

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ВЕТЕРИНАРНОЙ ГЕНЕТИКИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методические указания к практическим занятиям

\

Новосибирск 2022

УДК 5708+ 616.7
ББК 4Ф
С28

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии

Составитель: Себежко О.И., к.б.н., доц.

Рецензент: Зайко О.А., канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры хирургии и внутренних незаразных болезней НГАУ

Современные методы исследования: метод. указания к практическим занятиям / сост. Себежко О.И.; Новосиб. гос.аграр. ун-т. Биологотехнолог. фак-т. – Новосибирск, 2022. –102 с.

Методические указания предназначены для студентов Биологотехнологического факультета, обучающихся по направлению подготовки 36.04.02 «Зоотехния».

Изложены основные разделы курса «Современные методы исследования», которые студенты должны изучать на практических занятиях, лабораторные работы. Приведены глоссарий, библиографический список.

Методические указания утверждены и рекомендованы к изданию учебно-методическим советом биолого-технологического факультета (протокол № 7 от 29.09 2022 г.).

©Новосибирский государственный аграрный университет, 2022

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цели и задачи дисциплины.

Дисциплина "Современные методы исследования" (Б1.В.ДВ.3.1) относится к дисциплинам по выбору вариативной части при подготовке студентов по специальности 36.04.02 «Зоотехния», программа «Разведение, генетика и селекция животных».

Дисциплина "Современные методы исследования" предназначена дать магистрам теоретические, методологические и практические знания, формирующие их представление о современных методах исследования применяемых в биологии.

В соответствии с назначением основной целью дисциплины является освоение методологии современных методов и технологий исследований в животноводстве

Исходя из цели, в процессе изучения дисциплины решаются следующие задачи:

- познание непосредственной связи биологических процессов, протекающих в живых организмах с современными методами их исследования
- обеспечить выполнение обучающимися лабораторного практикума, иллюстрирующего сущность современных методов исследования ;
- привить обучающимся практические навыки в подготовке, организации, выполнении лабораторного практикума по современным методам исследования, включая использование современных приборов и оборудования; в том числе привить практические навыки, значимые для будущей специальности;
- привить обучающимся навыки грамотного и рационального оформления выполненных экспериментальных работ в лабораторном практикуме, обработки результатов эксперимента; навыки работы с учебной, монографической, справочной и химической литературой.
- получение практических навыков по применению адекватных методов исследований при проведении исследовательской работы и для решения задач в практическом животноводстве.

В результате изучения дисциплины студент будет:

- **знать** научные положения, лежащие в основе методов исследования; возможности использования современных методов исследования в практической деятельности для решения проблем зоотехнии; принципы и механизмы основных методов исследования, современное состояние научных исследований, являющихся основой учебной дисциплины; основные сферы применения полученных знаний;

□ **уметь** - применять основные методы исследований при наследовании нормальных и патологических признаков животных; □ планировать научные исследования, выбирать методы сбора данных и их анализа, интерпретировать полученные результаты применительно к конкретной ситуации и использовать их в практической деятельности

- **владеть** выделять, очищать, разделять биоорганические соединения и определять их биологическую активность; получать сыворотку и плазму крови; выделять из клеток нуклеопротеиды или нуклеиновые кислоты, исследовать их состав, проводить разделение методом электрофореза; проводить ПЦР - реакцию; проводить обработку результатов эксперимента и оценивать их в сравнении с литературными данными; интерпретировать результаты молекулярных исследований для оценки состояния обмена веществ и комплексной диагностики заболеваний животных; использовать теоретические знания и практические навыки, полученные при изучении дисциплины «Современные методы исследования» для решения соответствующих задач в области зоотехнии и биологии.

Программа дисциплины “Современные методы исследования” предназначена для очной формы обучения подготовки магистрантов по специальности 36.04.02 «Зоотехния», программа «Разведение, генетика и селекция животных». Общая трудоёмкость дисциплины составляет 5 зачётных единиц (180 ч). Дисциплина относится к дисциплинам по выбору вариативной части.

В процессе освоения дисциплины используются следующие образовательные технологии, способы и методы формирования компетенций: лекция-презентация, активизация творческой деятельности, деловая игра, интерактивные формы обучения (коллективные методы), выполнение индивидуальных заданий.

Контроль знаний, умений и навыков студентов осуществляется в следующих формах. Входящий контроль проводится с целью установления остаточных знаний по базовым дисциплинам в виде тестирования на первом практическом занятии.

Текущая оценка знаний осуществляется в виде тестов и написания контрольной работы.

Промежуточный контроль остаточных знаний по дисциплине “Современные методы исследования” – зачёт с оценкой.

Раздел 1. Основные группы объективных методов исследования организма.

Тема 1.1. Основные группы объективных методов исследования организма.

Выделяют 3 основных группы объективных методов исследования организма :

1. Структурная диагностика — методы, выявляющие изменения в строении органов и тканей (рентгенологические, ультразвуковые исследования, тепловидение, эндоскопия — гастроскопия, бронхоскопия, колоноскопия и т.д.).
2. Функциональная диагностика — методы изучения функционирования органов и систем по их электрическим проявлениям (электрокардиография, электроэнцефалография, электромиография и др.), звуковым (фонокардиография), механическим (сфигмография) и другим проявлениям.
3. Лабораторная диагностика — методы выявления изменений клеточного и химического состава биожидкостей и других биоматериалов.

Лабораторные методы состоят в исследовании химических и физических свойств биологических жидкостей и тканей, проб окружающей среды (смывы с поверхностей, пробы воды, почвы, воздуха и др.). Кроме того, к лабораторным методам относятся исследование и идентификация микроорганизмов (бактериология и вирусология), с целью выявления патогенных и условно-патогенных для человека и животных микроорганизмов и разработки методов специфической профилактики и лечения инфекционных болезней. В микробиологии широко применяют микроскопические методы исследования, методы культивирования микроорганизмов, генетической инженерии, хроматографии, масс-спектрометрии, изотопных индикаторов, электрофореза, цитологические, иммунохимические, биохимические и другие. Инструментальные методы диагностики могут быть, как инвазивными, так и неинвазивными. Инвазивные методы – это методы, основанные на проникновении каких-либо датчиков или агентов в организм обследуемого. Например, введение контрастных веществ в кровь или различные полости организма, использование зондов и датчиков, вводимых в организм. К этим методам относятся ангиография, гастрофиброскопия, пневмоэнцефалография, радиационные методы и др. Неинвазивные методы – методы не связанные с проникновением в организм. К ним относятся рентгеновские, электрические, ультразвуковые, оптические, тепловидение. Вопросы по теме:

Вопросы по теме:

1. Классификация основных методов исследований.
2. Методы, выявляющие изменения в строении органов и тканей: рентгенологические, ультразвуковые исследования.

- 3.Тепловидение.
- 4.Эндоскопия, бронхоскопия.
- 5.Методы изучения функционирования органов и систем по их электрическим проявлениям: электрокардиография.
- 6.Электроэнцефалография.
- 7.Электромиография.
8. Методы изучения функционирования органов и систем по их звуковым проявлениям: фонокардиография
9. Методы изучения функционирования органов и систем по их механическим проявлениям: сфигмография.
10. Методы выявления изменений клеточного и химического состава биожидкостей и других биоматериалов.

Тема 1.2. Физико-химические методы анализа

Физико-химические методы анализа, основаны на зависимости физических свойств вещества от его природы, причем аналитический сигнал представляет собой величину физического свойства, функционально связанную с концентрацией или массой определяемого компонента. Физико-химические методы анализа могут включать химические превращения определяемого соединения, растворение образца, концентрирование анализируемого компонента, маскирование мешающих веществ и других. В отличие от «классических» химических методов анализа, где аналитическим сигналом служит масса вещества или его объем, в физико-химические методы анализа в качестве аналитического сигнала используют интенсивность излучения, силу тока, электропроводность, разность потенциалов и др.

Важное практическое значение имеют методы, основанные на исследовании испускания и поглощения электромагнитного излучения в различных областях спектра. К ним относится спектроскопия (например, люминесцентный анализ, спектральный анализ, нефелометрия и турбидиметрия и другие). К важным физикохимическим методам анализа принадлежат электрохимические методы, использующие измерение электрических свойств вещества (

Почти во всех физико-химических методов анализа применяют два основных приема: методы прямых измерений и титрования. В прямых методах используют зависимость аналитического сигнала от природы анализируемого вещества и его концентрации. Зависимость сигнала от природы вещества - основа качественного анализа (потенциал полуволны в полярографии и т.д.). В некоторых методах связь аналитического сигнала с природой вещества установлена строго

теоретически. Например, спектр атома водорода может быть рассчитан по теоретически выведенным формулам. В количественном анализе используют зависимость интенсивности сигнала от концентрации вещества. Чаще всего она имеет вид $I = a + bc$ (уравнение связи), где I - интенсивность сигнала (сила диффузионного тока в полярографии, оптическая плотность в спектрофотометрии и т. д.), c - концентрация, a и b - постоянные, причем во многих случаях $a = 0$ (спектрофотометрия, полярография и др.). В ряде физико-химических методов анализа уравнение связи установлено теоретически, например закон Бугера-Ламберта-Бера, уравнение Ильковича.

Численные значения констант в уравнении связи определяют экспериментально с помощью стандартных образцов, стандартных растворов и т.д. Только в кулонометрии, основанной на законе Фарадея, не требуется определение констант.

Наибольшее распространение в практике получили следующие методы определения констант уравнения связи или, что то же самое, методы количеств, анализа с помощью физико-химических измерений:

1) Метод градуировочного графика. Измеряют интенсивность аналитического сигнала у нескольких стандартных образцов или стандартных растворов и строят градуировочный график в координатах $I = f(c)$ или $I = f(\lg c)$, где c - концентрация компонента в стандартном растворе или стандартном образце. В тех же условиях измеряют интенсивность сигнала у анализируемой пробы и по градуировочному графику находят концентрацию.

2) Метод молярного свойства применяют в тех случаях, когда уравнение связи $I = bc$ соблюдается достаточно строго. Измеряют аналитический сигнал у нескольких стандартных образцов или растворов и рассчитывают $b = I_{\text{ст}} / c_{\text{ст}}$; если $c_{\text{ст}}$ измеряется в моль/л, то b молярное свойство. В тех же условиях измеряют интенсивность сигнала у анализируемой пробы I_x и по соотношению $c_x = I_x / b$ или $c_x = c_{\text{ст}} I_x / I_{\text{ст}}$ рассчитывают концентрацию.

3) Метод добавок. Измеряют интенсивность аналитического сигнала пробы I_x , а затем интенсивность сигнала пробы с известной добавкой стандартного раствора $I_{x+\text{ст}}$. Концентрацию вещества в пробе рассчитывают по соотношению $c_x = c_{\text{ст}} I_x / (I_{x+\text{ст}} - I_x)$.

Методы титрования. Измеряют интенсивность аналитического сигнала I в зависимости от объема V добавленного титранта. По кривой титрования $I = f(V)$ находят точку эквивалентности и рассчитывают результат по обычным формулам титриметрического анализа.

Физико-химические методы анализа часто используют при определении низких содержаний (порядка $10^{-3}\%$ и менее), где классические химические методы анализа обычно неприменимы. В области средних и высоких концентраций химические и

физикохимические методы анализа успешно конкурируют между собой, взаимно дополняя друг друга. Физико-химические методы анализа развиваются в направлении поиска новых химических аналитических свойств вещества, увеличения точности анализа, конструирования новых прецизионных аналитических приборов, совершенствования существующих методик и автоматизации анализа. Интенсивно развивается в последнее время проточно-инжекционный анализ - один из наиболее универсальных вариантов автоматизированного анализа, основанный на дискретном введении микрообъемов анализируемого раствора в поток жидкого носителя с реагентом и последующего детектирования смеси тем или иным физико-химическим методом.

Деление аналитических методов на физические, химические и физико-химические весьма условно. Часто к физико-химическим методам анализа относят, например, ядерно-физические методы. В последнее время наметилась тенденция делить методы анализа на химические, физические и биологические - вовсе без физикохимических.

Вопросы по теме:

1. Оптические методы, основанные на определении в биоматериале лучистой энергии: фотометрия, спектрофотометрия
2. Флюориметрия, нефелометрия, поляриметрия
3. Флюориметрические методы, основанные на флюоресценции, фосфоресценции, хемилюминисценции.
4. Эмиссионные спектральные методы - пламенная фотометрия.
5. Атомная абсорбционная спектроскопия: область применения.
6. Определение содержания в биологических жидкостях метаболитов.
7. Определение активности ферментов.
8. Определение неорганических соединений, ксенобиотиков.

Тема 1.3. Электрохимические методы

Электрохимические методы основаны на измерении электрических параметров электрохимических явлений, возникающих в исследуемом растворе. Такое измерение осуществляют с помощью электрохимической ячейки, представляющей собой сосуд с исследуемым раствором, в который помещены электроды. Электрохимические процессы в растворе сопровождаются появлением или изменением разности потенциалов между электродами или изменением величины тока, проходящего через раствор.

Электрохимические методы классифицируют в зависимости от типа явлений, измеряемых в процессе анализа. В общем случае различают две группы электрохимических методов:

1. Методы без наложения постороннего потенциала, основанные на измерении разности потенциалов, который возникает в электрохимической ячейке, состоящей из электрода и сосуда с исследуемым раствором. Эту группу методов называют *потенциометрическими*. В потенциометрических методах используют зависимость равновесного потенциала электродов от концентрации ионов, участвующих в электрохимической реакции на электродах.

2. Методы с наложением постороннего потенциала, основанные на измерении: а) электрической проводимости растворов – *кондуктометрия* ; б) количества электричества, прошедшего через раствор – *кулонометрия* ; в) зависимости величины тока от приложенного потенциала – *вольт-амперометрия* ; г) времени, необходимого для прохождения электрохимической реакции – *хроноэлектрохимические методы* (хронвольтамперометрия, хронокондуктометрия). В методах этой группы на электроды электрохимической ячейки налагают посторонний потенциал.

Основным элементом приборов для электрохимического анализа является электрохимическая ячейка. В методах без наложения постороннего потенциала она представляет собой *гальванический элемент* , в котором вследствие протекания химических окислительно-восстановительных реакций возникает электрический ток. В ячейке типа гальванического элемента в контакте с анализируемым раствором находятся два электрода – индикаторный электрод, потенциал которого зависит от концентрации вещества, и электрод с постоянным потенциалом – электрод сравнения, относительно которого измеряют потенциал индикаторного электрода. Измерение разности потенциалов производят специальными приборами – потенциометрами.

В методах с наложением постороннего потенциала применяют *электрохимическую ячейку* , названную так потому, что на электродах ячейки под действием наложенного потенциала происходит электролиз – окисление или восстановление вещества. В кондуктометрическом анализе используют кондуктометрическую ячейку, в которой измеряют электрическую проводимость раствора. По способу применения электрохимические методы можно классифицировать на прямые, в которых концентрацию веществ измеряют по показанию прибора, и электрохимическое титрование, где индикацию точки эквивалентности фиксируют с помощью электрохимических измерений. В соответствии с этой классификацией различают потенциометрию и потенциометрическое титрование, кондуктометрию и кондуктометрическое титрование и т.д.

Приборы для электрохимических определений кроме электрохимической ячейки, мешалки, нагрузочного сопротивления включают устройства для измерения разности потенциалов, тока, сопротивление раствора, количества электричества. Эти измерения могут осуществляться стрелочными приборами (вольтметр или микроамперметр), осциллографами, автоматическими самопишущими потенциометрами. Если электрический сигнал от ячейки очень слабый, то его усиливают с помощью радиотехнических усилителей. В приборах методов с наложением постороннего потенциала важной частью являются устройства для подачи на ячейку соответствующего потенциала стабилизированного постоянного или переменного тока (зависит от типа метода). Блок электропитания приборов электрохимического анализа включает обычно выпрямитель и стабилизатор напряжения, который обеспечивает постоянство работы прибора.

Потенциометрия

Потенциометрия основана на измерении разности электрических потенциалов, возникающих между разнородными электродами, опущенными в раствор с определяемым веществом. Электрический потенциал возникает на электродах при прохождении на них окислительно-восстановительной (электрохимической) реакции. Окислительно-восстановительные реакции протекают между окислителем и восстановителем с образованием окислительновосстановительных пар, потенциал E которых определяется по уравнению Нернста концентрациями компонентов пар [ок] и [вос]:

$$E = E^{\circ} + \frac{0,059}{n} \lg \frac{[\text{ок}]^a}{[\text{вос}]^b}$$

Потенциометрические измерения проводят, опуская в раствор два электрода – индикаторный, реагирующий на концентрацию определяемых ионов, и стандартный электрод или электрод сравнения, относительно которого измеряется потенциал индикаторного. Применяют несколько видов индикаторных и стандартных электродов.

Электроды первого рода обратимы относительно ионов металла, из которого состоит электрод. При опускании такого электрода в раствор, содержащий катионы металла, образуется электродная пара



Электроды второго рода чувствительны к анионам и представляют собой металл M , покрытый слоем нерастворимой его соли MA с анионом



, к которому чувствителен электрод. При контакте такого электрода с раствором, содержащим указанный анион



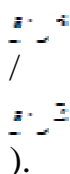
, возникает потенциал E , величина которого зависит от произведения растворимости соли

$E_{\text{ли}}$ и концентрации аниона [

] в растворе.

Электродами второго рода являются хлорсеребряный и каломельный. Насыщенные хлорсеребряный и каломельный электроды поддерживают постоянный потенциал и применяют в качестве электродов сравнения, по отношению к которым измеряется потенциал индикаторного электрода.

Инертные электроды – пластина или проволока, изготовленная из трудноокисляемых металлов – платины, золота, палладия. Применяются они для измерения E в растворах, содержащих окислительно-восстановительную пару (например,



Мембранные электроды различного типа имеют мембрану, на которой возникает мембранный потенциал E . Величина E зависит от разности концентраций одного и того же иона по разным сторонам мембраны. Простейшим и наиболее употребляемым мембранным электродом является стеклянный электрод.

Смешивание нерастворимых солей типа $AgBr$, $AgCl$, AgI и других с некоторыми пластмассами (каучуки, полиэтилен, полистирол) привело к созданию *ион-селективных электродов* на



, избирательно адсорбирующих из раствора указанные ионы вследствие правила Панета – Фаянса – Гана. Так как концентрация определяемых ионов вне электрода отличается от таковой внутри электрода, равновесия на поверхностях мембраны отличаются, что приводит к возникновению мембранного потенциала.

