науково-педагогічної роботи  
\_\_\_\_\_ А.В. Пантелеймонов

Робоча програма навчальної дисципліни

**Спецпрактикум «Молекулярно-біологічні методи дослідження  
фізіологічних процесів рослин та мікроорганізмів»**

(назва навчальної дисципліни)

рівень вищої освіти другий (магістерський)  
галузь знань 09 Біологія  
(шифр і назва)  
спеціальність 091 Біологія  
(шифр і назва)  
освітня програма Біологія  
(шифр і назва)  
спеціалізація \_\_\_\_\_  
(шифр і назва)  
вид дисципліни за вибором  
обов'язкова / за вибором  
факультет біологічний

2019 / 2020 навчальний рік

Програму рекомендовано до затвердження вченою радою факультету

19 червня 2019 року, протокол № 6

РОЗРОБНИКИ ПРОГРАМИ: Попов В.М., кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів

Програму схвалено на засіданні кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів  
Протокол від 14 червня 2019 року, № 21

В.о. завідувача кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів

\_\_\_\_\_ В.Ф. Тимошенко  
(підпис)

Програму погоджено науково-методичною комісією біологічного факультету  
Протокол від 18 червня 2019 року, № 11

Голова науково-методичної комісії біологічного факультету

\_\_\_\_\_ В.В. Мартиненко  
(підпис)

## ВСТУП

Програма навчальної дисципліни “Молекулярно-біологічні методи досліджень фізіологічних процесів рослин та мікроорганізмів” складена відповідно до освітньо-професійної програми підготовки

\_\_\_\_\_  
другий, магістерський

(назва рівня вищої освіти)

спеціальності 091 Біологія

спеціалізації \_\_\_\_\_

### 1. Опис навчальної дисципліни

#### 1.1. Мета викладання навчальної дисципліни.

Сформувати у студентів систему практичних навичок та умінь використовувати молекулярно-біологічні методи при вивченні фізіологічних процесів у рослин та мікроорганізмів.

#### 1.2. Основні завдання вивчення дисципліни.

Оволодіння студентами практичними навичками та вмінням працювати у молекулярно-біологічних лабораторіях, вмінням виділяти нуклеїнові кислоти і білки та працювати з ними, виготовляти реактиви для молекулярно-біологічних досліджень, працювати зі специфічним обладнанням, а також привити навички практичної орієнтації, необхідні для професійної діяльності в галузі біології.

#### 1.3. Кількість кредитів: 4.

#### 1.4. Загальна кількість годин: 120.

1.5. Характеристика навчальної дисципліни	
Нормативна / за вибором	
Денна форма навчання	Заочна форма навчання
Рік підготовки	
1-й	1-й
Семестр	
1-й	1-й
Лекції	
0 год.	0 год.
Практичні, семінарські заняття	
0 год.	0 год.
Лабораторні заняття	
64 год.	18 год.
Самостійна робота	
56 год.	102 год.
Індивідуальні завдання	
10 год. (за рахунок самостійної роботи)	

#### 1.6. Заплановані результати навчання.

Знати принципи таких молекулярно-біологічних методів як ПЛР, блотинг, гібридизація тощо, техніку роботи з приладами, які застосовують у молекулярній біології (ампліфікатори, спектрофотометри, ламінар-бокси, секвенатори тощо); теоретичні основи застосування молекулярно-біологічних методів у біології рослин та прокариот; методи, які використовуються для дослідження ДНК і РНК; методи, які використовують для дослідження білків; методи, які використовуються у генно-інженерних дослідженнях та біотехнології; методи аналізу експресії генів у рослин та прокариот. Вміти самостійно

проводити виділення ДНК та РНК з рослинного матеріалу та бактерій, визначати їх концентрацію та якість; самостійно проводити ЗТ-ПЛР та інші типи ПЛР; самостійно проводити фракційне виділення білків з рослинного матеріалу та культур прокариот та їх розділення методами електрофорезу, а також розділяти мономери клітинних стінок бактерій методами тонко-шарової хроматографії.

## 2. Тематичний план навчальної дисципліни

### Розділ 1. Методи дослідження ДНК та РНК.

**Тема 1. Організація лабораторії молекулярно-біологічного профілю.** Загальні принципи організації роботи з нуклеїновими кислотами (НК) у ПЛР-лабораторії. Вимоги до приміщень в ПЛР-лабораторії. Вимоги до лабораторного обладнання в ПЛР-лабораторії. Документація ПЛР-лабораторії. Вимоги до обробки приміщень і знезараження матеріалу в ПЛР-лабораторії. Порядок обробки спецодягу при роботі в приміщеннях ПЛР-лабораторії. Правила роботи в боксах біологічної безпеки при виділенні НК. Профілактика контамінації та порядок дій при виникненні контамінації ПЛР-лабораторії НК. Контроль якості досліджень і оцінка роботи ПЛР-лабораторії.

