

Міністерство освіти і науки України

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Кафедра фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Перший проректор

“_____” _____ 2016 р.

Робоча програма навчальної дисципліни

**Молекулярно-біологічні методи дослідження фізіологічних процесів
рослин та мікроорганізмів**

(назва навчальної дисципліни)

спеціальність (напрямок) _____ Біологія _____

спеціалізація _____ Мікробіологія і вірусологія / Фізіологія та біохімія рослин _____

факультет _____ Біологічний _____

2016 / 2017 навчальний рік

Програму рекомендовано до затвердження вченою радою факультету (інституту, центру)

“ 29 ” серпня 2016 року, протокол № 8

РОЗРОБНИКИ ПРОГРАМИ: старший викладач кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Самойлов А.М.

Програму схвалено на засіданні кафедри
фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів

Протокол від “ 29 ” серпня 2016 року № 1

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

_____ проф., д.б.н. Жмурко В.В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Програму погоджено методичною комісією

біологічного факультету

назва факультету, для здобувачів вищої освіти якого викладається навчальна дисципліна

Протокол від “ 29 ” серпня 2016 року № 1

Голова методичної комісії біологічного факультету

_____ проф., д.б.н. Догадіна Т.В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

ВСТУП

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

другий (магістерський)
(назва рівня вищої освіти, освітньо-кваліфікаційного рівня)

спеціальності (напряму) Біологія

спеціалізації Мікробіологія і вірусологія / Фізіологія та біохімія рослин

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, вміннями виділяти нуклеїнові кислоти і білки та працювати з ними, виготовляти реагенти 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 / <u>за вибором</u>	
Денна форма навчання	Заочна (дистанційна) форма навчання
Рік підготовки	
1-й	1-й
Семестр	
1-й	1-й
Лекції	
- год.	- год.
Практичні, семінарські заняття	
-год.	- год.
Лабораторні заняття	
64 год.	20 год.
Самостійна робота	
56 год.	100 год.
Індивідуальні завдання	
- год.	

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. Методи виділення, очистки та аналізу ДНК.

Техніка приготування розчинів та реагентів для молекулярно-біологічних досліджень. Підходи до виділення ДНК з рослинного чи бактеріального матеріалу. Особливості виділення ДНК з біологічного матеріалу, що містить клітинні стінки з целюлози, хітину чи муреїну. Методи очистки препаратів ДНК від РНК та білків. Принципи ферментативних, сорбційних та хімічних методів виділення ДНК. Особливості методик заснованих на застосуванні ЦТАБ. Оцінка якості препаратів ДНК методом спектрофотометрії при довжинах хвиль 230, 260, 280 нм.

Тема 2. Методи виділення, очистки та аналізу РНК.

Особливості проведення лабораторних досліджень при виділенні та маніпуляціях з РНК. Вимоги техніки безпеки при роботі з РНК. Принципи та підходи до виділення РНК з рослинного та бактеріального матеріалу. Методи ферментативного виділення РНК, Triazol-метод виділення, сорбційні методи виділення препаратів РНК. Інгібітори РНКаз та їх використання. Особливості хімічних методик виділення РНК з використанням ЦТАБ та LiCl. Оцінка якості препаратів РНК методом спектрофотометрії при довжинах хвиль 230, 260, 280 нм.

Тема 3. Аналіз експресії генів рослин та бактерій методом ПЛР.

Типи праймерів для зворотнотранскриптно-ПЛР тотальної рослинної чи бактеріальної РНК, тільки мРНК чи специфічних РНК. Вирівнювання вихідних концентрацій РНК. Проведення зворотної транскрипції тотальних рослинних мРНК з оліго-дТ-праймерами з отриманням кДНК. Визначення специфічних кДНК зі специфічними праймерами до досліджуваного гена, експресію якого вимірюють. Проведення електрофоретичної детекції продуктів ПЛР для оцінки експресії гену методом горизонтального електрофорезу в агарозі. Принципи та методика ПЛР у реальному часі. Способи побудови калібровок та визначення концентрації кДНК і мРНК у зразках – кількісна ПЛР.

Розділ 2. Методи дослідження рослинних білкових маркерів та структур клітини прокариот.

Тема 4. Препаративне фракційне виділення білків рослин та ЛПЦ бактерій.

Класифікація білків за фізико-хімічними властивостями. Особливості окремих фракцій рослинних білків. Методика фракційного виділення білків із зерна пшениці за Осборном. Отримання фракцій альбумінів, глобулінів (водо- та солерозчинні білки), спирторозчинних білків (гліадинів), лугорозчинних (глютелінів та проламінів) та нерозчинної глютенної

фракції. Вимірювання концентрацій білків у фракціях методом Лоурі та за Бредфордом. Розділення легкорозчинних білків фракцій альбумінів і глобулінів методом SDS-PAAG за Лемлі. Виділення та розділення ЛПЦ грам негативних бактерій методом електрофорезу.

Тема 5. Аналіз білкових маркерів методами елетрофорезу.

Аналіз фракції гліадинів – спирторозчинних білків, які використовують як білкові маркери у селекційному процесі. Поняття про білкові маркери. Гліадини як білкові маркери. Методика нативного кислого електрофорезу гліадинів за Новосельською. Аналіз гліадинового профілю сорту Миронівська 808 та Одеська 67, а також ізогенних ліній, створених у генофоні сорту Миронівська 808. Фракції гліадинів та їх аналіз.