Для проведения потенциометрических определений собирают электрохимическую ячейку из индикаторного электрода сравнения, который опускают в анализируемый раствор и подсоединяют к потенциометру. Применяемые в потенциометрии электроды имеют большое внутреннее сопротивление (500-1000 МОм), поэтому существуют типы потенциометров представляют собой сложные

электронные высокоомные вольтметры. Для измерения ЭДС электродной системы в потенциометрах применяют компенсационную схему, позволяющую уменьшить ток в цепи ячейки.

Наиболее часто потенциометры применяют для прямых измерений рН, показатели концентраций других ионов рNa, рK, рNH, рCl и мВ. Измерения проводят, используя соответствующие ионселективные электроды.

Для измерения рН применяют стеклянный электрод и электрод сравнения – хлорсеребряный. Перед проведением анализов необходимо проверить калибровку рН-метров по стандартным буферным растворам, фиксаны которых прикладываются к прибору.

рН-метры помимо прямых определений рН, рNa, рK, рNH, рCl и других позволяют проводить потенциометрическое титрование определяемого иона.

Потенциометрическое титрование

Потенциометрическое титрование проводят в тех случаях, когда химические индикаторы использовать нельзя или при отсутствии подходящего индикатора.

В потенциометрическом титровании в качестве индикаторов используют электроды потенциометра, опущенные в титруемый раствор. При этом применяют электроды, чувствительные к титруемым ионам. В процессе титрования изменяется концентрация ионов, что регистрируется на шкале измерительного прибора потенциометра. Записав показания потенциометра в единицах рН или мВ, строят график их зависимости от объема титранта (кривую титрования), определяют точку эквивалентности и объем титранта, израсходованный на титрование. По полученным данным строят кривую потенциометрического титрования.

Кривая потенциометрического титрования имеет вид, аналогичный кривой титрования в титриметрическом анализе. По кривой титрования определяют точку эквивалентности, которая находится в середине скачка титрования. Для этого проводят касательные к участкам кривой титрования и по середине касательной скачка титрования определяют точку эквивалентности. Наибольшее значение изменения $\Delta pH/\Delta V$ приобретает в точке эквивалентности.

Еще более точно точку эквивалентности можно определить методом Грана, по которому строят зависимость $\Delta V/\Delta E$ от объема титранта. Методом Грана можно проводить потенциометрическое титрование, не доводя его до точки эквивалентности.

Потенциометрическое титрование применяют во всех случаях титриметрического анализа.

При кислотно-основном титровании используют стеклянный электрод и электрод сравнения. Поскольку стеклянный электрод

чувствителен к изменениям pH среды, при их титровании на потенциометре регистрируются изменения pH среды. Кислотноосновное потенциометрическое титрование с успехом применяют при титровании слабых кислот и оснований ($pK \leq 8$). При титровании смесей кислот необходимо, чтобы их pK отличались больше, чем на 4 единицы, в противном случае часть более слабой кислоты оттитровывается вместе с сильной, и скачок титрования выражен не четко.

Это позволяет использовать потенциометрию для построения экспериментальных кривых титрования, подбор индикаторов для титрования и определения констант кислотности и основности.

При осадительном потенциометрическом титровании применяют в качестве индикатора электрод из металла, составляющего с определяемыми ионами электродную пару.

При комплексометрическом титровании используют: а) металлический электрод, обратимый к иону определяемого металла; б) платиновый электрод при наличии в растворе окислительно-восстановительной пары. При связывании титрантом одного из компонентов редокс-пары меняется его концентрация, что вызывает изменения потенциала индикаторного платинового электрода. Применяются также обратное титрование избытка раствора ЭДТА, добавленного к соли металла, раствором соли железа (III).

При окислительно-восстановительном титровании применяют электрод сравнения и платиновый индикаторный электрод, чувствительный к окислительно-восстановительным парам.

Потенциометрическое титрование – один из наиболее употребляемых методов инструментального анализа вследствие простоты, доступности, селективности и широких возможностей.

Кондуктометрия. Кондуктометрическое титрование

Кондуктометрия основана на измерении электрической проводимости раствора. Если в раствор вещества поместить два электрода и подать на электроды разность потенциалов, то через раствор потечет электрический ток. Как и каждый проводник электричества, растворы характеризуются сопротивлением R и обратной ему величиной – электрической проводимостью L :

$$L = \frac{1}{R}$$

каждой порции титранта замеряют электр.проводимость раствора и строят график зависимости между электр.проводимостью и объемом титранта. При добавлении титранта происходит изменение электр.проводимости раствора в т.э. наступает перегиб кривой титрования.

От подвижности ионов зависит электр.проводимость раствора:

чем выше подвижность ионов, тем больше электр.проводимость раствора.

Кондуктометрическое титрование обладает рядом преимуществ. Его можно проводить в мутных и окрашенных средах, в отсутствии химических индикаторов. Метод обладает повышенной чувствительностью и позволяет анализировать разбавленные растворы веществ (до

— —

Прямая высокочастотная кондуктометрия применяется для определения влажности веществ, зерна, древесины, концентрации растворов в закрытых сосудах – ампулах, при анализе агрессивных жидкостей.

Высокочастотное титрование проводят на специальных титраторах – ТВ-6, ТВ-6Л.

Высокочастотное кондуктометрическое титрование проводят по типу кислотно-основного, окислительно-восстановительного или осадительного титрования в тех случаях, когда отсутствует подходящий индикатор или при анализе смесей веществ.

Кулонометрия. Кулонометрическое титрование

В кулонометрии вещества определяют измерением количества электричества, затраченного на их количественное электрохимическое превращение. Кулонометрический анализ проводят в электролитической ячейке, в которую помещают раствор определяемого вещества. При подаче на электроды ячейки соответствующего потенциала происходит электрохимическое восстановление или окисление вещества. Согласно законам электролиза, открытым Фарадеем, количество вещества, прореагировавшего на электроде, пропорционально количеству электричества, прошедшего через раствор:

$$m = \frac{M}{zF} Q$$

Кулонометрический анализ позволяет определять вещества, не осаждающиеся на электродах или улетучивающиеся в атмосферу при электрохимической реакции.

Различают кулонометрию прямую и кулонометрическое титрование. Высокая точность и чувствительность методов измерения электрического тока обеспечивает кулонометрическому анализу уникальную точность 0,1-0,001%, и чувствительность до $1 \cdot 10^{-8}$ - $1 \cdot 10^{-10}$ г.

Поэтому кулонометрический анализ применяется для определения микропримесей и продуктов разрушения веществ, что важно при контроле их качества.

Для индикации т.е. при кулонометрическом титровании можно применять химический и инструментальные методы – добавление индикаторов, обнаружение окрашенных соединений фотометрическим или спектрофотометрическим путём.

В отличие от других методов анализа кулонометрия может быть полностью автоматизирована, что сводит к минимуму случайные ошибки определения. Эта особенность использована при создании автоматических кулонометрических титраторов – чувствительных приборов, применяющихся для особо точных анализов, когда другие

методы оказываются недостаточно чувствительными. При анализе веществ, малорастворимых в воде, кулонометрию можно проводить на электродах из ацетиленовой сажи, являющиеся хорошим адсорбентом и извлекающий такие вещества из реакционной среды с достаточной полнотой. Кулонометрическое титрование – перспективный метод инструментального анализа. Он может найти широкое применение для решения ряда специальных аналитических задач – анализа примесей, малых количеств лекарственных препаратов, определение в биологическом материале и окружающей среде токсических веществ, микроэлементов и других соединений.

Список вопросов:

1. Охарактеризуйте такие методы исследования как: потенциометрия, кондуктометрия, полярография.
2. Укажите основные области применения масс-спектрометрия, осмометрии и ионоселективного анализа.
3. Актуальность определения рН в биологических средах.
4. Электропроводимость, окислительно-восстановительный потенциал, вида ионы и их концентрация в биологических жидкостях.

Тема 1.4. Хроматографические методы:

Хроматография – процесс, основанный на многократном повторении актов сорбции и десорбции вещества при перемещении его в потоке подвижной фазы вдоль неподвижного сорбента. Разделение сложных смесей хроматографическим способом основано на различной сорбируемости компонентов смеси. В процессе хроматографирования так называемая подвижная фаза (элюент), содержащая анализируемую пробу, перемещается через неподвижную фазу. Обычно неподвижная фаза представляет собой вещество с развитой поверхностью, а подвижная – поток газа или жидкости, фильтрующейся через слой сорбента. При этом происходит многократное повторение актов сорбции – десорбции, что является характерной особенностью хроматографического процесса и обуславливает эффективность хроматографического разделения.

Качественный хроматографический анализ, т.е. идентификация вещества по его *хроматограмме*, может быть выполнен сравнением хроматографических характеристик, чаще всего *удерживаемого объема* (т.е. объема подвижной фазы, пропущенной через колонку от начала ввода смеси до появления данного компонента на выходе из колонки), найденных при определенных условиях для компонентов анализируемой смеси и для эталона.

Количественный хроматографический анализ проводят обычно на хроматографе. Метод основан на измерении различных параметров хроматографического пика, зависящих от концентрации хроматографируемых веществ – высоты, ширины, площади и удерживаемого объема или произведения удерживаемого объема на высоту пика.

В количественной газовой хроматографии применяют методы абсолютной градуировки и внутренней нормализации, или нормировки. Используется также метод внутреннего стандарта. При *абсолютной градуировке* экспериментально определяют зависимость высоты или площади пика от концентрации вещества и строят градуировочные графики или рассчитывают соответствующие коэффициенты. Далее определяют те же характеристики пиков в анализируемой смеси, и по градуировочному графику находят концентрацию анализируемого вещества. Этот простой и точный метод является основным при определении микропримесей.

При использовании метода *внутренней нормализации* принимают сумму каких-либо параметров пиков, например сумму высот всех пиков или сумму их площадей, за 100%. Тогда отношение высоты отдельного пика к сумме высот или отношение площади одного пика к сумме площадей при умножении на 100 будет характеризовать массовую долю (%) компонента в смеси. При таком подходе необходимо, чтобы зависимость величины измеряемого параметра от концентрации была одинаковой для всех компонентов смеси.

Виды хроматографических методов

Хроматография впервые была введена в аналитическую практику русским ботаником М.С. Цветом. В первых же работах с помощью этого метода М.С. Цвет установил, что считавшийся однородным зеленый пигмент растений хлорофилл на самом деле состоит из нескольких веществ. При пропускании экстракта зеленого листа через колонку, заполненную порошком мела, и промывании петролейным эфиром он получил несколько окрашенных зон, что несомненно говорило о наличии в экстракте нескольких веществ. Впоследствии это было подтверждено другими исследователями. Этот метод он назвал *хроматографией*, хотя сам же указал на возможность разделения и бесцветных веществ.

Вещество подвижной фазы непрерывно вступает в контакт с новыми участками адсорбента и частью адсорбируется, а адсорбированное вещество контактирует со свежими порциями подвижной фазы и частично десорбируется.

Таким образом, создателю хроматографического метода был известен один механизм взаимодействия разделяемых веществ с материалом колонки – молекулярная адсорбция.

М.С. Цвет сформулировал закон, который назвал законом адсорбционного замещения:

Вещества, растворенные в определенной жидкости, образуют определенный адсорбционный ряд A, B, C, \dots , выражающий относительное адсорбционное сродство его членов к адсорбенту. Каждый из членов адсорбционного ряда, обладая большим адсорбционным сродством, чем последующий, вытесняет его из соединения и в свою очередь вытесняется предыдущим.

Таким образом, основным условием для осуществления хроматографического процесса – процесса разделения веществ на колонке – М.С. Цвет считал различие в адсорбируемости.

В современной хроматографии для разделения веществ кроме молекулярной адсорбции используют и другие физико-химические явления. Имеется несколько классификаций, основанных на различных принципах. Общепринятыми являются следующие.

По агрегатному состоянию применяемых фаз. Согласно этой классификации хроматографию подразделяют на газовую и жидкостную. Газовая включает газо-жидкостную и газо-адсорбционную хроматографию. Жидкостная хроматография подразделяется на жидкостно – жидкостную, жидкостно – адсорбционную и жидкостно – гелевую. Первое слово в этой классификации характеризует агрегатное состояние подвижной фазы.

По механизмам разделения, т.е. по характеру взаимодействия между сорбентом и сорбатом. По этой классификации хроматографию подразделяют на следующие виды:

1. адсорбционная хроматография – разделение основано на различии в адсорбируемости разделяемых веществ твердым адсорбентом;
2. распределительная хроматография – разделение основано на различии в растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе (газовая хроматография) и на различии в растворимости разделяемых веществ в подвижной и неподвижной жидких фазах;
3. ионообменная хроматография – разделение основано на различии в способности разделяемых веществ к ионному обмену;
4. проникающая хроматография – разделение основано на различии в размерах или формах молекул разделяемых веществ, например, при применении молекулярных сит (цеолитов);

5. осадочная хроматография – разделение основано на образовании различных по растворимости осадков разделяемых веществ с сорбентом;
6. адсорбционно-комплексобразовательная хроматография – разделение основано на образовании координационных соединений различной прочности в фазе или на поверхности адсорбента.

Следует иметь в виду, что очень часто процесс разделения протекает по нескольким механизмам.

По применяемой технике:

- 1) колоночная хроматография – разделение веществ проводится в специальных колонках;
- 2) плоскостная хроматография: а – бумажная – разделение веществ проводится на специальной бумаге; б – тонкослойная – разделение веществ проводится в тонком слое сорбента.

В колоночной и тонкослойной хроматографии можно использовать любой из приведенных выше механизмов разделения, в бумажной хроматографии чаще всего применяют распределительный и ионообменный механизмы.

По способу относительного перемещения фаз различают фронтальную, или элюэнтную, и вытеснительную хроматографию.

Фронтальный метод. Это простейший по методике вариант хроматографии. Он состоит в том, что через колонку с адсорбентом непрерывно пропускают анализируемую смесь, например, компонентов А и В в растворителе Solv. В растворе, вытекающем из колонки, определяют концентрацию каждого компонента и строят график в координатах концентрация вещества – объем раствора, прошедшего через колонку. Эту зависимость обычно и называют *хроматограммой* или *выходной кривой*.

Вследствие сорбции веществ А и В сначала из колонки будет вытекать растворитель Solv, а затем растворитель и менее сорбирующийся компонент А, затем и компонент В и, таким образом, через некоторое время состав раствора при прохождении через колонку меняться не будет. Метод применяется, например, для очистки раствора от примесей, если они сорбируются существенно лучше, чем основной компонент, или для выделения из смеси наиболее слабо сорбирующегося вещества.

Проявительный (элюэнтный) метод. При работе по этому методу в колонку вводят порцию анализируемой смеси, содержащей компоненты А и В в растворителе Solv, и колонку непрерывно промывают газом-носителем или растворителем Solv. При этом компоненты анализируемой смеси разделяются на *зоны*: хорошо сорбирующееся

вещество В занимает верхнюю часть колонки, а менее сорбирующийся компонент А будет занимать нижнюю часть.

В газе или растворе, вытекающем из колонки, сначала появляется компонент А, далее – чистый растворитель, а затем компонент В. Чем больше концентрация компонента, тем выше пик и больше его площадь, что составляет основу количественного хроматографического анализа. Проявительный метод дает возможность разделять сложные смеси, он наиболее часто применяется в практике. Недостатком метода является уменьшение концентрации выходящих растворов за счет разбавления растворителем или газом-носителем.

Вытеснительный метод. В этом методе анализируемую смесь компонентов А и В в растворителе Solv вводят в колонку и промывают раствором вещества D (вытеснитель), которое сорбируется лучше, чем любой из компонентов анализируемой смеси.

Концентрация раствора при хроматографировании не уменьшается, в отличие от проявительного метода. Существенным недостатком вытеснительного метода является возможное наложение зоны одного вещества на зону другого, поскольку зоны компонентов в этом методе не разделены зоной растворителя.

В хроматографии чаще всего используют методику *проявительного (элюентного) анализа*, в этом случае наблюдаемый пик в координатах концентрация - объем называют *хроматографическим пиком* и характеризуют *высотой, шириной и площадью*.

В аналитической практике широко используют метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Это связано с чрезвычайным разнообразием жидких неподвижных фаз, что облегчает выбор селективной для данного анализа фазы. Для обеспечения селективности колонки важно правильно выбрать неподвижную жидкую фазу. Эта фаза должна быть хорошим растворителем для компонентов смеси (если растворимость мала, компоненты выходят из колонки очень быстро), нелетучей (чтобы не испарялась при рабочей температуре колонки), химически инертной, должна обладать небольшой вязкостью (иначе замедляется процесс диффузии) и при нанесении на носитель образовывать равномерную пленку, прочно с ним связанную. Разделительная способность неподвижной фазы для компонентов данной пробы должна быть максимальной.

Носители неподвижных жидких фаз. Твердые носители для диспергирования неподвижной жидкой фазы в виде однородной тонкой пленки должны быть механически прочными с умеренной удельной поверхностью (порядка 20 м²/г), небольшим и одинаковым размером

частиц, а также быть достаточно инертными, чтобы адсорбция на поверхности раздела твердой и газообразной фаз была минимальной. Самая слабая адсорбция наблюдается на носителях из силанизированного хромосорбата, стеклянных гранул и флуоропака (фторуглеродный полимер). Кроме того, твердые носители не должны реагировать на повышение температуры и должны легко смачиваться жидкой фазой. В газовой хроматографии хелатов в качестве твердого носителя чаще используют силанизированные диатомитовые носители – диатомовый кремнезем, или кизельгур.

Газожидкостная хроматография (ГЖХ) – один из самых современных методов многокомпонентного анализа. Его отличительные черты – экспрессность, высокая точность,

чувствительность, возможность автоматизации. Метод позволяет решить многие аналитические проблемы.

Количественный ГЖХ анализ можно рассматривать как самостоятельный аналитический метод, более эффективный при разделении веществ, относящихся к одному и тому же классу.

Жидкостно-жидкостная хроматография по сути близка к газожидкостной. На твердый носитель также наносится пленка жидкой фазы, и через колонку, наполненную таким сорбентом, пропускают жидкий раствор. Этот вид хроматографии называют жидкостножидкостной распределительной хроматографией. Жидкость, нанесенную на носитель, называют неподвижной жидкой фазой, а растворитель, передвигающийся через носитель, – подвижной жидкой фазой. Жидкостно-жидкостная хроматография проводится в колонке (колоночный вариант) или на бумаге (бумажная хроматография, хроматография на бумаге).