**Тема 2. Методи виділення нуклеїнових кислот для проведення молекулярно-біологічних аналізів.** Техніка приготування розчинів та реагентів для молекулярно-біологічних досліджень. Підходи до виділення ДНК та РНК з рослинного або бактеріального матеріалу. Особливості виділення ДНК та РНК з різного біологічного матеріалу. Рідиннофазні та твердофазні методи виділення НК та їх особливості. Методи очистки препаратів ДНК від РНК та білків. Оцінка якості препаратів ДНК та РНК методом спектрофотометрії при довжинах хвиль 230, 260, 280 нм.

**Тема 3. Полімеразна ланцюгова реакція та аналіз експресії генів.** Загальна схема ПЛР. Критичні компоненти реакції та параметри ПЛР. Конструювання праймерів. Проблеми, які виникають при постановці ПЛР. Методи ПЛР: множинна, гніздова, ПЛР із гарячим стартом, ПЛР у реальному часі. Поняття про ДНК маркери. Визначення мікроорганізмів II групи патогенності в біологічному матеріалі методом ПЛР. Детекція результатів ПЛР методом електрофорезу в агарозному гелі та принципи обробки результатів. Визначення наявності регуляторних елементів: промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти та термінатора NOS *Agrobacterium tumefaciens* в рослинному матеріалі методом стандартної ПЛР. Визначення рівня представленості транскриптів методом ПЛР у реальному часі та нормування даних.

### Розділ 2. Методи дослідження білків

**Тема 4. Техніка приготування гелей та електрофорез білків.** Поліакріламідний гель (ПААГ): вихідні хімічні реактиви. Процес полімеризації ПААГ, вибір концентрації мономерів. Міграція білків у гелі. Напряга електричного поля. Вибір буферу робочого геля. Загрузка гелю та підготовка прибору для вертикального електрофорезу. Розділення білків за розміром з використанням ДДС-Na.

**Тема 5. Аналіз білкових маркерів методом електрофорезу.** Методика фракційного виділення білків рослин за Осборном. Отримання фракцій альбумінів (водорозчинні білки), глобулінів (солерозчинні білки), проламінів (спирторозчинні білки), глютелінів (лугорозчинні білки). Використання поліморфізму білків для ідентифікації сортів сільськогосподарських культур. Аналіз запасних спирторозчинних білків-гордеїнів колекції сортів ячменю.

## 3. Структура навчальної дисципліни

Назви розділів і тем	Кількість годин											
	Денна форма						Заочна форма					
	Усього	у тому числі					Усього	у тому числі				
		лек	пр	лаб	інд	ср		л	пр	лаб	інд	ср
<b>Розділ 1. Методи дослідження ДНК та РНК</b>												
Тема 1. Організація лабораторії молеку-	10	0	0	4	0	6	14	0	0	2	0	12

лярно-біологічного профілю												
Тема 2. Методи виділення нуклеїнових кислот для проведення молекулярно-біологічних аналізів	24	0	0	16	0	8	18	0	0	4	0	14
Тема 3. Полімеразна ланцюгова реакція та аналіз експресії генів	36	0	0	24	0	12	30	0	0	6	0	24
<b>Разом за розділом</b>	<b>70</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>44</b>	<b>0</b>	<b>26</b>	<b>62</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>50</b>
<b>Розділ 2. Методи дослідження білків</b>												
Тема 4. Техніка приготування гелей та електрофорез білків	20	0	0	10	0	10	24	0	0	3	0	21
Тема 5. Аналіз білкових маркерів методом електрофорезу	20	0	0	10	0	10	24	0	0	3	0	21
<b>Разом за розділом</b>	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>48</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>42</b>
<b>Усього годин</b>	<b>120</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>64</b>	<b>10</b>	<b>46</b>	<b>120</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>18</b>	<b>10</b>	<b>92</b>