3. Структура навчальної дисципліни

Назви розділів і тем	Кількість годин									
	Денна форма					Заочна форма				
	усього	л.	сем.	лаб.	с/р	усього	л.	сем.	лаб.	с/р
Розділ 1. Методи дослідження рослинних та бактеріальних ДНК та РНК.										
Тема 1. Методи виділення, очистки та аналізу ДНК.	19	0	0	9	10	19	0	0	3	16
Тема 2. Методи виділення, очистки та аналізу РНК.	16	0	0	6	10	16	0	0	2	14
Тема 3. Аналіз експресії генів рослин та бактерій методом ПЛР.	31	0	0	15	16	31	0	0	5	26
Разом за розділом	66	0	0	30	36	66	0	0	10	56
Розділ 2. Методи дослідження рослинних білкових маркерів та структур клітини прокариот.										
Тема 4. Препаративне фракційне виділення білків рослин та ЛПЦ бактерій.	26	0	0	16	10	26	0	0	5	21
Тема 5. Аналіз білкових маркерів методами елетрофорезу.	28	0	0	18	10	28	0	0	5	23
Разом за розділом	54	0	0	34	20	54	0	0	10	44
Усього годин	120	0	0	64	56	120	0	0	20	100

4. Теми семінарських (практичних, лабораторних) занять

Теми лабораторних занять

№ з/п	Назва теми заняття	Кількість годин	
		Денна ф.	Заочна ф.
1	Типи молекулярно-біологічних лабораторій. Улаштування та обладнання лабораторій. Інструктаж з ТБ та БЖД.	2	5
2	Виділення ДНК з рослинного матеріалу /за Івановою Н. з модиф./ Виділення ДНК з бактерій ферментативним методом СТАВ з лізоцимом / Виділення тотальних нуклеїнових кислот бактерій експрес-методом з SDS.	7	
3	Виділення РНК з рослинного матеріалу /за Гау та Ліу у модиф./ Виділення РНК з бактерій.	5	

4	Вимірювання концентрації ДНК та РНК спектрофотометрично при А230/260/280.	3	2
5	Визначення %ГЦ-пар у рослинній та бактеріальній ДНК.	3	
6	Розділення препаратів ДНК/РНК методом горизонтального електрофорезу у агарозі. Візуалізація результатів електрофорезу.	6	2
7	Проведення зворотної транскрипції для отримання кДНК	4	4
8	Проведення Real-Time PCR для досліджуваного гену	6	
9	Препаративне виділення та фракціонування білків за Осборном в модифікації Жиліча зі співавт. / на прикладі гліадинів /	10	3
10	Виділення ЛПЦ та його електрофоретичне визначення. Виділення препарату клітинних стінок бактерій та хроматографічне (ТШХ) визначення типу амінокислот у КС.	8	2
11	Розділення білків за допомогою нативного кислого електрофорезу за Новосельською в модифікації Дукіча зі співавт.	10	2
Разом:		64	20

5. Завдання для самостійної роботи

№ з/п	Назва теми	Кількість годин		Форма контролю
		ден.від.	заоч.від.	
1	Опрацювання теоретичного матеріалу для виконання лабораторних робіт.	14	30	залік
2	Підготовка до виконання лабораторних робіт	20	50	Ведення лабораторного журналу
3	Оформлення результатів та протоколів лабораторних робіт	9	9	Ведення лабораторного журналу
4	Підготовка до захисту лабораторних робіт та складання заліку	11	11	залік
	Разом	54	100	

6. Індивідуальні завдання

Програмою не передбачено.

7. Методи контролю

Самоконтроль. 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.

8. Схема нарахування балів

Поточний контроль, самостійна робота, індивідуальні завдання						Контрольна робота (за навчальним планом)	Разом	Екзамен (залікова робота)	Сума
Розділ 1			Розділ 2						
T1	T2	T3	T1	T2					
10	20	10	15	15	-	70	30	100	

T1, T2 ... – теми розділів.

Шкала оцінювання

Сума балів за всі види навчальної діяльності протягом семестру	Оцінка	
	для екзамену	для заліку
90 – 100	відмінно	зараховано
70-89	добре	
50-69	задовільно	
1-49	незадовільно	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. [Ivanova N.V. et al. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // Molecular Ecology Notes, 2006. – Vol. 6. – P.998–1002.](#)
3. [Song H., Liu Y. et al. An improved method for total RNA isolation from recalcitrant loquat \(*Eriobotrya japonica* Lindl.\) buds // Pak. J. Bot., 2011. – Vol. 43, N 2. – P.1163–1171](#)
4. [Сомма М., Кверчи М. Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов: Сессия 5. Электрофорез в агарозном геле / Всемирная организация здравоохранения. Европейское бюро.](#)
5. [Testing gene expression by reverse transcriptase PCR \(rt-PCR\). Overview](#)
6. [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](#)
7. [Đukić N., Matić G. et al. Biochemical analysis of gliadins of wheat *Triticum durum* // Kragujevac J. Sci., 2005. – Vol. 27. – P.131–138](#)
8. [Новосельская А.Ю., Метакровский Е.В., Созинов А.А. Изучение полиморфизма глиадинов некоторых пшениц методами одномерного и двухмерного электрофореза // Цитология и генетика, 1983. – Т.17, № 5. – С.49–45](#)
9. [Tenea G.N. et al. Reference genes for gene expression studies in wheat flag leaves grown under different farming conditions // BMC Research Notes, 2011. – Vol. 4. – P.373: doi:10.1186/1756-0500-4-373](#)
10. [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

Протоколи лабораторних занять. Рекомендована література. Електронні та паперові посібники з методів молекулярно-біологічних досліджень фізіологічних процесів рослин. Експериментальні статті періодичних видань.

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