Разделение смеси веществ в жидкостно-жидкостной хроматографии основывается на различии коэффициентов распределения вещества между несмешивающимися растворителями. Коэффициент распределения вещества равен:

$$K_{п/н} = c_{п} / c_{н}$$

Где $c_{п}$ и $c_{н}$ – концентрация вещества в подвижной и неподвижной фазах.

Для членов одного гомологического ряда установлены некоторые закономерности в величинах $K_{п/н}$. Известна, например, зависимость $K_{п/н}$ в данном гомологическом ряду от числа атомов углерода.

Поиск несмешивающихся фаз, обеспечивающих разделение, обычно производится эмпирически на основе экспериментальных данных. Широкое применение в жидкостно-жидкостной хроматографии

получили тройные системы, состоящие из двух несмешивающихся растворителей и третьего, растворимого в обеих фазах. Такие системы позволяют получать набор несмешивающихся фаз различной селективности. В качестве примера можно привести систему из несмешивающихся между собой гептана и воды, в которую введен этанол, растворяющийся в обоих растворителях.

Хотя в качестве подвижной и неподвижной фаз выбираются растворители, не смешивающиеся между собой, все же во многих системах наблюдается некоторая взаимная растворимость. Чтобы предотвратить процессы взаимного растворения жидкостей в ходе хроматографирования, подвижную фазу предварительно насыщают неподвижной. Для сохранения неизменного состава фаз применяют также метод химического закрепления неподвижной фазы на сорбенте. При этом используют взаимодействие растворителя с группами OH^- на поверхности носителя. Адсорбенты с закрепленной на их поверхности жидкой фазой выпускаются промышленностью.

Эффективность колонки связана с вязкостью, коэффициентом диффузии и другими физическими свойствами жидкостей. Носитель неподвижной фазы должен обладать достаточно развитой поверхностью, быть химически инертным, прочно удерживать на своей поверхности жидкую фазу и не растворяться в применяемых растворителях. В качестве носителей используют вещества различной химической природы: гидрофильные носители – силикагель, целлюлоза и др. и гидрофобные – фторопласт, тефлон и другие полимеры. Кроме обычных носителей, используемых для заполнения колонок, в распределительной хроматографии применяют специфический носитель (хроматографическая бумага), а методика называется *распределительная хроматография на бумаге* или *распределительная бумажная хроматография*.

Важной характеристикой в бумажной распределительной хроматографии является величина $R_f = x / x_f$, где x – смещение зоны компонента; x_f – смещение фронта растворителя. При идеальных условиях коэффициент R_f определяется только природой вещества, параметрами бумаги и свойствами растворителей, но не зависит от концентрации вещества и присутствия других компонентов. В действительности коэффициент R_f в некоторой степени оказывается зависящим от этих факторов и техники эксперимента. Тем не менее, при достаточном постоянстве условий опыта и не слишком больших колебаниях в составе смеси этот коэффициент остается вполне постоянным и может быть использован для идентификации компонента смеси.

Хроматографическая бумага должна быть химически чистой, нейтральной, инертной по отношению к компонентам раствора и подвижному растворителю и быть однородной по плотности. Имеют значение также такие свойства, как структура молекул целлюлозы в бумаге, сорбируемость, ориентация волокна и другие, влияющие на скорость движения растворителя и на иные характеристики процесса. При выборе в качестве неподвижной фазы бумаги необходимо учитывать, что некоторые органические вещества превращают гидрофильную бумагу в гидрофобную. Для этого ее можно пропитать растворами различных гидрофобных веществ – парафина, растительного масла и др.

В выбранных растворителях компоненты пробы должны иметь разную растворимость, иначе разделения вообще не произойдет. В растворителе, являющемся подвижной фазой, растворимость каждого компонента должна быть меньшей, чем в растворителе неподвижной фазы, но все же составлять вполне заметное значение. Это ограничение связано с тем, что если растворимость вещества будет очень велика, вещество будет двигаться вместе с фронтом растворителя, а если растворимость будет мала, вещество останется на начальной линии.

Для разделения водорастворимых веществ в качестве подвижной фазы обычно выбирают органический растворитель, а в качестве неподвижной – воду. К растворителям предъявляются следующие требования: растворители подвижной и неподвижной фаз не должны смешиваться, состав растворителя в процессе хроматографирования не должен изменяться, растворители должны легко удаляться с бумаги, быть доступными и нетоксичными для человека.

Индивидуальные растворители в распределительной хроматографии используют относительно редко. Чаще для этой цели применяют смеси веществ, например бутилового или амилового спирта с метиловым или этиловым, насыщенные водные растворы фенола, крезол и др., смеси бутилового спирта с уксусной кислотой, аммиаком т.д. Применение различных смесей растворителей позволяет плавно изменять R_f и тем самым создавать наиболее благоприятные условия разделения.

Качественный состав пробы в методе бумажной распределительной хроматографии может быть установлен по специфической окраске отдельных пятен на хроматограмме, либо по числовому значению R_f каждого компонента.

Количественные определения в распределительной хроматографии выполняются по хроматографическим характеристикам (площадь пятна на хроматограмме и интенсивность его окраски), либо по методу вымывания. В последнем случае хроматограмму разрезают на отдельные части по числу пятен, каждое пятно обрабатывают

соответствующим экстрагентом и определяют количество экстрагированного вещества любым подходящим методом: фотометрическим, полярографическим и т. д.

Тонкослойная хроматография

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), получивший в настоящее время широкое распространение, был разработан Н.А. Измайлковым и М.С. Шрайбер в 1938 г.

В методе ТСХ неподвижная твердая фаза тонким слоем наносится на стеклянную, металлическую или пластмассовую пластинку. В 2–3 см от края пластинки на стартовую линию вносят пробу анализируемой жидкости и край пластинки погружают в растворитель, который действует как подвижная фаза жидкостной адсорбционной хроматографии. Под действием капиллярных сил растворитель движется вдоль слоя сорбента и с разной скоростью переносит компоненты смеси, что приводит к их разделению. Диффузия в тонком слое происходит в продольном и поперечном направлениях, поэтому процесс следует рассматривать как двумерный.

Сорбционные свойства системы в ТСХ характеризуются *подвижностью*, т.е. величиной R_f , которая рассчитывается из экспериментальных данных по уравнению:

$$R_f = X_i / X_f$$

где X_i - расстояние от стартовой линии до центра зоны i -го компонента; X_f - расстояние, пройденное за это же время растворителем. *Основные элементы установок ТСХ*

Подложки для сорбента (пластинки) обычно изготавливают из стекла, алюминиевой фольги или полиэфирной пленки. В качестве сорбента в ТСХ применяют силикагели, оксид алюминия, крахмал, целлюлозу. Выбор растворителя зависит от природы сорбента и свойств анализируемых соединений. Часто применяют смеси растворителей из двух или трех компонентов. По окончании хроматографирования непроточным методом зоны на хроматограмме проявляют химическим или физическим способом. При химическом способе пластинку опрыскивают раствором реактива, взаимодействующего с компонентами смеси. В физических способах проявления используется способность некоторых веществ флуоресцировать под действием ультрафиолетового излучения, часто при добавлении флуоресцирующего индикатора, взаимодействующего с компонентами смеси. После проявления хроматограммы приступают к идентификации веществ и дальнейшему анализу.

Наиболее общий подход к качественному анализу основан на значениях R_f . Хроматографическая подвижность является чувствительной характеристикой вещества, однако она существенно зависит от условий определения. При соблюдении стандартных условий получают воспроизводимые значения R_f , которые можно использовать в аналитических целях при сравнении с табличными, если они получены в тех же условиях опыта.

Самым надежным является методом свидетелей, когда на стартовую линию рядом с пробой наносятся индивидуальные вещества, соответствующие предполагаемым компонентам смеси. Влияние различных факторов на все вещества будут одинаковым, поэтому совпадение R_f компонента пробы и одного из свидетелей дает основание для отождествления веществ с учетом возможных наложений. Несовпадение R_f интерпретируется более однозначно: оно указывает на отсутствие в пробе соответствующего компонента. На практике стандартное вещество (свидетель) в том же растворителе наносится на стартовую линию вместе с анализируемой пробой и хроматографируется в тех же условиях.

Количественный анализ в ТСХ

Количественные определения в ТСХ могут быть сделаны непосредственно на пластинке, либо после удаления вещества с пластинки. При непосредственном определении на пластинке измеряют тем или иным методом площадь пятна (например, с помощью миллиметровой кальки) и по заранее построенному градуировочному графику находят количество вещества.

Наиболее точным считается метод, в котором вещество после разделения удаляется с пластинки и анализируется спектрофотометрическим или иным методом. Удаление вещества с пластинки обычно производят механическим путем, хотя иногда применяют вымывание подходящим растворителем.

Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография основана на обратимом стехиометрическом обмене ионов, находящихся в растворе, на ионы, входящие в состав ионообменника.

Применяемые в настоящее время синтетические ионообменники обладают рядом важных достоинств: они имеют высокую *обменную емкость* и воспроизводимые ионообменные и другие свойства, устойчивы к действию кислот и оснований, не разрушаются в присутствии многих окислителей и восстановителей. Обычно синтетический ионообменник представляет собой высокополимерное

соединение, например поперечно-сшитый полистирол, содержащий различные функциональные группы, которые и определяют наиболее характерные свойства смол.

Типы ионообменных смол

В зависимости от знака разряда функциональных групп ионообменные смолы являются *катионитами* или *анионитами*. Катиониты содержат функциональные кислотные группы [$-\text{SO}_3^-$; $-\text{COO}^-$; $-\text{PO}_3^-$; $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2^-)_2$]. Функциональными группами каркаса анионитов являются четвертичные $-\text{NR}_3^+$, третичные $-\text{NR}_2\text{H}^+$ или первичные $-\text{NH}_3^+$ аммониевые, пиридиновые или другие основания.

Важной характеристикой ионообменника является его *обменная емкость*. Обменную емкость ионита численно можно выразить количеством молей эквивалента противоиона на единицу массы или объема смолы.

Практическое применение ионообменной хроматографии

Методы ионообменной хроматографии используют преимущественно для разделения ионов. Количественные определения компонентов после разделения могут быть выполнены любым подходящим методом.

Простейшая методика ионообменного разделения состоит в поглощении компонентов смеси ионитом и последовательном элюировании каждого компонента подходящим растворителем. Методами ионообменной хроматографии определяют очень многие анионы в питьевой и технической воде, в продуктах технологической переработки в пищевой, фармацевтической и других отраслях промышленности. Методами ионообменной хроматографии определяют главным образом катионы щелочных и щелочноземельных металлов, а также органические катионы замещенных солей аммония.

Вопросы по теме

1. Опишите методы хроматографии: газовая, газо-жидкостная, жидкостная хроматография.
2. Охарактеризуйте область применения хроматографических методов.
3. Возможности исследования хроматографических методов.
4. Исследование газов, неорганических ионов, аминокислот, белков, углеводов, жиров хроматографическими методами.

5. Исследование витаминов, гормонов, медикаментов хроматографическими методами.
6. Исследование растворимых вирусов, бактерий.
7. Основы теории хроматографии

1.5 Микроскопия.

Микроскопические методы исследования - способы изучения различных объектов с помощью микроскопа. В биологии и медицине эти методы позволяют изучать строение микроскопических объектов, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности глаза человека. Основу микроскопических методов исследования (М.м.и.) составляет световая и электронная микроскопия. В практической и научной деятельности врачи различных специальностей - вирусологи, микробиологи, цитологи, морфологи, гематологи и др. помимо обычной световой микроскопии используют фазово-контрастную, интерференционную, люминесцентную, поляризационную, стереоскопическую, ультрафиолетовую, инфракрасную микроскопию. В основе этих методов лежат различные свойства света. При электронной микроскопии изображение объектов исследования возникает за счет направленного потока электронов.

Виды микроскопии

Световая микроскопия

Для световой микроскопии и основанных на ней других М.м.и. определяющее значение помимо разрешающей способности микроскопа имеет характер и направленность светового луча, а также особенности изучаемого объекта, который может быть прозрачным и непрозрачным. В зависимости от свойств объекта изменяются физические свойства света - его цвет и яркость, связанные с длиной и амплитудой волны, фаза, плоскость и направление распространения волны. На использовании этих свойств света и строятся различные М. м. и. Для световой микроскопии биологические объекты обычно окрашивают с целью выявления тех или иных их свойств. При этом ткани должны быть фиксированы, т. к. окраска выявляет определенные структуры только убитых клеток. В живой клетке краситель обособляется в цитоплазме в виде вакуоли и не прокрашивает ее структуры. Однако в световом микроскопе можно изучать и живые биологические объекты с помощью метода витальной микроскопии. В этом случае применяют темнопольный конденсор, который встраивают в микроскоп.

Для исследования живых и неокрашенных биологических объектов используют также фазово-контрастную микроскопию. Она основана на дифракции луча света в зависимости от особенностей объекта излучения. При этом изменяется длина и фаза световой волны. Объектив специального фазово-контрастного микроскопа содержит полупрозрачную фазовую пластинку. Живые микроскопические объекты или фиксированные, но не окрашенные, микроорганизмы и клетки из-за их прозрачности практически не изменяют амплитуду и цвет проходящего через них светового луча, вызывая лишь сдвиг фазы его волны. Однако, пройдя через изучаемый объект, лучи света отклоняются от полупрозрачной фазовой пластинки. В результате между лучами, прошедшими через объект, и лучами светового фона возникает разность длины волны. Если эта разность составляет не менее $1/4$ длины волны, то появляется зрительный эффект, при котором темный объект отчетливо виден на светлом фоне или наоборот в зависимости от особенностей фазовой пластинки.

Разновидностью фазово-контрастной микроскопии является амплитудно-контрастная, или аноптральная, микроскопия, при которой применяют объектив со специальными пластинками, изменяющими только яркость и цвет фонового света. В результате расширяются возможности исследования живых неокрашенных объектов. Фазовоконтрастная микроскопия находит применение в микробиологии и паразитологии при исследовании микроорганизмов, простейших, клеток растений и животных; в гематологии для подсчета и определения дифференцировки клеток костного мозга и крови; а также при изучении клеток культуры тканей и т. п.

Интерференционная микроскопия

Интерференционная микроскопия решает те же задачи, что и фазово-контрастная. Но если последняя позволяет наблюдать лишь контуры объектов исследования, то с помощью интерференционной микроскопии можно изучать детали прозрачного объекта и проводить их количественный анализ. Это достигается благодаря раздвоению луча света в микроскопе: один из лучей проходит через частицу наблюдаемого объекта, а другой мимо нее. В окуляре микроскопа оба луча соединяются и интерферируют между собой. Возникающую разность фаз можно измерить, определив т. о. массу различных клеточных структур. Последовательное измерение разности фаз света с известными показателями преломления дает возможность определять толщину живых объектов и нефиксированных тканей, концентрацию в них воды и сухого вещества, содержание белков и т. д. На основании данных интерференционной микроскопии можно косвенно судить о

проницаемости мембран, активности ферментов, клеточном метаболизме объектов исследования.

Поляризационная микроскопия

Поляризационная микроскопия позволяет изучать объекты исследования в свете, образованном двумя лучами, поляризованными во взаимноперпендикулярных плоскостях, т. е. в поляризованном свете. Для этого используют пленчатые поляроиды или призмы Николя, которые помещают в микроскопе между источником света и препаратом. Поляризация меняется при прохождении (или отражении) лучей света через различные структурные компоненты клеток и тканей, свойства которых неоднородны. В так называемых изотропных структурах скорость распространения поляризованного света не зависит от плоскости поляризации, в анизотропных структурах скорость его распространения меняется в зависимости от направления света по продольной или ванном свете в норме.

Если показатель преломления света вдоль структуры больше, чем в поперечном направлении, возникает положительное двойное лучепреломление, при обратных взаимоотношениях - отрицательное двойное лучепреломление. Многие биологические объекты имеют строгую молекулярную ориентацию, являются анизотропными и обладают положительным двойным преломлением света. Такими свойствами обладают миофибриллы, реснички мерцательного эпителия, нейрофибриллы, коллагеновые волокна и др. Сопоставление характера преломления лучей поляризованного света и величины анизотропии объекта позволяет судить о молекулярной организации его структуры (*рис.2*). Поляризационная микроскопия является одним из гистологических методов исследования, способом микробиологической диагностики, находит применение в цитологических исследованиях и др. При этом в поляризованном свете можно исследовать как окрашенные, так и неокрашенные и нефиксированные, так называемые нативные препараты срезов тканей.

Люминесцентная микроскопия

Широкое распространение имеет люминесцентная микроскопия. Она основана на свойстве некоторых веществ давать свечение - люминесценцию в УФ-лучах или в сине-фиолетовой части спектра. Многие биологические вещества, такие как простые белки, коферменты, некоторые витамины и лекарственные средства, обладают собственной (первичной) люминесценцией. Другие вещества начинают светиться только при добавлении к ним специальных красителей -- флюорохромов (вторичная люминесценция). Флюорохромы могут распределяться в

клетке диффузно либо избирательно окрашивают отдельные клеточные структуры или определенные химические соединения биологического объекта. На этом основано использование люминесцентной микроскопии при цитологических и гистохимических исследованиях. С помощью иммуно-флюоресценции в люминесцентном микроскопе выявляют вирусные антигены и их концентрацию в клетках, идентифицируют вирусы, определяют антигены и антитела, гормоны, различные продукты метаболизма и т. д. В связи с этим люминесцентную микроскопию применяют в лабораторной диагностике таких инфекций, как герпес, эпидемический паротит, вирусный гепатит, грипп и др., используют в экспресс диагностике респираторных вирусных инфекций, исследуя отпечатки со слизистой оболочки носа больных, и при дифференциальной диагностике различных инфекций. В патоморфологии с помощью люминесцентной микроскопии распознают злокачественные опухоли в гистологических и цитологических препаратах, определяют участки ишемии мышцы сердца при ранних сроках инфаркта миокарда, выявляют амилоид в биоптатах тканей.