#### 4. Теми семінарських (практичних, лабораторних) занять

##### Теми лабораторних занять

№ з/п	Назва теми заняття	Кількість годин	
		денна форма	заочна форма
1	Типи молекулярно-біологічних лабораторій. Улаштування та обладнання лабораторій. Інструктаж з ТБ та БЖД.	4	
2	Виділення ДНК з рослинного матеріалу рідиннофазним методом (фенол-хлороформна екстракція). Виділення ДНК з рослинного матеріалу твердофазним методом на склі.	10	4
3	Виділення РНК з рослинного матеріалу. Виділення РНК з бактерій.	4	
4	Вимірювання концентрації ДНК та РНК спектрофотометрично при A230/260/280.	2	2
5	Дизайн праймерів	4	1
6	Проведення множинної ПЛР	10	2
7	Розділення препаратів ДНК/РНК методом горизонтального електрофорезу в агарозі. Візуалізація результатів електрофорезу.	4	2
8	Проведення зворотної транскрипції для отримання кДНК	4	2
9	Проведення Real-Time PCR для досліджуваного гена	6	2
10	Техніка приготування поліакріламідних гелей.	6	1
11	Розділення білків за розміром та зарядом.	10	2
<b>Разом</b>		<b>64</b>	<b>18</b>

#### 5. Завдання для самостійної роботи

№ з/п	Назва теми	Кількість годин	
		денна форма	заочна форма
1	Опрацювання теоретичного матеріалу для виконання лабораторних робіт	10	30
2	Підготовка до виконання лабораторних робіт	16	40
3	Оформлення результатів та протоколів лабораторних робіт	10	10
4	Підготовка до захисту лабораторних робіт та складання заліку	10	12
5	Виконання індивідуального науково-дослідного завдання	10	10
<b>Разом</b>		<b>56</b>	<b>102</b>

## 6. Індивідуальні завдання

№ з/п	Теми індивідуальних завдань
<b>Теми рефератів для денної форми навчання</b>	
1	Сучасні технології секвенування геномів прокариот та еукаріот (next generation sequence, NGS).
2	Емульсійна ПЛР.
3	TILLING технологія.
4	KASP-технологія.
5	Молекулярно-генетичні системи контролю розмноження рослин.
6	Типи ДНК-маркерів.
7	Технології редагування ДНК.
8	Дослідження мікробних угруповань сучасними методами секвенування.
<b>Розрахункові задачі для заочної форми навчання</b>	
1	Обчислення складу хімічних реактивів для ПЛР.
2	Розрахунок концентрації нуклеїнових кислот за оптичною щільністю спектрофотометричним вимірюванням.
3	Розрахунок параметрів звичайної ПЛР.
4	Визначення вмісту чужорідної ДНК відносно геномної ДНК рослин.
5	Розрахунок частот алелей для кодомінантних ДНК маркерів.
6	Обчислення основних показників генетичного різноманіття.
7	Визначення показників подібності та генетичних дистанцій.
8	Групування об'єктів неієрархічним кластерним аналізом.
9	Групування об'єктів ієрархічним кластерним аналізом.

## 7. Методи контролю

Посібники з відповідних розділів курсу містять завдання для самопідготовки і самоконтролю, які студенти можуть здійснювати, використовуючи підручники під час вирішення завдань.

**Поточний контроль.** Програма передбачає наступні форми поточного контролю:

- **усне опитування:** здійснюється впродовж лабораторних занять з метою контролю засвоєння теоретичних положень щодо теми лабораторного дослідження, яке виконується;

- **тестування:** проводиться у формі експрес-контролю за тестовими завданнями, слугує для контролю за самостійною роботою студентів;

- **захист лабораторної роботи:** призначена для контролю та формування здатності студентів узагальнювати отримані практичні результати та пояснювати їх на основі набутих знань.

**Підсумковий контроль:** залікова робота у письмовій формі.

## 8. Схема нарахування балів

Поточний контроль, самостійна робота, індивідуальні завдання					Індивідуальне завдання	Разом	Залік	Сума
Розділ 1			Розділ 2					
T1	T2	T3	T1	T2				
10	10	10	10	10	10	60	40	100

T1, T2 ... – теми розділів.