-

Ультрафиолетовая микроскопия

Ультрафиолетовая микроскопия основана на способности некоторых веществ, входящих в состав живых клеток, микроорганизмов или фиксированных, но не окрашенных, прозрачных в видимом свете тканей, поглощать УФ-излучение с определенной длиной волн (400- 250 нм). Этим свойством обладают высокомолекулярные соединения, такие как нуклеиновые кислоты, белки, ароматические кислоты (тирозин, триптофан, метилаланин), пуриновые и пиридиновые основания и др. С помощью ультрафиолетовой микроскопии уточняют локализацию и количество указанных веществ, а в случае исследования живых объектов - их изменения в процессе жизнедеятельности.

Инфракрасная микроскопия

Инфракрасная микроскопия позволяет исследовать непрозрачные для видимого света и УФ-излучения объекты путем поглощения их структурами света с длиной волны 750--1200 нм. Для инфракрасной микроскопии не требуется предварительной хим. обработки препаратов. Этот вид М. м. и. наиболее часто используют в зоологии, антропологии, других отраслях биологии. В медицине инфракрасную микроскопию применяют в основном в нейроморфологии и офтальмологии.

Стереоскопическая микроскопия

Для исследования объемных объектов используют стереоскопическую микроскопию. Конструкция стереоскопических микроскопов позволяет видеть объект исследования правым и левым глазом под разными углами. Исследуют непрозрачные объекты при относительно небольшом увеличении (до 120 раз). Стереоскопическая микроскопия находит применение в микрохирургии, в патоморфологии при специальном изучении биопсийного, операционного и секционного материала, в судебно-медицинских лабораторных исследованиях.

Электронная микроскопия

Для изучения на субклеточном и макромолекулярном уровнях структуры клеток, тканей микроорганизмов и вирусов используют электронную микроскопию. Этот М. м. и. позволил перейти на качественно новый уровень изучения материи. Он нашел широкое применение в морфологии, микробиологии, вирусологии, биохимии, онкологии, генетике, иммунологии. Резкое повышение разрешающей способности электронного микроскопа обеспечивается потоком электронов, проходящих в вакууме через электромагнитные поля, создаваемые электромагнитными линзами. Электроны могут проходить через структуры исследуемого объекта (трансмиссионная электронная микроскопия) или отражаться от них (сканирующая электронная микроскопия), отклоняясь под разными углами, в результате чего возникает изображение на люминесцентном экране микроскопа. При трансмиссионной (просвечивающей) электронной микроскопии получают плоскостное изображение структур, при сканирующей – объемное. Сочетание электронной микроскопии с другими методами, например, с радиоавтографией, гистохимическими, иммунологическими методами исследования, позволяет проводить электроннорadioавтографические, электронно-гистохимические, электронноиммунологические исследования.

Электронная микроскопия требует специальной подготовки объектов исследования, в частности химической или физической фиксации тканей и микроорганизмов. Биопсийный материал и секционный материал после фиксации обезвоживают, заливают в эпоксидные смолы, режут стеклянными или алмазными ножами на специальных ультратомах, позволяющих получать ультратонкие срезы тканей толщиной 30--50 нм. Их контрастируют и затем изучают в электронном микроскопе. В сканирующем (растровом) электронном микроскопе изучают поверхность различных объектов, напыляя на них в вакуумной камере электронно-плотные вещества, и исследуют так наз. реплики, повторяющие контуры образца.

Некоторые виды современных микроскопов

Фазово-контрастный микроскоп (анофтральный микроскоп) служит для исследования прозрачных объектов, которые не видны на светлом поле и не подлежат окрашиванию из-за возникновения аномалий в исследуемых образцах.

Интерференционный микроскоп дает возможность исследовать объекты с низкими показателями преломления света и чрезвычайно малой толщины.

Ультрафиолетовый и инфракрасный микроскопы предназначены для исследования объектов в ультрафиолетовом или инфракрасном участке светового спектра. Они снабжены флюоресцентным экраном, на котором формируется изображение исследуемого препарата, фотокамерой с чувствительным к этим излучениям фотоматериалом или электронно-оптическим преобразователем для формирования изображения на экране осциллоскопа. Длина волны ультрафиолетовой части спектра составляет 400--250 нм, поэтому в ультрафиолетовом микроскопе можно получить более высокое разрешение, чем в световом, где освещение осуществляется видимым световым излучением с длиной волны 700--400 нм. Преимуществом этого М. является также то, что невидимые в обычном световом микроскопе объекты становятся видимыми, поскольку поглощают УФ-излучение. В инфракрасном микроскопе наблюдение объектов ведется на экране электронно-оптического преобразователя или фотографируется. С помощью инфракрасной микроскопии изучают внутреннюю структуру непрозрачных объектов.

Поляризационный микроскоп позволяет выявлять неоднородности (анизотропию) структуры при изучении строения тканей и образований в организме в поляризованном свете. Освещение препарата в поляризационном микроскопе осуществляется через поляризатор-пластинку, которая обеспечивает прохождение света в определенной плоскости распространения волн. Когда поляризованный свет, взаимодействуя со структурами, изменяется, то структуры резко контрастируют, что широко используют в медико-биологических исследованиях при изучении препаратов крови, гистологических препаратов, шлифов зубов, костей и т. д.

Люминесцентный микроскоп (МЛ-2, МЛ-3) предназначен для исследования люминесцирующих объектов, что достигается при освещении последних с помощью УФ-излучения. Наблюдая или фотографируя препараты в свете их видимой возбужденной флюоресценции (т. е. в отраженном свете), можно судить о структуре исследуемого образца, что используется в гистохимии, гистологии, микробиологии и при иммунологических исследованиях. Прямое

окрашивание люминесцентными красителями позволяет более четко выявлять такие структуры клеток, которые трудно рассмотреть в световом микроскопе.

Рентгеновский микроскоп используется для исследования объектов в рентгеновском излучении, поэтому такие микроскопы снабжены микрофокусным рентгеновским источником излучения, преобразователем рентгеновского изображения в видимое -- электронно-оптическим преобразователем, формирующим видимое изображение на осциллографической трубке или на фотопленке. Рентгеновские микроскопы имеют линейное разрешение до 0,1 мкм, что позволяет исследовать тонкие структуры живого вещества.

Электронный микроскоп предназначен для исследования сверхтонких структур, неразличимых в световых микроскопах. В отличие от светового, в электронном микроскопе разрешение определяется не только явлениями дифракции, но и различными aberrациями электронных линз, которые практически невозможно корректировать. Наводка микроскопа, в основном, производится диафрагмированием за счет применения малых апертур электронных пучков.

Историческая справка

Свойство системы из двух линз давать увеличенные изображения предметов было известно уже в 16 в. в Нидерландах и Северной Италии мастерам, изготавливавшим очковые стекла. Имеются сведения, что около 1590 прибор типа М. был построен З. Янсенем (Нидерланды). Быстрое распространение М. и их совершенствование, главным образом ремесленниками-оптиками, начинается с 1609--10, когда Г. Галилей, изучая сконструированную им зрительную трубу (см. Зрительная труба), использовал её и в качестве М., изменяя расстояние между объективом и окуляром. Первые блестящие успехи применения М. в научных исследованиях связаны с именами Р. Гука (около 1665; в частности, он установил, что животные и растительные ткани имеют клеточное строение) и особенно А. Левенгука, открывшего с помощью М. микроорганизмы (1673--77). В начале 18 в. М. появились в России: здесь Л. Эйлер (1762; «Диоптрика», 1770--71) разработал методы расчёта оптических узлов М. В 1827 Дж. Б. Амичи впервые применил в М. иммерсионный объектив. В 1850 английский оптик Г. Сорби создал первый М. для наблюдения объектов в поляризованном свете.

Широкому развитию методов микроскопических исследований и совершенствованию различных типов М. во 2-й половине 19 и в 20 вв. в

значительной степени способствовала научная деятельность Э. Аббе, который разработал (1872--73) ставшую классической теорию образования изображений несамосветящихся объектов в М. Английский учёный Дж. Сиркс в 1893 положил начало интерференционной микроскопии. В 1903 австр. исследователи Р. Зигмонди и Г. Зидентопф создали т. н. ультрамикроскоп. В 1935 Ф. Цернике предложил метод фазового контраста для наблюдения в М. прозрачных слабо рассеивающих свет объектов. Большой вклад в теорию и практику микроскопии внесли сов. учёные -- Л. И. Мандельштам, Д. С. Рождественский, А. А. Лебедев, В. П. Линник.

Вопросы по теме:

1. Этапы развития микроскопии.
2. Выдающиеся открытия XIII века в области микроскопии.
3. Объекты исследования микроскопии: кровь, костный мозг, спинномозговая жидкость и другие биожидкости организма.
4. Подсчет клеток в мазках периферической крови, клеток в соскобах, мазках, пунктатах тканей.
5. Определение микроорганизмов, грибов, паразитов.
7. Техническое обеспечение: световые, инвертированные, поляризационные, фазово-контрастные, интерференционные микроскопы.
8. Флюоресцентная и электронная микроскопия.

1.6. Методы иммунодиагностики. Иммуноферментный анализ (ИФА).

Иммуноферментный анализ (ИФА)

основан на взаимодействии антигена с антителом, при этом один из них имеет в своем составе фермент. При образовании комплекса антигенантитело содержащее пробирки (или ячейки планшеты) меняет цвет под воздействием фермента. Полученный результат сравнивают со стандартной цветовой шкалой и определяют по ней антиген и его количество.

Этот способ диагностики широко используют в медицине для выявления болезнетворных микроорганизмов (особенно вирусов), определения уровня гормонов, лекарственных веществ в крови, аллергенов, инфекционных заболеваний (вирусных гепатитов, краснухи, гепатита, цитомегалии и др.), заболеваний иммунной системы и злокачественных новообразований.

Преимущества иммуноферментного анализа по сравнению с другими видами иммунодиагностики:

- 1) высокая чувствительность реакций - одна молекула фермента может вызвать значительные изменения во взаимодействующих компонентах;
- 2) исследуемый материал (плазма или сыворотка крови) необходим в минимальном количестве;
- 3) длительное хранение лабораторных расходных материалов для исследования;
- 4) результат можно оценивать как с помощью приборов, так и «на глаз»;
- 5) можно определить количество антигенов или антител в исследуемом материале от пациента;
- 6) простота проведения;
- 7) возможно проведение анализа с помощью автоматических анализаторов;
- 8) экономичность

Иммуноферментный анализ осуществляют несколькими способами. Наиболее часто проводят твердофазный (гетерогенный) иммуноферментный анализ, подразумевающий использование фиксированного на твердой поверхности и нерастворимого реагента с антигенами или антителами. Соответствующие компоненты из исследуемого материала (антитела или антигены) впитываются твердым реагентом. Не вступившие в связь с таким реагентом компоненты легко удаляются с планшеты. В качестве фермента-метки используют щелочную фосфатазу, В-галактозидазу, а наиболее часто - пероксидазу хрена. Последний фермент доступный, очень активный и достаточно стабильный.

Антиген вируса гепатита В впервые выявили при исследовании крови аборигенов Австралии. Это послужило поводом назвать антиген австралийским, что прочно осело в медицинской терминологии. Иммуноферментный анализ проводят в присутствии ортофенилендиамина и перекиси водорода. При их взаимодействии образуется вещество, которое определяется фотометрически. Для прекращения ферментативной реакции используют тормозный реагент - серную кислоту.

Результат иммуноферментного анализа определяется с помощью спектрофотометрии. В некоторых случаях (при выявлении

австралийского антигена) для достоверности результатов делают подтверждающий лабораторный тест. Строгое следование правилам проведения анализа и использования реагентов исключает ошибочные заключения.

Твердофазный иммуноферментный анализ проводят разными методами и способами. Для проведения иммуноферментного анализа с целью диагностики вирусных гепатитов используют множество реагентов.

"Сэндвич-метод"

К фиксированному на твердой нерастворимой поверхности антителам добавляют исследуемый материал с антигенами с соблюдением определенных условий. Затем с планшетки удаляют непрореагировавшие компоненты и добавляют ферментсодержащие антитела к предполагаемому антигену. Далее опять выдерживают планшечку в определенных условиях и удаляют не вступившие в реакцию компоненты. На планшечке остается антиген, заключенный между слоями антител. Если комплексы антитело-антиген-антитело + фермент представлены, то далее при добавлении химического субстрата происходит изменение его цвета.

Способы ИФА:

- 1) фиксированные на твердой поверхности антигены + материал от пациента с антителами + ферментсодержащие антиантитела (антитела к иммуноглобулинам G пациента). С использованием этих реагентов выявляют антитела к вирусу гепатита С;
- 2) фиксированные на твердой поверхности антигены + материал от пациента с антителами + ферментсодержащие антигены. Таким образом выявляют антитела к Hbs-антигену (австралийский антиген - признак гепатита В);
- 3) стандартные антигены + материал от пациента с антителами + фиксированные на твердой поверхности ферментсодержащие антитела. Таким образом выявляют антитела к антигенам вирусов гепатитов В, D и Е;
- 4) фиксированный на твердой поверхности антиген + ферментсодержащие антитела + материал от пациента. Используется для выявления антител к вирусам гепатитов А, В, С.

Одностадийный "сэндвич-метод"

Это ускоренный вариант предыдущего анализа. В данном случае исследуемый материал и ферментсодержащие антитела добавляют на планшетку с фиксированными антителами одновременно. Это упрощает анализ и сокращает время его проведения.

Многослойный "сэндвич-метод"

Для проведения анализа используют планшетку с фиксированными антителами к антителам пациента (иммуноглобулинам), на которую добавляют материал от пациента. Ее выдерживают в определенных условиях и удаляют непрореагировавшие компоненты. Затем добавляют в ячейки планшетки стандартный антиген, а после соблюдения ряда условий реакции удаляют

непрореагировавшие компоненты. Далее добавляют в ячейки ферментсодержащие антитела. Это более сложный и длительный анализ, чем по методу «простого сэндвича».

Фиксированные на твердой поверхности антиантитела (антитела к иммуноглобулинам М) + материал от пациента с антителами + стандартный антиген + ферментсодержащие антитела. Таким образом выявляют антитела (иммуноглобулины М) к вирусам гепатитов А, В. Существуют и другие варианты твердофазного иммуноферментного анализа

Вопросы по теме:

1. Принцип метода ИФА.
2. Теоретические основы иммуноферментного анализа
3. Варианты постановки ИФА.
4. Методы усиления чувствительности метода (биотин-стрептавидиновая конъюгация).
5. Технология ELISPOT.
6. Иммуноблоттинг.
7. Экспресс-ИФА, тест-полоски для проведения экспресс-ИФА.
8. Автоматические ИФА-анализаторы
9. Диагностические наборы для ИФА, выпускаемые отечественными и зарубежными производителями.
10. Применение ИФА для диагностики инфекционных заболеваний.
11. Применение ИФА для определения содержания гормонов и онкомаркеров.

12. Применение ИФА для пренатальной диагностики пороков развития плода.
13. Иммуносенсоры
14. Лигандные технологии – иммуноэлектрофорез.
15. Сатурационный анализ, латекс-агглютинация.
16. Ферментный иммуносорбентный анализ.

2.Молекулярно-генетические методы. Методы анализа ДНК.

2.1 Молекулярно-генетические методы. Методы анализа ДНК.

Лабораторная работа № 1 "Выделение и анализ ДНК" .

Цель работы: знакомство с методами выделения ДНК, получение экспериментальных навыков для конструирования и анализа рекомбинантных ДНК.

Задачи:

знакомство с лабораторией молекулярной генетики и биотехнологии;
основные правила работы в лаборатории, техника безопасности;
выделение ДНК из цельной крови крупного рогатого скота.

Внимание!

Инструктаж по технике безопасности работы в лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии. Студенты без халатов не допускаются до лабораторных занятий!

Работы с генетическим материалом и при постановке ПЦР требуют специальных условий:

1. Все работы проводятся в перчатках, спецодежде (лабораторные халаты).
2. В лаборатории нельзя есть, пить, курить, разговаривать над открытыми пробирками.
3. До и после проведения работ необходимо тщательно вымыть руки.
4. Обо всех нестандартных ситуациях необходимо немедленно уведомить преподавателя.

Оборудование и материалы и реактивы

1. Центрифуга со скоростью вращения ротора 14000 об/мин "Eppendorf" с ротором для микропробирок 1,5 - 2,0 мл;
2. Термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65°C;
3. Микроцентрифуга-вортекс фирмы "DioSan";
4. Система видеодокументирования гелей;
5. Мерные стаканы и колбы, одноразовые пластиковые пробирки;
6. Пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
7. Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
8. Наконечники одноразовые вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
9. Наконечники одноразовые с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объемом 1-20 мкл;

10. Штативы для микропробирок на 0.2 мл
11. Штативы для микропробирок на 0.6 мл
12. Штативы для микропробирок на 1.5 мл
13. Перчатки одноразовые перчатки резиновые;
14. Холодильник с отделениями на 2-8°C и на (-18)-(-20)°C. ГОСТ 26678;
15. Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 2000 г. ГОСТ 24104;
16. Пинцеты медицинские ГОСТ 21241-89;
17. Ножницы медицинские;
18. Скальпели хирургические ГОСТ 21240;
19. Ступки фарфоровые с пестиком.
20. Набор для выделения ДНК из цельной крови, х100 фирмы "Медиген";

Правила работы с тест-системами и оборудованием

1. Все компоненты наборов реагентов в используемых концентрациях являются нетоксичными.
2. Работать с наборами следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.
3. При работе с наборами следует использовать только новые наконечники и пробирки.
4. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.
5. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.
6. Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.
7. Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
8. Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится выделение, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ.

Ход работы:

1. Выделяем ДНК из цельной крови строго следуя инструкции прилагаемой к набору фирмы "Медиген".

2. Маркируем пробирки.
3. Хранение в морозильной камере до следующей лабораторной работы

Вопросы по теме:

1. Основные направления и методы получения фрагментов ДНК.
2. Молекулярные конструкции на основе молекул нуклеиновых кислот.
3. Селективные маркеры и гены-репортеры.
4. Системы скрининга. Скрининг с помощью гибридизации.
5. Нерadioизотопные метки.
6. Радиоавтография.
7. Иммунологический скрининг.
8. Скрининг по активности белка.
9. Секвенирование ДНК.
10. Методы экстракции ДНК.
11. Современные модификации методов выделения ДНК: магнитный, стеклянные бусы.

Тема: 2.2.. Молекулярно-генетические методы. ДНК-полиморфизм

Лабораторная работа № 2 "Анализ полученных препаратов ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле"

Цель работы: знакомство с методами рестрикционного анализа ДНК, получение экспериментальных навыков для конструирования и анализа рекомбинантных ДНК.

Задачи: оценка качества полученного препарата с помощью электрофореза в геле агарозы.

Для оценки количества и качества ДНК, а также размеров молекул ДНК используют электрофорез в гелях агарозы (горизонтальный) или полиакриламидных гелях (вертикальный электрофорез). Молекулы ДНК визуализируются

интеркалирующими флуоресцентными красителями, например, бромистым этидием. Двухцепочечная ДНК эффективно связывает бромистый этидий и начинает ярко флуоресцировать при облучении ультрафиолетом

(УФ). Результаты электрофореза документируют в проходящем УФсвете с помощью цифровой фотокамеры или специальной системы для документирования гелей.

Оборудование и материалы и реактивы

1. Центрифуга со скоростью вращения ротора 14000 об/мин "Eppendorf" с ротором для микропробирок 1,5 - 2,0 мл;
2. Термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65°C;
3. Микроцентрифуга-вортекс фирмы "DioSan";
4. Система видеодокументирования гелей;
5. Оборудование для горизонтального ДНК гель-электрофореза;
6. Источник постоянного тока;
7. Камера с заливочным столиком;
8. Мерные стаканы и колбы, одноразовые пластиковые пробирки;
9. Пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
10. Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
11. Наконечники одноразовые вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
12. Наконечники одноразовые с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объемом 1-20 мкл;
13. Штативы для микропробирок на 0.2 мл
14. Штативы для микропробирок на 0.6 мл
15. Штативы для микропробирок на 1.5 мл
16. Перчатки одноразовые перчатки резиновые;
17. Холодильник с отделениями на 2-8°C и на (-18)-(-20)°C. ГОСТ 26678;
18. Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 2000 г. ГОСТ 24104;
19. Пинцеты медицинские ГОСТ 21241-89;
20. Ножницы медицинские;
21. Скальпели хирургические ГОСТ 21240;
22. Ступки фарфоровые с пестиком.
23. Буферы и реагенты для проведения агарозного электрофореза: ТВЕбуфер, агароза.

Ход работы:

1. Приготовить буфер ТАЕ (40 мМ Трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, рН 8,0) для электрофореза разведением стокового раствора ТАЕх50.
2. Приготовить 1 % гель агарозы на ТАЕ-буфере путем расплавления навески агарозы в микроволновой печи. После остывания до умеренно горячего состояния добавить бромистый этидий до 0,25 мкг/мл и залить гель в форму.
3. Нанести 1 и 2 мкл полученного препарата рядом с 1 мкл маркерной ДНК в лунки приготовленного 1 % геля агарозы. Образцы перед нанесением смешивают с 1 мкл буфера для нанесения и электрофорезным буфером так, чтобы наносимый объем составил 10–15 мкл, для равномерного распределения ДНК по толщине геля.
4. Провести электрофорез в течение 30 мин при напряжении 100 В.
5. С помощью системы видеодокументации получить фотографию геля в проходящем УФ-свете при длине волны 260 нм.
6. Идентифицировать полосы ДНК в препарате. Оценить суммарное количество ДНК во внесенной в гель пробе путем сопоставления интенсивности свечения полос полученного препарата с интенсивностью свечения стандартной ДНК. После этого пересчитать количество полученной ДНК на общий объем препарата.
7. Записать вывод о качестве и количестве полученного препарата ДНК.

Вопросы

1. На чем основано разделение макромолекул ДНК при агарозном гель- электрофорезе?
2. Как можно определить размер молекул ДНК?
3. С какой целью используют маркерную ДНК?
4. Виды электрофореза?
5. Ошибки при проведении электрофореза.

Тема 2.3. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Лабораторная работа № 3 "Качественное определение присутствия ГМО в продуктах питания методом ПЦР

Цель занятия: знакомство с постановкой определения генетически модифицированных организмов (ГМО), процедурами выделения ДНК из пищевых продуктов, проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализа продуктов ПЦР с помощью гельэлектрофореза.

Задача: определить присутствие генетически модифицированного растительного сырья в образцах пищевых продуктов.

Достижения современной биотехнологии позволили вывести новые сорта сельскохозяйственных культур с полезными свойствами: устойчивостью к вредителям и грибковым заражениям, повышенной пищевой ценностью, повышенной урожайностью, засухоустойчивостью и пр. с помощью генетических манипуляций, т. е. введением в геном растения генов, обеспечивающих соответствующий признак или модификацией существующий признак или модификацией существующих.

В обществе существуют как сторонники, так и противники генномодифицированных культур. Первые указывают на полезные свойства, которые позволяют интенсифицировать сельское хозяйство, избежать использования гербицидов, получать более высокие урожаи и т. п. Вторые опасаются проявлений аллергических реакций на такие продукты, снижения природного биоразнообразия, утечки трансгенов в дикую природу и других неопределенных отдаленных во времени последствий.

В настоящее время не обнаружено однозначных доказательств, что генетически модифицированные продукты способны принести вред человеку. Хотя выгода от применения ГМ-растений очевидна, существует много противников трансгенных растений, убежденных в их опасности и использующих в своих аргументах невозможность ученых дать полную гарантию безопасности подобных продуктов.

В каждой стране мира вопрос об использовании трансгенных растений решается по-разному местными законодателями. Примерно в 30 странах мира действует правило, согласно которому упаковка продуктов, при изготовлении которых использовались достижения генной инженерии, должна содержать информацию об этом, чтобы потребители самостоятельно делали свой выбор. Однако во многих случаях, например, когда соя используется при производстве мясных полуфабрикатов, производители не сообщают об этом покупателям. С 1 июня 2004 г. в Российской Федерации установлен новый допустимый порог наличия таких примесей – 0,9%, который требуется количественно точно детектировать и указывать на упаковке.

Примерно в 30 странах мира действует правило, согласно которому упаковка продуктов, при изготовлении которых использовались достижения генной инженерии, должна содержать информацию об этом, чтобы потребители самостоятельно делали свой выбор. Однако во многих случаях, например, когда соя используется при производстве мясных полуфабрикатов, производители не сообщают об этом покупателям.

Генетически модифицированные продукты абсолютно ничем не отличаются по внешнему виду от своих природных аналогов. Установить генетическую модификацию проще всего методами генетического анализа, а именно методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Если просто наличие ГМ-примесей (принцип да-нет) можно установить обычной ПЦР, то для количественной оценки примесей требуется более сложный метод ПЦР в реальном времени (real time PCR). Последний получает все более широкое распространение, поскольку законодательство требует количественной маркировки присутствия ГМ-примесей в пищевых продуктах.

ПЦР-анализ основан на поиске последовательностей, общих для большинства генномодифицированных организмов. При этом используют специфические праймеры, которые комплементарны характерным участкам в геноме ГМО. Дело в том, что генетики используют практически одни и те же регуляторные участки (промотор и терминатор транскрипции) для контроля экспрессии вставленного гена. Сущность метода выявления ГМО растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье растительного происхождения основана на использовании полимеразной цепной реакции с детекцией результатов амплификации после завершения реакции.

Для получения ГМ-растений используют, как правило, **35S промотор** вируса мозаики цветной капусты (CaMV), который присутствует во всех из-

вестных и выращиваемых в промышленных масштабах ГМО и ДНК **NOS**

терминатора T1 плазмиды почвенной бактерии

Agrobacterium tumefaciens,

который также присутствует во многих промышленно выращиваемых ГМ-растениях. В данной работе используются праймеры, комплементарные именно этим последовательностям. Размеры ДНК, которые при этом синтезируются, – 200 тыс. п.о. Чтобы проконтролировать, что экстрагированная из тестового образца ДНК содержит гены растительных белков, в работе предусмотрена контрольная ПЦР с «растительным» праймером к гену хлоропласта PSII. Размер синтезируемого при этом фрагмента – 455 тыс. п.о.

Правила работы с тест-системами и оборудованием

1. Все компоненты наборов реагентов в используемых концентрациях являются нетоксичными.

2. Работать с наборами следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.
3. При работе с наборами следует использовать только новые наконечники и пробирки.
4. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.
5. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.
6. Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.
7. Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
8. Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ.
9. Для предотвращения контаминации, этапы выделения ДНК и проведения ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

Оборудование и материалы и реактивы

1. Центрифуга со скоростью вращения ротора 14000 об/мин "Eppendorf" с ротором для микропробирок 1,5 - 2,0 мл;
2. Термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65°C;
3. Микроцентрифуга-вортекс фирмы "DioSan";
4. Система видеодокументирования гелей;
5. Оборудование для горизонтального ДНК гель-электрофореза;
6. Источник постоянного тока;
7. Камера с заливочным столиком;
8. Мерные стаканы и колбы, одноразовые пластиковые пробирки;
9. Пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
10. Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
11. Наконечники одноразовые вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;

12. Наконечники одноразовые с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объемом 1-20 мкл;
13. Штативы для микропробирок на 0.2 мл
14. Штативы для микропробирок на 0.6 мл
15. Штативы для микропробирок на 1.5 мл
16. Перчатки одноразовые перчатки резиновые;
17. Холодильник с отделениями на 2-8°C и на (-18)-(-20)°C. ГОСТ 26678;
18. Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 2000 г. ГОСТ 24104;
19. Пинцеты медицинские ГОСТ 21241-89;
20. Ножницы медицинские;
21. Скальпели хирургические ГОСТ 21240;
22. Ступки фарфоровые с пестиком.
23. Буферы и реагенты для проведения агарозного электрофореза: ТВЕбуфер, агароза.
24. Амплификатор "Био-Н".
25. Набор реактивов InstaGene [Matrix TM - Bio-Rad](#);
26. Краситель Orange G.

Хранение и подготовка образцов пищевых продуктов для анализа

Отбор проб проводят в соответствии с методическими документами, устанавливающими порядок отбора проб для однородных групп пищевой продукции: ГОСТ 5904-82, 9163-90, 12292-2000, 10852-86, 13979.0-86, 26313-84, 26312.1-84, 9792-73, 7631-85.

Отбор образцов продуктов

1. От партии сырья или сыпучих продуктов отбирают общую пробу следующим образом:
-от исследуемой партии сырья или сыпучих продуктов отбирают не менее 10 образцов проб (по 5-10 г.) в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет с использованием одноразовых хирургических перчаток и перемешивают, формируя общую пробу (50-100 г); -из общей пробы отбирают среднюю пробу массой 10-20 г, помещают в полиэтиленовый пакет, который, в свою очередь, помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, опечатывают и отправляют на анализ.
2. От партии продуктов плотной консистенции отбирают общую пробу массой 10-50 г. в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, используя одноразовые перчатки и фламбированные (выдержанные в

96% этаноле и обожженные в пламени газовой горелки) инструменты, который, в свою очередь, дополнительно помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, печатают и отправляют на анализ.

3. Пробы жидких продуктов отбирают в чистые емкости из стекла или пластика с герметично закрывающимися крышками объемом не более 50 мл, который, в свою очередь, дополнительно помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, печатают и отправляют на анализ.

Подготовка образцов продуктов к анализу

1. Для подготовки проб необходимо использовать одноразовые полипропиленовые пробирки, ступки и пестики, предварительно обработанные хромовой смесью и фламбированные инструменты - пинцеты, скальпели, ножницы.

2. Пробы сухих гранулированных и сыпучих продуктов отбирают в ступку по 5-10 г и растирают пестиком до гомогенного состояния. Для анализа необходимо 50 – 150 мкг образца.

3. Пробы плотных продуктов (сырых или подвергшихся кулинарной обработке) весом 5-10 г помещают в ступку, измельчают ножницами, затем

растирают пестиком до гомогенного состояния. Для анализа необходимо 50 – 150 мкг образца.

4. Пробы продуктов консистенции крахмала массой 100-300 мг помещают в одноразовые пластиковые пробирки и добавляют 1,0 мл физиологического раствора. Для анализа необходимо 50 – 150 мкл образца.

5. Пробы жидкой консистенции отбирают автоматическими пипетками с

одноразовыми наконечниками в одноразовые пробирки из полипропилена.

Для анализа необходимо 50 - 150 мкл образца.

Хранение и транспортирование проб

1. Образцы сырья и продуктов рекомендуется хранить в течение 1 месяца (при необходимости повторного анализа) согласно условиям, указанным производителем продукта питания.

2. Образцы скоропортящихся продуктов рекомендуется хранить в замороженном состоянии (при температуре минус 20оС) в течение 1 месяца

(при необходимости повторного анализа).

3. Транспортирование образцов осуществляют при температуре, рекомендованной для хранения сырья или пищевого продукта. Длительность транспортирования не должна превышать сроков годности продукта.

Ход работы

1. Подписать две 1,5 мл микропробирки «non-ГМО» и «тест».
2. Отобрать 0,5–2,0 г «non-ГМО» образца, перенести в ступку, добавить по 5 мл дистиллированной воды на каждый грамм образца.
3. Растереть образец пестиком в течение 2 мин до получения однородной массы.
4. Добавить еще 5 объемов воды и снова растереть массу пестиком.
5. В пробирку «non-ГМО» внести 500 мкл InstaGene™ matrix и 50 мкл полученной после растирания массы, закрыть пробирку.
6. Повторить п. 2–4 для приготовления тестового образца.
7. В пробирку «тест» внести 500 мкл InstaGene™ matrix и 50 мкл полученной после растирания тестового образца массы, закрыть пробирку.
8. Тщательно перемешать пробирки на шейкере и поместить в водяную баню на 95 °С на 5 мин.
9. Поместить пробирки в центрифугу и центрифугировать в течение 5 мин на максимальной скорости. Супернатант содержит ДНК-экстракт.
10. Пронумеровать пробирки для ПЦР 1–6. Содержимое каждой пробирки указано в табл. 2.1.

Таблица 2.1

№	Смесь реагентов для ПЦР Master mix	ДНК
1	20 мкл растительной Мм (зеленая)	20 мкл, «non-ГМО» образец
2	20 мкл ГМО Мм (красная) 20 мкл	«non-ГМО» образец
3	20 мкл растительной Мм (зеленая)	20 мкл, «тест» образец
4	20 мкл ГМО Мм (красная) 20 мкл	«тест» образец
5	20 мкл растительной Мм (зеленая)	20 мкл, «+ГМО» образец
6	20 мкл ГМО Мм (красная) 20 мкл	20 мкл, «+ГМО» образец

11. Поместить все пробирки на лед.
12. В каждую пробирку поместить по 20 мкл соответствующей смеси Master mix, каждый раз используя свежий наконечник.

13. Соответственно надписи внести в пробирки образцы ДНК из п. 9 (Осторожно! Нас интересует только супернатант!) и перемешать тщательно пипетированием.

14. Включить термоциклер по заданной программе (табл. 2.2), после нагрева термоблока до температуры денатурации поставить прибор на паузу и быстро поместить в него пробирки.

Таблица 2.2

Шаг	Функция	Температура	Длительность	Число циклов
Начальная денатурация	Денатурация	94 °С	2 мин	1
Амплификация	Денатурация	94 °С	1 мин	40
	Отжиг	59 °С	1 мин	
	Синтез	72 °С	2 мин	
Завершающий синтез	Синтез (элонгация цепи)	72 °С	10 мин	
Хранение	Хранение	4 °С	неопределенное	1

Анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза

Ход работы:

1. Приготовить 1 % гель агарозы и аппарат для гель-электрофореза согласно протоколу из лабораторной работы № 2.
2. Гель приготовить без бромистого этидия.
2. Пробирки после ПЦР отцентрифугировать (пульс-режим).
3. В каждую пробирку внести по 10 мкл раствора красителя Orange G, тщательно перемешать на вортексе.
4. В лунки геля поместить по 20 мкл образцов в следующем порядке (табл. 2.3):

Таблица 2.3

Номер лунки	Образец
-------------	---------

1	«non-ГМО» образец, растительный праймер
2	«non-ГМО» образец, ГМО праймер
3	«тест» образец, растительный праймер
4	«тест» образец, ГМО праймер
5	«+ГМО» образец, растительный праймер
6	«+ГМО» образец ГМО праймер
7	набор стандартов мол. массы 100 bp

5. Провести электрофорез на агарозном геле в течение 30 мин при напряжении 100 В.

6. Зафиксировать результат на системе видеодокументации и проанализировать полученные результаты. Заполнить табл. 2.4.

Таблица 2.4

Номер полосы	Нанесённый образец	Наличие полос	Размер фрагментов
1	«non-ГМО» образец, растительный праймер		
2	«non-ГМО» образец, ГМО праймер		
3	«тест» образец, растительный праймер		
4	«тест» образец, ГМО праймер		
5	«+ГМО» образец, растительный праймер		
6	«+ГМО» образец ГМО праймер		
7	набор стандартов мол. массы 100 bp		

Вопросы

1. Какие из молекул, содержащихся в клетке, могут повлиять на выделение ДНК?
2. На каких принципах основан метод ПЦР?
3. Зачем нужны праймеры и как выбрать их последовательность?
4. Что такое ГМО? Как вы относитесь к проблеме их распространения?
5. Возможно ли создание единой методики ПЦР с одинаковыми праймерами для определения всех видов ГМО?
5. Какие экспериментальные условия надо соблюдать при постановке ПЦР? С чем это связано?

6. Что такое Таг-полимераза? Что должно находиться в реакционной смеси для ее эффективной работы?
7. Как происходит разделение ДНК-фрагментов во время электрофореза?

Тема 2.4. ДНК-технологии в анализе генов, связанных с продуктивностью животных

Лабораторная работа № 4 "Рестрикционный анализ полученного препарата ДНК" (2 ч)

Цель работы: знакомство с методами рестрикционного анализа ДНК, получение экспериментальных навыков для конструирования и анализа рекомбинантных ДНК.

Задачи: рестрикционный анализ выделенной ранее ДНК, определение размеров рестрикционных фрагментов ДНК.

Рестриктазы, или, более корректно, рестрикционные эндонуклеазы, являются важнейшими инструментами создания рекомбинантных ДНК и физического картирования ДНК-молекул. Рестриктазы расщепляют двухцепочечную ДНК внутри молекулы. При этом каждая рестриктаза узнаёт определённый участок ДНК длиной от четырёх пар нуклеотидов (сайт узнавания) и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне его (сайт расщепления).