## Шкала оцінювання

Сума балів за всі види навчальної діяльності протягом семестру	Оцінка
	для дворівневої шкали оцінювання
90-100	зараховано
70-89	
50-69	
1-49	не зараховано

## 9. Рекомендована література

### Основна література

1. *Cota-Sanchez J.H. et al.* Ready-to-use DNA-extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissues // *Plant Mol Biol Reporter*, 2006. – Vol. 24. – P.161–167
2. *Doyle J.J. and Doyle, J.L.* A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phyt. Bull.* – 1987. - Vol. 19. - P.11–15.
3. *Криницьна А.А., Сизова Т.В., Заика М.А., А.С. Сперанская, Сухоруков А.П.* Простой и быстрый метод выделения ДНК из гербарных образцов долгого срока хранения // *Биохимия*, 2005.- Т.80, №11. – С.1698-1706.
4. *Вартенян А.Б.* Полимеразная цепная реакция // *Молекулярная биология*, 1991. – Т.25, №4. – С.926-936.
5. *Патрушев Л.И.* Искусственные генетические системы Т.1 Генная и белковая инженерия / М.: Наука, 2004. – 526 с.
6. *Остерман Л.А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / М.:Наука, 1981. – 288 с.
7. *Žilić S., Barać M. et al.* Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes // *Int. J. Mol. Sci.*, 2011. – Vol. 12. – P.5878–5894: doi:10.3390/ijms12095878
8. *Schmittgen T.D. et al.* Quantitative reverse transcription – polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods // *Analytical Biochemistry*, 2000. – Vol. 285. – P.194–204.

### 10. Посилання на інформаційні ресурси в Інтернеті, відео-лекції, інше методичне забезпечення

1. <https://www.youtube.com/watch?v=nWUJlnri9D4> виділення ДНК
2. <https://www.youtube.com/watch?v=MgNicWbANkA> виділення РНК
3. <https://www.youtube.com/watch?v=xxzImjtRM4c> робота з ДНК
4. <https://www.youtube.com/watch?v=qmACKSvFZpM> проведення ЗТ-ПЛР
5. <https://www.youtube.com/watch?v=kvQWKcMdyS4> ПЛР у реальному часі.
6. Протоколи лабораторних занять. Рекомендована література. Електронні та паперові посібники з методів молекулярно-біологічних досліджень фізіологічних процесів рослин.

**Критерії оцінювання лабораторних робіт з курсу  
«Молекулярно-біологічні методи дослідження фізіологічних процесів рослин  
та мікроорганізмів»**

За виконання лабораторної роботи студенту нараховується максимальний бал за лабораторну роботу за умови, якщо студент на початку заняття надав Протокол (схему) лабораторної роботи з усіма вірно виконаними розрахунками для приготування необхідних реактивів, протягом заняття виконав повністю експериментальну частину роботи та у кінці заняття надав записані первинні результати роботи.

Критерії нарахування балів за оформлення лабораторної роботи:

- 20% від максимального балу за оформлення лабораторної роботи студент отримує за пункт «Результати», якщо вони оформлені відповідно до завдання, зроблені вірно всі розрахунки, рисунки та заповнені таблиці.
- 80% від максимального балу за оформлення лабораторної роботи студент отримує за пункт «Висновки» (відповіді на запитання, схеми, таблиці) у випадку, якщо надана повна, у логічній послідовності та конкретна відповідь на запитання, вірно виконана схема експерименту.

Розділ	Тема лабораторної роботи	Макс. бал
1. Організація лабораторії молекулярно-біологічного профілю	1. Типи молекулярно-біологічних лабораторій. Улаштування та обладнання лабораторій	5
<b>Усього за розділом 1:</b>		<b>5</b>
2. Методи виділення нуклеїнових кислот для проведення молекулярно-біологічних аналізів	2. Виділення ДНК з рослинного матеріалу рідиннофазним методом (фенол-хлороформна екстракція). Виділення ДНК з рослинного матеріалу твердофазним методом на склі.	10
	3. Виділення РНК з рослинного матеріалу. Виділення РНК з бактерій.	5
	4. Вимірювання концентрації ДНК та РНК спектрофотометрично при A230/260/280.	5
<b>Усього за розділом 2:</b>		<b>20</b>
3. Полімеразна ланцюгова реакція та аналіз експресії генів	5. Дизайн праймерів	5
	6. Проведення множинної ПЛР	10
	7. Проведення зворотної транскрипції для отримання кДНК	5
	8. Проведення Real-Time PCR для досліджуваного гена	5
<b>Усього за розділом 3:</b>		<b>25</b>
4. Техніка приготування гелів та електрофорез білків	9. Розділення препаратів ДНК/РНК методом горизонтального електрофорезу в агарозі. Візуалізація результатів електрофорезу.	5
	10. Техніка приготування поліакріламідних гелів.	5
<b>Усього за розділом 4:</b>		<b>10</b>
5. Аналіз білкових маркерів методом електрофорезу	11. Розділення білків за розміром та зарядом.	10
<b>Усього за розділом 5:</b>		<b>10</b>
<b>Підсумковий контроль: залік</b>		<b>30</b>
		<b>Усього: 100</b>