Наиболее широкое применение в генной инженерии нашли высокоспецифичные рестриктазы, узнающие палиндромные последовательности ДНК и расщепляющие ДНК-молекулу внутри сайта узнавания. При этом могут образовываться концы цепей трех структурных типов. Если разрыв происходит посередине сайта рестрикции, то образуются фрагменты с полностью спаренными ("тупыми") концами. Когда расщепление ДНК происходит в стороне от середины сайта, образуются выступающие одонитевые концы, получившие название "липких", т. е. способных "слипаться" с комплементарным концом, образующимся в противоположной цепи в результате ее разрыва. Число нуклеотидов в одонитевом концевом участке может варьировать от одного до пяти.

Молекулы ДНК из разных источников, обработанные одной и той же высокоспецифичной рестриктазой, расщепляющей палиндромные последовательности, будут иметь одинаковые гибридизирующиеся между

собой липкие концы. Наличие таких липких концов у фрагментов ДНК существенно облегчает их ковалентное сшивание специальным ферментом ДНК-лигазой (лигирование) в рекомбинантную молекулу.

Поскольку рестриктазы узнают специфические последовательности в молекуле ДНК, становится возможным физически определить месторасположение таких последовательностей, обрабатывая ДНК соответствующими рестриктазами. Физическую карту молекулы ДНК по рестрикционным сайтам можно составить, анализируя длины фрагментов ДНК после расщепления различными рестриктазами.

Оборудование и материалы и реактивы

1. Центрифуга со скоростью вращения ротора 14000 об/мин "Erppendorf" с ротором для микропробирок 1,5 - 2,0 мл;
2. Термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65°C;
3. Микроцентрифуга-вортекс фирмы "DioSan";
4. Система видеодокументирования гелей;
5. Оборудование для горизонтального ДНК гель-электрофореза;
6. Источник постоянного тока;
7. Камера с заливочным столиком;
8. Мерные стаканы и колбы, одноразовые пластиковые пробирки;
9. Пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
10. Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
11. Наконечники одноразовые вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
12. Наконечники одноразовые с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объемом 1-20 мкл;
13. Штативы для микропробирок на 0.2 мл
14. Штативы для микропробирок на 0.6 мл
15. Штативы для микропробирок на 1.5 мл
16. Перчатки одноразовые перчатки резиновые;
17. Холодильник с отделениями на 2-8°C и на (-18)-(-20)°C. ГОСТ 26678;
18. Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 2000 г. ГОСТ 24104;
19. Пинцеты медицинские ГОСТ 21241-89;
20. Ножницы медицинские;
21. Скальпели хирургические ГОСТ 21240;

22. Ступки фарфоровые с пестиком.
23. Рестриктазы ("Медиген")
24. Буферы и реагенты для проведения агарозного электрофореза: TBEбуфер, агароза.

Ход работы:

1. Выбрать рестриктазы для проведения расщепления полученного препарата ДНК в двух вариантах реакции гидролиза двумя рестриктазами одновременно.
2. Для каждого из вариантов из каталога фирмы-поставщика (Сибэнзим, Медиген) выбрать состав реакционной смеси, в которой одновременно активны обе из используемых рестриктаз.
3. По данным определения содержания ДНК в полученном препарате выбрать объемы пробы для рестрикционного анализа. Определить необходимое количество единиц активности рестриктазы для полного гидролиза полученного препарата за 30 мин и в соответствии с этим добавляемый объем фермента. Записать состав реакционной смеси.
4. Собрать реакции в двух вариантах и инкубировать 30 мин при оптимальной температуре расщепления для конкретных ферментов. В качестве отрицательного контроля ставится проба ДНК без добавления ферментов – всего 3 микропробирки.
5. Провести электрофорез гидролизованных образцов в 1 % геле агарозы вместе с маркерными ДНК.
6. Оценить полноту расщепления пробы и размер полученных рестрикционных фрагментов. Сопоставить полученный размер с ожидаемым. Записать выводы.

Вопросы

1. Каково происхождение рестрикционных эндонуклеаз (рестриктаз)?
2. Каково значение открытия рестриктаз для развития методов клонирования и физического картирования ДНК?
3. Почему рестриктазы I и III типа практически не используются в генной инженерии?
4. Физическое картирование.
5. Сколько всего известно рестриктаз и сколько используется в генной инженерии?

Тема 2.5. Методы ДНК-диагностики. Идентификация мутаций.

Лабораторная работа № 5 " Определение однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) TNF α методом ПЦР. Электрофоретическая детекция»

Оборудование и материалы и реактивы

1. Центрифуга со скоростью вращения ротора 14000 об/мин "Erpendorf" с ротором для микропробирок 1,5 - 2,0 мл;
2. Термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65°C;
3. Микроцентрифуга-вортекс фирмы "DioSan";
4. Система видеодокументирования гелей;
5. Оборудование для горизонтального ДНК гель-электрофореза;
6. Источник постоянного тока;
7. Камера с заливочным столиком;
8. Мерные стаканы и колбы, одноразовые пластиковые пробирки;
9. Пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
10. Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом
0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
11. Наконечники одноразовые вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл;
100-1000 мкл;
12. Наконечники одноразовые с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объёмом 1-20 мкл;
13. Штативы для микропробирок на 0.2 мл
14. Штативы для микропробирок на 0.6 мл
15. Штативы для микропробирок на 1.5 мл
16. Перчатки одноразовые перчатки резиновые;
17. Холодильник с отделениями на 2-8°C и на (-18)-(-20)°C. ГОСТ 26678;
18. Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 2000 г. ГОСТ 24104;
19. Амплификатор
23. Буферы и реагенты для проведения агарозного электрофореза: TBE-буфер, агароза.

Ход работы:

1. ДНК из венозной крови выделить стандартным методом фенольнопротеолитической экстракции.
2. Фрагмент гена TNF- α крупного рогатого скота исследовать с применением
Метода ПЦР-ПДРФ с использованием прямого праймера
5'CCGAGAAATGGGACAACCT-3' и обратного праймера
5'GCCATGTATCCCCAAAGAAT-3'.

3. ПЦР проводить на амплификаторе в течение 35 циклов при температуре Отжига 60°C.
4. Реакция в ПЦР в SE буфере G.
5. Продукт ПЦР оценивать в вертикальном электрофорезе в 4% ПААГ, Окрашенном бромистым этидием.
6. В продукт амплификации внести эндонуклеазу рестрикции EcoICRi (СибЭнзим, Россия),
7. Оценка в 4% ПААГ, окрашенном бромистым этидием.
8. Определение однонуклеотидного полиморфизма 1703C/T проводить методом аллель-специфической ПЦР в SE буфере G с использованием Праймеров 5'-1872-GGCTGCCAGATCGTGCCTGC-3'-общий, по нижней Цепи 5'-1686-TCCGAGCCCCGCCTTCTGT-3'- для дикого типа, по верхней Цепи 5'-1686-TCCGAGCCCCGCCTTCTAC-3'- для мутантного типа
9. Аллель-специфическую ПЦР проводить в течение 35 циклов при температуре отжига 60°C.
10. Продукт ПЦР оценивать в вертикальном электрофорезе в 4% ПААГ, Окрашенном бромистым этидием.

Вопросы по теме

1. Применение блот-гибридизации для изучения болезней человека и животных.
2. Саузерн-блоттинг.
3. Нозерн- и вестернблоттинг.
4. Выявление аллелей бета-глобинового гена методом гибридизации с синтетическими олигонуклеотидами.
5. Геномная дактилоскопия (днк-фингерпринт).
6. Метод «ДНК-отпечатков».
7. Метод ДНК-чипов в идентификации однонуклеотидных полиморфизмов.
8. Ведущие компании, разрабатывающие технологии микроэррей:

Affimetrix, Illumina, Bovigen, институт им. Энгельгарта.

8. Ведущие методы детекции мутаций.

Тема 2.6. Проточная цитометрия.

Проточная цитометрия -- метод исследования дисперсных сред в режиме поштучного анализа элементов дисперсной фазы по сигналам светорассеяния и флуоресценции. Название метода связано с основным применением, а именно, с исследованием одиночных биологических клеток в потоке.

Основа метода заключается в:

- 1) использовании системы гидрофокусировки, которая обеспечивает прохождение клеток в потоке поодиночке;
- 2) облучении клетки лазерным излучением;
- 3) регистрации сигналов светорассеяния и флуоресценции от каждой клетки.

Кроме того, в ходе анализа учитывается уровень флуоресценции химических соединений, входящих в состав клетки (аутофлуоресценция) или внесённых в образец перед проведением проточной цитометрии.

За образцы берут кровь, костный мозг, ликвор, суставная жидкость, плевральная жидкость, асцитическая жидкость, суспензированные клетки тканей (например, опухолей).

2. Принцип метода

Принцип метода проточной цитометрии основан на регистрации флуоресценции и светорассеяния от каждой отдельно взятой клетки в клеточной суспензии. Суспензия клеток под давлением подается в проточную ячейку, где за счет разности давлений между образцом и обтекающей жидкостью клетки, находясь в ламинарном потоке жидкости, выстраиваются в цепочку друг за другом (т.н. гидродинамическое фокусирование).

Клетки одна за другой проходят через лазерный луч, а высокочувствительные детекторы, расположенные вокруг проточной ячейки регистрируют флуоресценцию и рассеянное лазерное излучение каждой клетки. Полученный сигнал передается в компьютер, обрабатывается, и полученные данные отображаются в виде различных графиков и гистограмм.

Параметры, клеток регистрируемые при помощи проточного цитометра

Прямое (малоугловое) светорассеяние - forwardscatter.

Детектор прямого светорассеяния располагается по ходу лазерного луча за проточной ячейкой и регистрирует излучение разера,

которое рассеивается под углами 2-19 градусов. Интенсивность рассеянного под малым углом света пропорциональна размеру клетки. Более крупные клетки рассеивают свет сильнее мелких.

Боковое светорассеяние - sidescatter.

Внутреннее содержимое клеток оптически неоднородно. Луч лазера, проходя сквозь клетку, многократно преломляется и рассеивается во все стороны. Регистрация этого излучения позволяет судить о сложности внутреннего строения клетки (соотношение ядроплазма, наличие гранул, других внутриклеточных включений). Комбинация бокового и прямого светорассеяния позволяет судить о морфологии клетки в целом, выделять различные популяции клеток (лимфоциты, моноциты, гранулоциты) для дальнейшего анализа.

Рис. 3

Система для регистрации свечения флюоресцентных меток состоит из комплекса светофильтров и фотоумножителей, каждый из которых регистрирует излучение в диапазоне длин волн, соответствующих флуорохрому. Выбор типа и количества флуоресцентных красителей определяется поставленной задачей для данного исследования. Основными типами таких красителей являются моноклональные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой (FITC, PE, APC, PerCP и др.) для определения мембранных и цитоплазматических антигенов клетки, красители, позволяющие оценить жизнеспособность клеток (7AAD, PI) флуорофоры, связывающиеся с нуклеиновыми кислотами (DAPI, Hoechst), pHчувствительные флуорофоры (Fluo-3), ион-зависимые флуорофоры (Indo-1).

Полученные данные обрабатываются компьютером и отображаются в виде одномерных гистограмм или двух- и трехмерных точечных или плотностных графиков. Анализ данных позволяет определить количество клеток, отвечающих тем или иным условиям, оценить интенсивность флуоресценции (т.е. плотность того или иного маркера на поверхности клетки). В некоторых случаях при помощи проточного цитометра можно определить абсолютное число клеток в исследуемом образце. Рис. 5

Сортировка клеток.

В проточном цитометре, оборудованном системой для сортировке клеток, проточная ячейка закреплена на пьезокристалле. При подаче на него напряжения кристалл вместе с ячейкой совершает колебания с заданой частотой, в результате чего струя жидкости с клетками разбивается на отдельные капли. Проходя сквозь заряжающее кольцо, капля может приобретать положительный или отрицательный заряд в зависимости от того, какая клетка содержится внутри капли. Пролетая

мимо отклоняющих пластин капля с клеткой притягивается к ним, выходит из основного потока и попадает в пробирку.

Преимуществами сортировки клеток на проточном цитометре является высокая чистота получаемой популяции клеток (до 99.9% позитивных клеток в отсортированной фракции), возможность сортировать клетки по любым комбинациям детектируемых параметров. Данный метод позволяет отсортировывать любое количество клеток, вплоть до единичных клеток, что является незаменимым в технологиях связанных с клонированием. Проходя через системы прибора клетки подвергаются некоторым неблагоприятным воздействиям (лазерное излучение, перепады давления) что несколько снижает процент жизнеспособных клеток на выходе по сравнению с исходным материалом. Также при сортировке на проточном цитометре бывает затруднительным соблюдение абсолютной стерильности, что ограничивает применение данного метода в клинической практике.

Некоторые, термины, часто используемые в проточной цитометрии. цитометрия гейтирование клетка флуоресценция Компенсация.

Настройка прибора для исключения паразитного свечения флюорохрома в соседних каналах. Характеристики установленных на проточном цитометре светофильтров таковы, что их область пропускания соответствует максимуму спектра испускания флуорофора. Но за счет того, что спектр испускания флуорофора может быть достаточно широким, часть его излучения может проходить сквозь другие светофильтры, настроенные на регистрацию излучения другого флуорофора. То есть к примеру некоторая доля излучения от красителя FITC будет регистрироваться в канале, предназначенном для фикоэритрина, искажая результаты измерения. Для исключения данного эффекта необходимо уменьшать сигнал с детектора пропорционально сигналу с соседнего детектора, компенсируя таким образом паразитное свечение соседних флуорохромов. Величина компенсации зависит от многих параметров: напряжения на фотоумножителе и как следствие его чувствительности, спектра используемых флуорохромов, производителя реактивов (меченые антитела от разных производителей имеют разное соотношение белок/флуорофора, соответственно одни и те же образцы окрашенные различными антителами будет давать сигналы разной интенсивности).

Дискриминатор.

Функция, благодаря которой не регистрируются события, не удовлетворяющие какому-либо условию. Чаще всего данная функция используется для того чтобы не регистрировать объекты имеющие маленький размер, то есть исключить из анализа частицы разрушенных клеток, тромбоциты, другие мелкие посторонние объекты. Благодаря

использованию дискриминатора уменьшается нагрузка на компьютер прибора, повышается его быстродействие, уменьшается размер записываемых файлов, что облегчает последующий анализ данных. Дискриминатор должен быть настроен таким образом, чтобы отсекал большую часть дебриса, но при этом не захватывать область, содержащую интересные для исследователя события.

Пробоподготовка образцов.

В качестве образцов для исследования на проточном цитометре могут использоваться различные суспензии клеток и биологические жидкости. Для проведения исследования на проточном цитометре необходимо минимизировать количество частиц в исследуемой суспензии, которые могут затруднить анализ. Чаще всего такими частицами являются эритроциты в образцах крови или костного мозга, тогда как объектом исследования выступают лейкоциты. Получение лейкоцитарной суспензии возможно несколькими способами. В первую очередь можно лизировать эритроциты каким-либо химическим агентом, разрушающим мембрану эритроцита (наиболее распространенным является 0,9% раствор хлорида аммония). Вторым распространенным способом получения лейкоцитарной суспензии является центрифугирование в градиенте плотности (например выделение моноклеарной фракции из крови при помощи центрифугирования на фиколе).

Неспецифическое связывание антител.

На точечной диаграмме неспецифическое связывание выглядит в виде “хвоста”, тянущегося от двойной негативной популяции под углом 45 градусов в верхний правый угол. Неспецифическое связывание характерно для образцов с большим содержанием погибших клеток, а также для клеток, имеющих на поверхности Fc-рецептор (в основном, клетки, способные к фагоцитозу). Для борьбы с данным феноменом следует перед окрашиванием антителами обрабатывать клетки специальными реагентами для блокировки Fc-рецептора, проводить подготовку образцов таким образом, чтобы минимизировать гибель и разрушение клеток в процессе пробоподготовки. Также при анализе полученных данных нужно стараться чтобы в регион анализа попадало как можно меньше погибших клеток и дебриса.

Логическое гейтирование.

Основной метод анализа цитометрических данных заключается в выделении какой-либо популяции клеток, и дальнейшего анализа событий, относящихся только к интересующей популяции. Гейтирование может производиться по любым регистрируемым параметрам и с использованием любых логических операторов и их комбинаций (И, ИЛИ, НЕ). На представленном примере сперва производится гейтирование по CD45 позитивным событиям выделение

лейкоцитарной популяции и отсева дроба. Следующим шагом идет выделение лимфоцитарной популяции по параметрам прямого и бокового светорассеяния. И уже после двойного гейтирования по CD45 и лимфоцитарному региону происходит заключительный этап анализа - определение процентного содержания субпопуляций лимфоцитов.

.Преимущества

- Короткое время анализа за счет высокой скорости (до 100 000 событий в секунду),
- анализ большого количества клеток (до 108 клеток в мл),
- определение субпопуляций клеток,
- измерение параметров редко встречающихся клеток, □ объективное измерение интенсивности флуоресценции.

Применение □ Иммунология:

- иммунофенотипирование клеток периферической крови,
- определение фагоцитарной активности (захват меченных флюорохромами бактерий или дрожжей),
- определение внутриклеточных цитокинов (спонтанная продукция и под действием различных специфических или неспецифических активаторов, таких как ФМА + иономицин, ЛПС, ФНО-альфа), □ определение внутриклеточных белков, например транскрипционных факторов GATA-3, T-bet, FoxP3 для дискриминации CD4 Тлимфоцитов,
- определение пролиферативной активности (выявление инкорпорированного бромдезоксифуридина),
- исследование клеточного цикла, □ оценка клеточной цитотоксичности.
- Онкология:
- количественный анализ внутриклеточных компонентов (ДНК),
- анализ стадий клеточного цикла,
- выявление анеуплоидного клона,
- определение пролиферативной активности анеуплоидного клона,
- определение специфических маркеров,
- позволяет проводить наблюдение пациентов, входящих в группу риска,
- оценка состояния иммунной системы,
- оценка клеточного звена иммунитета (определение субпопуляций лимфоцитов),
- оценка функциональной состоятельности иммунокомпетентных клеток (NK тест, фагоцитарный тест и т. п.).

Цитология:

- определение цитоморфологической принадлежности клетки размер, соотношение ядро/цитоплазма, степень асимметричности и гранулярности клеток,
- оценка активности внутриклеточных ферментов с помощью флуорогенных субстратов,
- определение экспрессии поверхностных антигенов,
- анализ стадий клеточного цикла,
- измерение физиологических параметров клетки (внутриклеточный рН, концентрация свободных ионов Ca^{2+} , потенциал наружной клеточной мембраны).

Гематология:

- анализ субпопуляционного состава клеток периферической крови,
- подсчет ретикулоцитов, анализ тромбоцитов по специфическим маркерам,
- дифференциальная диагностика лимфопролиферативных заболеваний и реактивных лимфоцитозов,
- диагностика лимфопролиферативных заболеваний,
- диагностика острых лейкозов,
- оценка минимальной резидуальной болезни.

Фармакология:

- измерение экспрессии маркеров,
- измерение активности внутриклеточных ферментов,
- определений стадий клеточного цикла в рамках изучения механизмов воздействия различных биологически активных веществ на клеточном уровне.

Растениеводство / Сельское хозяйство:

- определение плоидности клеток,
- анализ клеточного цикла,
- анализ и сортировка протопластов.

В настоящее время проточная цитометрия применяется для выявления определённых клеток в исследуемых образцах (как бактериальных и грибковых, так и собственных клеток организма человека), определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, а также мониторингирования состояния вирусного процесса у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Выявление бактериальных, грибковых, а также собственных клеток организма в биологических жидкостях крайне важно для диагностики многих заболеваний. В ходе одного из исследований было показано, что проточная цитометрия обладает в 100--1000 раз более высокой чувствительностью по сравнению с микроскопией и позволяет выявлять бактериальные клетки в количестве 10-100 в 1 мл крови. При более низкой концентрации бактерий в образце возможно проведение предварительной инкубации. Высокую чувствительность методу

придает использование моноклональных антител, помеченных флуоресцирующим веществом.

Проточная цитометрия позволяет не только выявлять инфицирование микроорганизмами, но и определять спектр их чувствительности, причём, длительность исследования не превышает нескольких часов. Подвергнутые воздействию антибиотиков (*invivo* или *invitro*) микроорганизмы сравнивают с контрольными образцами того же штамма для установления их жизнеспособности, а также изменений в нуклеиновых кислотах, белках, оболочке клеток и т. п., что позволяет оценить как степень эффекта антибиотика, так и точку приложения его действия.

Ещё одной областью применения проточной цитометрии является мониторинг состояния вирусного процесса у ВИЧ-инфицированных лиц путём определения абсолютного количества CD4⁺ клеток и их доли в популяции лимфоцитов (отношение CD4⁺/CD8⁺). Методика может также использоваться для контроля эффективности проводимой терапии.

Список вопросов:

1. Принцип метода проточной цитометрии.
2. Теоретические основы метода проточной цитометрии.
3. Принципиальное устройство проточного цитофлюориметра.
4. Варианты постановки метода, применение различных флуоресцентных меток (маркеров), конъюгатов антител и др.
5. Автоматические проточные цитофлюориметры.
6. Ошибки, возникающие на различных этапах постановки метода.
7. Области применения проточной цитометрии.
8. Фенотипирование клеток методом проточной цитометрии. Значение для науки и практики.
9. Автоматические системы (анализаторы): биохимические, гематологические, мочи, ионного состава, лекарственных веществ и наркотических средств.

Тема.3. Математические методы в зоотехнии и биологии.

За последние годы биологические науки, включая и зоотехнические, достигли значительных успехов. И немалая заслуга в том принадлежит математике.

Немецкий философ Иммануил Кант писал: «Я утверждаю, что во всяком естественнонаучном знании можно найти лишь столько действительной науки, сколько в ней можно найти математики». Широкое внедрение математических методов в биологию началось с конца 19-го века, когда английский ученый Фрэнсис Гальтон в 1899 году разработал основы новой науки, названной им биометрией (от греч. *bios* – жизнь, *metreo* – измеряю) – науки об использовании математических методов для изучения живых существ.

Задача биометрии – планирование биологических экспериментов и обработка результатов методами математической статистики.

Необходимость использования математического анализа в биологии была связана с переходом от описательных методов к экспериментальным. А эксперимент (опыт) требует количественной оценки результатов, доказательства их достоверности. Основные цели математического анализа опытных данных: выразить в сжатой, лаконичной форме накопленный цифровой материал, провести оценку достоверности полученных результатов исследований, сделать объективные выводы из проделанной работы.

Объектом математического анализа является изменяющийся (варьирующий) признак, то есть тот показатель, который изменяется под действием изучаемого в опыте фактора. Самым главным из этих признаков является продуктивность животных.

С помощью математического анализа в опытной работе решают следующие основные задачи:

определяют объем опыта, то есть устанавливают оптимальную численность животных в подопытных группах;

определяют средние значения изучаемых признаков с помощью средней арифметической, средней взвешенной, средней гармонической и др.; устанавливают степень изменчивости изучаемых признаков с помощью лимитов, среднего квадратического отклонения, коэффициента вариации, нормированного отклонения; определяют достоверность полученных данных с помощью критерия достоверности; определяют долю влияния изучаемых факторов на изменчивость признака путем дисперсионного анализа; устанавливают направления и степень связи между признаками с помощью коэффициентов корреляции и регрессии.

Однако надо иметь в виду, что математические методы имеют в опытной работе вспомогательное значение. Они лишь помогают выявить то, что содержится в эксперименте. Никакая математическая обработка не поможет, если допущены методические просчеты в

постановке опытов. Главными для исследователя являются биологические методы, вскрывающие суть жизненных процессов. Не случайно Д.И. Менделеев весьма скептически относился к так называемым математическим методам исследования, когда математикам кажется, что они способны решить любые задачи, тогда как на деле они не могут поставить эксперимент в подтверждение или опровержение своей теории.

Определение средних значений изучаемого признака.

Как уже отмечалось, зоотехнические опыты являются сравнительными. В них сравнивают между собой группы и периоды, то есть средние величины изучаемых признаков. В зависимости от цели исследования определяют несколько средних величин: среднюю арифметическую, взвешенную среднюю арифметическую, среднюю гармоническую и др. Средняя арифметическая – наиболее характерное значение признака для данной совокупности (группы), ее математический центр тяжести. Для больших выборок, когда число особей более 30, раньше применяли непрямой способ вычисления средней арифметической. Для этого предварительно строили вариационные ряды. При использовании компьютеров необходимость в этом отпала. Основные свойства средней арифметической:

она характеризует совокупность (группу) в целом, а не отдельных ее членов; средняя арифметическая величина абстрактная, то есть может не совпадать ни с одной вариантой и иметь дробную величину. Например, в группе на свиноматку за год получено 1,7 опороса. Но ведь от каждой свиноматки можно получить или один, или два опороса за год; среднюю арифметическую применяют для характеристики однородной совокупности. Например, среднюю живую массу определяют по отдельным половозрастным группам.

Взвешенная средняя арифметическая определяется, когда разный математический вес признака. Например, требуется определить среднее содержание переваримого протеина в 1 кг смеси, состоящей из 70 кг ячменя и 30 кг гороха, если в 1 кг ячменя содержится 75 г переваримого протеина, а в 1 кг гороха – 210 г. Чтобы рассчитать взвешенную среднюю арифметическую, каждое значение признака умножают на его вес, все эти произведения суммируют и полученный результат делят на сумму весов. Взвешенную среднюю применяют в зоотехнии часто, например, при определении процента жира молока за лактацию.

Средняя гармоническая (H) – применяется для вычисления среднего уровня признака, характеризующего скорость какого-либо процесса (средняя скорость молокоотдачи, скорость бега, скорость яйцеобразования). Например, требуется определить среднюю скорость молокоотдачи у коровы, если за 4 минуты выдоено 8 кг молока, в том

числе: за первую минуту –2 кг, за вторую –3, за третью –2 и за четвертую –1 кг.

Показатели изменчивости.

Средняя арифметическая –основной математический показатель, по которому судят о полученных результатах исследований. Однако средняя арифметическая не отражает изменчивость признаков, тогда как животные –объект зоотехнических исследований обладают большой изменчивостью признаков, особенно количественных. Это связано с многообразием внешних факторов, действующих на организм, а также с генетической особенностью каждой особи.

Основными показателями изменчивости (вариации) являются лимиты, среднее квадратическое отклонение, коэффициент вариации, нормированное отклонение.

Лимит ($\lim = x_{\max} - x_{\min}$) –это разница между максимальным и минимальным значением признака в выборочной совокупности. Это наиболее простой показатель изменчивости признака. Чем больше величина лимита, тем значительнее изменчивость признака. Среднее квадратическое отклонение (δ –сигма) основной показатель изменчивости. Определение достоверности опытных данных

. Зоотехнические опыты проводят на ограниченном количестве животных. Следовательно, подопытные группы, по сути, являются выборками. Выборками являются и образцы кормов, взятые для анализа, пробы крови и т.д. Возникает вопрос, можно ли результаты опытов, полученные на небольшом числе животных (выборках) распространить на всю генеральную совокупность, то есть на наиболее многочисленную группу особей. Для этого необходимо определить достоверность.

Достоверность –это свойства выборочной совокупности правильно, с заданной надежностью отражать свойства генеральной совокупности. Если разница достоверна, это значит, что разница в выборочных показателях соответствует разнице между соответствующими параметрами генеральной совокупности. Основной вывод исследования можно распространить на генеральную совокупность. А если разница недостоверна? Иногда считают, что в этом случае нет разницы и между генеральными параметрами. Это неправильно. В этом случае достоверность между генеральными параметрами не доказана. Возможно, при проведении опытов на большем числе животных, а также при меньшей изменчивости признака разность может оказаться достоверной.

Достоверность тесно связана с понятием вероятности (P), которая измеряется от 0 до 1. По мере приближения к 1 достоверность повышается. В биологии принято три уровня вероятности, или надежности безошибочных прогнозов (0,95; 0,99 и 0,999). Например, уровень вероятности 0,95 указывает на то, что из 100 повторений в 95

будут получены ожидаемые результаты, или вероятность составляет 95 %. В литературе встречается и понятие уровень значимости (P) – это вероятность появления случайного отклонения, или уровень риска. Так, уровням вероятности 0,95; 0,99 и 0,999 соответствуют уровни значимости 0,05; 0,01 и 0,001, которые означают, что в силу случайности отклонение возможно в 5; 1 и 0,1 % случаев соответственно. Факторы определяющие достоверность: объем выборки, изменчивость признака и величина разности. Чем больше животных в группе, то есть чем ближе выборочная совокупность приближается к генеральной, тем выше повышается достоверность разницы. Не менее важным фактором, влияющим на достоверность, является изменчивость. Чем больше разнообразие признака, тем менее достоверной становится разность. Особенно важно обеспечить минимальную изменчивость признаков при формировании подопытных групп. Величина разности: чем она больше, тем выше достоверность при том же объеме выборки и при той же изменчивости. Наиболее высокая достоверность будет тогда, когда эти факторы действуют одновременно.

Дисперсионный анализ, разработанный английским математиком и биологом Р. Фишером, позволяет определить достоверность влияния отдельных факторов на изменчивость признака, а также определить их относительную роль в общей изменчивости. Однако дисперсионный анализ связан с большим объемом вычислений, которые проще выполнить на компьютере.

Математические методы позволяют определить и связь между изучаемыми признаками с помощью коэффициентов корреляции и коэффициентов регрессии.

Коэффициент корреляции (лат. *correlatio* – соотношение, взаимосвязь) – определяет величину и направление связи между признаками. Величина этого коэффициента (r) выражается в пределах от 0 до ± 1 . Наличие знака «+» означает, что между признаками существует положительная корреляция, когда при увеличении одного признака другой также возрастает или, наоборот, при уменьшении одного признака другой также снижается. Если коэффициент корреляции со знаком «-», это указывает на отрицательную (обратную) связь, когда увеличение одного признака сопровождается уменьшением другого. Чем ближе показатель к единице, тем сильнее связь между признаками. При $r=0,1-0,3$ связь считается слабой, в пределах 0,3-0,5 – умеренной, 0,5-0,7 – заметной, 0,7-0,9 – высокой и 0,9-0,99 – весьма высокой. Например, в опыте установлена умеренная положительная связь ($r = +0,36$) между скоростью молокоотдачи и суточным удоем коров голландской породы.

Коэффициент регрессии R_{xy} ,

Рух(лат. regressio—движение назад) показывает величину, на которую в среднем изменяется один признак при изменении второго на единицу измерения.

Вопросы по теме:

- 1.Биометрия.
2. Статистические методы обработки экспериментальных данных.
- 3.Статистическая обработка результатов.
- 4.Статистические характеристики выборок, методы сравнения выборок, методы оценки наличия связи между выборками и показателями.
- 5.Виды вариации результатов лабораторного анализа: биологическая (групповая, персональная), преаналитическая, аналитическая.

Словарь терминов.

Аберрация хромосомная – тип мутации, в результате которой происходит нарушение структуры хромосомы.

Автотроф — организм, ассимилирующий энергию либо солнечного света (зеленые растения), либо неорганических веществ (серные бактерии). См. также *Гетеротроф*.

Адаптор – транспорт молекулой тРНК аминокислоты к мРНК, во время трансляции.

Адаптация. Морфологический или функциональный признак организма, позволяющий ему лучше приспособиться к условиям существования; эволюционный процесс, посредством которого организмы приспосабливаются к окружающей среде.

Адаптивная зона — тот или иной особый тип среды, требующий специфических приспособлений. Виды, обитающие в разных адаптивных зонах, обычно различаются по многим морфологическим или физиологическим признакам.

Адаптивное значение. Мера успешности размножения одного организма (генотипа) по сравнению с другими организмами (генотипами); синоним – *селективное значение*.

Адаптивная радиация — возникновение эволюционного разнообразия среди видов, происходящих от общего предка, но расселившихся по разным экологическим нишам.

Аддитивные гены - Гены взаимодействующие друг с другом при определении признака, но не проявляющие ни доминирования (если они аллельны), ни эпистаза (если они находятся в разных локусах).

Аддитивная варианса. Генетическая варианса, обусловленная действием аддитивных генов.

Аддитивная варианса. Генетическая варианса, обусловленная действием аддитивных генов.

Азотистые основания - основания входящие в состав нуклеиновых кислот.

Акклимация — обратимое изменение в морфологии или физиологии организма, возникающее в ответ на изменение в окружающей среде.

Аллель – Одна из двух или большего числа альтернативных форм гена, каждой из которых свойственная уникальная последовательность нуклеотидов. Однако обычно различные аллели данного гена распознают по их фенотипическому проявлению, а не путем сравнения нуклеотидных последовательностей.

Аллелопатия — непосредственное подавление одних видов другими при помощи вредных или ядовитых химических веществ.

Аллопатрические популяции. Популяции, населяющие различные части ареала вида (ср. *Симпатрические популяции*).

Аллоферменты (аллозимы). Альтернативные формы ферментов, кодируемые различными аллелями одного и того же локуса.

Аллотипы – генетически детерминируемые антигенные варианты сывороточных белков, по которым различаются особи одного вида

Аллотетраплоид - особи имеющие диплоидный набор хромосом двух видов.

Амбер-кодон - триплет УАГ в РНК, один из трех бессмысленных кодонов, обуславливающих терминацию белкового синтеза.

Амбер-мутация - любое изменение в ДНК, приводящее к появлению амбер-кодона.

Амейоз (нем. Ameiose; англ. ameiosis) - выпадение мейоза и его замена эквационным делением ядра.

Аминокислоты. Соединения, из которых построены молекулы белков. Всего известно несколько сотен аминокислот, однако в состав белков обычно входит лишь 20 из них .

Амитоз (нем. Amitose; англ. amitosis) (Flemming, 1882 г) - в отличие от непрямого (митоз), прямое деление ядра.

Аммонификация — расщепление белков и аминокислот, при котором в качестве побочного продукта выделяется аммиак.

Амплификация - образование дополнительных копий хромосомных последовательностей, обнаруживаемых в хромосомной или внехромосомной ДНК, увеличение числа копий определённого фрагмента ДНК.

Анализирующее скрещивание - скрещивание с рецессивной родительской формой (*aa*)

Андрогенез - мужской партеногенез. После оплодотворения яйцеклетки материнское ядро элиминируется, и возникающий гаплоидный организм, который называется андрогенетическим, содержит только хромосомный набор отца.

Антигены - инородные вещества проникшие в организм, которые вызывают иммунный ответ (реакцию) синтез антитела.

Антикодон - триплет, занимающий определенное и постоянное положение в структуре молекулы тРНК; комплементарно взаимодействует с кодоном (или кодонами) мРНК.

Антитело. Белок, вырабатываемый иммунной системой высших организмов, который специфическим образом связывает молекулы чужеродных веществ (антигены). Синтез антител начинается в ответ на появление в организме антигенов.

Антимутагены - агенты, обладающие способностью понижать частоту спонтанных или индуцированных мутаций.

Апвеллинг — вертикальные течения, обычно вблизи берегов, выносящие питательные вещества из глубин океана в поверхностные слои.

Апомиксис - замена полового размножения другим, неполовым процессом, не связанным со слиянием ядер или клеток (у зоологических объектов партеногенез).

Анеуплоидия — изменение числа хромосом, не кратное гаплоидному набору, вследствие утраты или добавления одной или нескольких хромосом.

а-Разнообразие— см. *Разнообразие*.

Ассортативное (преимущественное) скрещивание. Неслучайный выбор брачного партнера в отношении какого-то одного или нескольких признаков. Ассортативное скрещивание положительно (отрицательно), когда частота скрещиваний между сходными (различающимися) особями больше, чем можно было бы ожидать при случайном выборе (ср. *Случайное скрещивание*)

Ассоциация — группа видов, обитающих в одном месте.

Аутбридинг. Скрещивание между генетически различными, а не близкородственными особями.

Аутосомы — все хромосомы, кроме половых; в диплоидной клетке имеется по две копии каждой аутосомы.

Аутэкология — изучение живых организмов в связи с окружающей их физической средой.

Базиген — нормальный аллель серии множественных аллелей.

Бактериофаги (фаги) — вирусы, инфицирующие бактерии.

Белок. Полимер, состоящий из одно из одной или нескольких полипептидных субъединиц и обладающий характерной трехмерной структурой, определяемой последовательностью входящих в его состав аминокислотных остатков.

Бентосные организмы — организмы, обитающие на дне рек, озер и океанов.

Белок-репрессор — способен связываться с оператором на ДНК или с РНК, предотвращая соответственно транскрипцию или трансляцию.

Бессмысленный кодон — один из трех триплетов, УАГ, УАА, УГА, вызывающих терминацию синтеза белка (УАГ известен как амбергкодон, УАА — как ochre-кодон, УГА — как opal-кодон).

β-Разнообразие — см. *Разнообразие*.

Библиотека генома — набор клонированных фрагментов ДНК, содержащий весь геном.

Биометрия — наука о применении математических методов для изучения живых организмов.

Биоразнообразие – все виды растений, животных, микроорганизмов, а также экосистемы и экологические процессы, частью которых они являются.

Биотехнология – комплексная многопрофильная область научно-технического прогресса, включающая разнообразный микробиологический синтез, генетическую и клеточную инженерию, инженерную энзимологию, – использование знаний условий и последовательности действия белковых ферментов в организме растений, животных и в промышленных реакторах.

«Бутылочное горлышко». Период, когда популяция состоит всего из нескольких особей.

Варианса (дисперсия). Мера изменчивости, вычисляемая по сумме квадратов разностей между индивидуальными значениями признака и средним по выборке.

Ведущая цепь – цепь ДНК, синтезирующаяся непрерывно в $5' \rightarrow 3'$ направлении.

Вектор для клонирования – любая плаزمиды или фаг, в которые может быть встроена чужеродная ДНК с целью клонирования.

Веретено – структура, образующаяся в процессе деления эукариотической клетки; после растворения ядерной оболочки к веретену с помощью микротрубочек прикрепляются хромосомы.

Ветеринарная генетика – наука, изучающая наследственные аномалии и болезни с наследственной предрасположенностью, разрабатывающая методы диагностики, генетической профилактики и селекции животных на устойчивость к болезням.

Вид — группа фактически или потенциально скрещивающихся между собой популяций, которые репродуктивно изолированы от всех других организмов.

Видообразование. Процесс образования видов.

Вирулентность – степень патогенности в отношении животных определенного вида.

Влажность завядания — минимальное содержание влаги в почве, при котором растения в состоянии получать ее.

Внутривидовая конкуренция — конкуренция между особями, принадлежащими к одному и тому же виду.

Восприимчивость – предрасположенность организма к действию физических, химических и биологических факторов, приводящих к патологическому состоянию.

Время генерации — средний возраст, в котором самка приносит потомство.

Врождённая аномалия – отклонение, имеющееся при рождении.

Вставки (инсерции) – обнаруживаются благодаря присутствию в ДНК дополнительных пар оснований.

Вторичная сукцессия — смена сообществ в местообитаниях, в которых климаксное сообщество было нарушено или совершенно уничтожено.

Вторичное отношение полов. См. *Отношение полов*.

Выживаемость — доля новорожденных особей, дожившихся до определенного возраста.

Вырожденность генетического кода — соответствие нескольких кодонов одной аминокислоте. Замена в третьем основании кодона не всегда приводит к замене аминокислоты.

Выщелачивание — вымывание растворимых соединений из органических остатков или из почвы.

Гамета — Зрелая репродуктивная клетка, способная при слиянии с аналогичной клеткой другого пола образовать зиготу и содержащая гаплоидный набор хромосом.

Гаметогенез — процесс развития половых клеток.

Гаплоидный набор хромосом — содержит по одной копии каждой аутосомы и одну половую хромосому; гаплоидное число хромосом (n) является характеристикой гамет.

Гаплотип — совокупность сцепленных генов одной хромосомы, контролирующих аллогруппу.

Гемизиготность — наличие в хромосомном наборе особи только одной аутосомы из пары гомологичных аутосом, одной половой хромосомы (ХО) или пары разных половых хромосом (ХУ).

Гемизиготный ген. Ген, присутствующий в генотипе лишь в одном экземпляре (копии).

Ген - Последовательность нуклеотидов в геноме организма, которой может быть приписана определенная функция, иными словами, ген — это нуклеотидная последовательность, либо кодирующая полипептид, либо определяющая ту или иную транспортную РНК, либо необходимая для правильной транскрипции какого-то другого гена.

Генеративные мутации — мутации, происходящие в половых клетках.

Генетика — наука о наследственности и изменчивости живых организмов.

Генетическая аномалия - морфофункциональное нарушение в организме животного, возникающее в результате генных или хромосомных мутаций.

Генетическая варианса. Доля фенотипической вариансы, обусловленная различиями в генетической организации особей в популяции.

Генетический груз - совокупность вредных генных и хромосомных мутаций.

Генетический дрейф. См. *Случайный генетический дрейф*.

Генетический код - совокупность кодонов (триплетов), кодирующих аминокислоты.

Генетический полиморфизм - долговременное существование в популяциях двух и более генотипов с частотой (1% и более), превышающих вероятность возникновения повторяющихся мутаций.

Ген-модификатор. Ген, который при взаимодействии с другими генами изменяет их фенотипическое проявление.

Генная инженерия - раздел биотехнологии, связанный с целенаправленным конструированием *in vitro* новых комбинаций генетического материала, способного размножаться в клетке и синтезировать определенный продукт.

Генные (точковые) мутации - изменения в структуре ДНК.

Генный баланс - соотношение и взаимодействие всех генов, влияющих в той или иной степени на признак.

Геном - 1. Полный гаплоидный набор генов или хромосом клетки или организма. 2. Весь генетический материал клетки, организма.

Геномика – раздел молекулярной генетики, изучающий геном, индивидуальные гены на молекулярном уровне, структуру (сиквенс) гена, его экспрессию и механизм редукции активности, клонирование генов и использование их в генно-инженерных целях

Геномные мутации – мутации, обуславливающие изменения числа хромосом в кариотипе.

Генотип - Вся генетическая информация, содержащаяся в организме; генетическая организация особи в одном или нескольких рассматриваемых локусах (ср. *Фенотип*); совокупность генов организма.

Генотипическая среда - комплекс генов организма, в котором происходит действие изучаемого гена.

Генофонд - совокупность аллелей (генов) одной популяции (породы и т.д.), характеризующихся определенной частотой.

Гены-модификаторы - гены, не проявляющие собственного действия, но усиливающие или ослабляющие эффект действия других генов.

Гермафродит - особь, имеющая гонады и (или) половые органы противоположного пола.

Гетерогаметный пол - Пол, образующий гаметы двух типов, в которых содержится по одной из двух различных половых хромосом; характеризуется хромосомным набором $2A+XY$.

Гетерогамные скрещивания. Скрещивания между особями, взятыми из различных популяций вида.

Гетерозигота - диплоидный организм, в гомологичных хромосомах которого находятся две разные аллели данного гена (Aa).

Гетерозиготность. Доля особей, гетерозиготных по данному локусу, или доля гетерозиготных локусов в генотипе особи.

Гетерозис - гибридная мощьность, превосходство гибридов в отношении какого-то одного или по ряду признаков над обеими родительскими формами; синонимы: *гибридная сила* и *гибридная мощьность*.

Гетеротроф — организм, использующий в качестве источника энергии и питательных веществ материалы органического происхождения. См. также *Автотроф*.

Гетерохроматин - генетически неактивные участки хромосом постоянно находятся в конденсированном состоянии.

Гибридизация - процесс взаимодействия комплементарных цепей РНК и ДНК, образующих гибриД РНК – ДНК.

Гибридома - клеточный гибрид, получаемый слиянием нормального лимфоцита, продуцирующего антитела, и опухолевой клетки; обладает способностью синтезировать моноклональные антитела.

Гидрическая сукцессия — последовательный ряд сообществ наземных растений, развивающийся в таких водных местообитаниях, как болота, в частности торфяные.

Гиполимнион — холодный, бедный кислородом слой воды в озере или другом водоеме, лежащий ниже зоны быстрого изменения температуры воды. См. также *Эпилимнион*.

Гистоны - белки, образующие в комплексе с ДНК нуклеосомы – структурные единицы хроматина в ядрах эукариот.

Гликопротеиды - сложные белки, содержащие углеводные компоненты.

Гомеостаз - внутреннее постоянство организма.

Гомогаметный пол - характеризуется хромосомным набором 2А + XX.

Гомогамные скрещивания. Скрещивания между особями одной и той же популяции или вида.

Гомозигота - Клетка (или организм), содержащая в данном локусе гомологичных хромосом одинаковые аллели. (*АА, аа*).

Гомологи - хромосомы, имеющие одинаковые генетические локусы; диплоидная клетка обладает двумя копиями каждого гомолога, по одной от каждого родителя.

Гомозиготность. Доля особей, гомозиготных по данному локусу, или доля гомозиготных локусов в генотипе особи.

Гомологичные хромосомы. Хромосомы или участки идентичные в отношении последовательности локусов и видимой структуры; в процессе эволюции возникают также гомологичные гены и различные структуры, сходные между собой в силу их происхождения от общего предка.

Гомойотермные (теплокровные) организмы — организмы, способные поддерживать постоянную температуру тела, несмотря на изменения температуры окружающей среды.

Гоносомы – половые хромосомы (X или Y).

Гормезис – эффект действия радиации в малых дозах, проявляющийся в адаптивном ответе, стимуляции пролиферации, активации разных биологических процессов.

График серийного замещения — график, выражающий исход конкуренции между двумя видами в экспериментах, в которых изначальное соотношение этих видов было различным.

Дарвиновская приспособленность. Относительная приспособленность одного генотипа по сравнению с другим, оцениваемая по его вкладу в следующие поколения.

Двунаправленная репликация - репликация, при которой две репликационные вилки движутся в противоположных направлениях от общего старта.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Полинуклеотид, содержащий в качестве углеводного остатка дезоксирибозу; представляет собой основной генетический материал всех клеток.

Делеция – хромосомная мутация, в результате которой определенная последовательность нуклеотидов утрачивается (ср. *Дупликация*).

Демографические таблицы — совокупность важнейших статистических данных о популяции: число особей, доживающих до каждого возраста, и плодовитость самок каждого возрастного класса.

Денатурация ДНК или РНК - переход этих молекул из двухцепочной формы в одноцепочную; разделение цепей наиболее часто достигается нагреванием.

Денитрификация—восстановление микроорганизмами нитратов и нитритов до азота.

Детритоядные организмы — организмы, питающиеся мертвым или частично разложившимся органическим веществом.

Дианауза — временное прекращение развития яиц или личинок насекомого, обычно связано с неблагоприятным временем года.

Дигибридное скрещивание - скрещивание, при котором у родителей учитывается два признака, контролируемых двумя локусами.

Диплоид – организм или клетка с двойным (2n) набором хромосом.

Дискордантность - проявление признака только у одного из близнецов.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) – биологическая макромолекула, носитель и хранитель генетической информации. См. *Дезоксирибонуклеиновая кислота*.

Домен в молекуле белка - участок аминокислотной последовательности, связанной с определенной функцией.

Доминирование - проявление действия лишь одного из аллелей у гетерозиготного организма.

Дрейф генов (генетико-автоматические процессы) - изменение генетической структуры численно ограниченной популяции в результате действия случайных причин.

Дупликация – абберация, при которой удвоен какой-либо участок хромосомы.

Дыхание — использование кислорода для метаболического разрушения органических соединений с целью извлечения заключенной в них химической энергии.

Емкость среды — число особей, потребности которых могут быть удовлетворены ресурсами данного местообитания.

Естественный отбор — изменение частоты генетических признаков в популяции в результате избирательного выживания и размножения особей, обладающих этими признаками.

Жизненная форма — характерное строение животного или растения.

Заболеваемость - частота заболеваний в популяции или болезненность, болезненное состояние.

Заболевание – возникновение болезни.

Зависящие от плотности факторы — факторы, влияние которых на особей, составляющих популяцию, изменяется с изменением плотности популяции.

Закон Харди-Вайнберга. Принцип, согласно которому частоты генотипов могут быть предсказаны по частотам аллелей при условии случайного скрещивания.

Зигота - оплодотворенная яйцеклетка; образуется в результате слияния двух гамет. Диплоидная клетка.

Зоопланктон — см. *Планктон*.

Идентичные по происхождению гены. Два гена, имеющие одинаковые нуклеотидные последовательности в силу того, что оба происходят от общего предка.

Идиотипы - антигенные различия между антителами, принадлежащими к одному классу, субклассу и аллотипу у отдельных особей.

Идентичные по структуре гены. Два гена, имеющие одинаковые нуклеотидные последовательности независимо от того, происходят они от общего предка или нет.

Изолирующие механизмы. См. *Репродуктивные изолирующие механизмы*.

Изменчивость – свойство живых систем приобретать новые признаки, отличающие их от родительских форм.

Изотип - группа близкородственных иммуноглобулиновых цепей.

Иммунитет - невосприимчивость организма к инфекционным агентам и генетически чужеродным веществам антигенной природы.

Иммунная реакция - адаптивный ответ организма, вызывающий разрушение, нейтрализацию, отторжение или уничтожение генетически чужеродных веществ (бактерии, вирусы, простейшие и т.д.).

Иммунная система организма - совокупность всех лимфоидных клеток, обеспечивающих реализацию реакции иммунитета.

Иммунный ответ (иммунологическая реактивность) - высокоспецифическая форма реакции организма на чужеродные вещества (антигены).

Иммуногенетика - наука, изучающая генетический контроль иммунного ответа, генетику несовместимости тканей при их пересадках, закономерности наследования антигенной специфичности, проблему поддержания генетического гомеостаза соматических клеток организма.

Иммуноглобулины (Ig) - сложные белки, специфически связывающиеся с чужеродными веществами-антигенами.

Иммунологическая память - способность при повторном контакте с антигеном узнавать и отвечать на него иммунологической реакцией.

Инбредная депрессия - явление снижения жизнеспособности и продуктивности, ухудшение воспроизводительной функции в результате инбридинга.

Инбридинг - спаривание (подбор) близкородственных особей.

Инверсия – аберрация, при которой происходит отрыв участка хромосомы, поворот его на 180^0 и присоединение на прежнее место.

Индекс непрерывности — искусственная шкала градиента того или иного фактора среды, основанная на изменениях в составе сообщества.

Индуктор - небольшая молекула, включающая транскрипцию гена за счет связывания с регуляторным белком.

Индукцированные мутации - возникают под действием мутагенного фактора.

Интерфаза - фаза клеточного цикла между митотическими делениями клетки; подразделяется на G1, и S, G2.

Интерференция - торможение кроссинговера на одном участке кроссинговером на другом.

Интерфероны - группа белков, образующихся в клетках при вирусных инфекциях и обеспечивающих неспецифический противовирусный иммунитет.

Интроны - последовательности внутри структурного гена, которые не участвуют в кодировании белкового продукта гена. После транскрипции гена последовательности, соответствующие интронам, удаляются из мРНК в процессе сплайсинга.

Ион — диссоциированные части молекулы, каждая из которых несет электрический заряд.

Искусственный отбор. Отбор человеком из поколения в поколение животных и растений, основанный на одном или нескольких наследуемых признаках.

Каличе — отложение щелочных солей на поверхности почвы, обычно происходящее в засушливых областях, где грунтовые воды подходят близко к поверхности.

Кальцификация — отложение в почве кальция и других растворимых солей в условиях, когда испарение сильно превосходит количество осадков.

Капсид - белковая оболочка вируса.

Кариотип - набор хромосом соматической клетки организма, характерный для вида по числу, форме и величине.

Карта хромосом - план расположения генов в хромосоме

Катион — часть диссоциированной молекулы, несущая положительный электрический заряд, обычно в водном растворе (например, Ca^{2+} , Na^+ , NH^+ , H^+).

Квантовое видообразование. Быстрое возникновение новых видов, обычно в малых изолятах; как правило, важную роль при этом играют эффект основателя и случайный генетический дрейф. Синоним: *сальтационное видообразование*.

Клеточная инженерия - метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции.

Климакс — конечная стадия сукцессионной последовательности; сообщество, достигшее стационарного состояния при определенном наборе условий среды.

Климатический климакс — характерное для определенного климата сообщество, достигшее стационарного состояния.

Климограмма — диаграмма, на которую нанесен годичный цикл температуры и количества осадков для данной местности.

Клина. Постепенное изменение (градиент) частоты генотипов или фенотипов у ряда смежных популяций. **кДНК** - одноцепочная ДНК, синтезированная обратной транскриптазой на матрице РНК.

Клон - совокупность клеток или особей, произошедших от общего предка путем бесполого размножения.

Коадаптация. Согласованное взаимодействие генов; процесс отбора, в результате которого в популяции устанавливается согласованное взаимодействие генов.

Кодирующая цепь - та цепь ДНК, последовательность которой идентична мРНК.

Кодоминантные аллели - аллели, совместно проявляющиеся в гетерозиготе. Ни один не доминирует над другим.

Кодон - Группа из трех смежных нуклеотидов в молекуле мРНК, либо кодирующая определенную аминокислоту, либо обозначающая конец синтеза полипептидной цепи.

Количественная реакция — изменение величины популяции вида-хищника в результате изменения плотности его жертвы. См. также *Функциональная реакция*.

Количественный признак. Признак, имеющий количественное выражение.

Кольцо Бальбиани - гигантский пуф на меченой хромосоме.

Комбинативная изменчивость — наследственная изменчивость, возникающая в потомстве в результате новых сочетаний признаков и свойств при скрещиваниях.

Компенсационная точка — глубина воды, на которой процессы дыхания и фотосинтеза уравнивают друг друга; нижняя граница эвфотической зоны.

Комплементарная цепь - одна из цепей ДНК, используемая в качестве матрицы для синтеза РНК и комплементарная ей.

Конвергентная эволюция — развитие признаков, несущих одинаковые функции, у неродственных видов, которые обитают в среде одинакового типа.

Конкордантность - присутствие болезни у обоих близнецов.

Конкуренция — использование или защита какого-либо ресурса одной особью, снижающая доступность этого ресурса для других особей.

Контрадаптация — *развитие у двух или нескольких видов приспособлений, направленных против других видов.*

Конъюгация - один из способов обмена генетическим материалом у бактерий.

Косвенная конкуренция — использование какого-либо ресурса одной особью, уменьшающее его доступность для других особей. См. также *Прямая конкуренция*.

Коэффициент инбридинга. Вероятность того, что два гена (аллеля) в данном локусе идентичны по происхождению.

Коэффициент отбора. Интенсивность отбора, оцениваемая по относительному вкладу гамет в генофонд следующего поколения.

Кроссинговер - Обмен между гомологичными хроматидами, происходящий в процессе мейоза и лежащий в основе генетической рекомбинации.; если хроматиды имели разные наборы аллелей, то

кроссинговер может быть выявлен по образованию генетически рекомбинантных хроматид.

Ксерическая сукцессия — последовательный ряд сообществ наземных растений, развивающийся в местообитаниях с хорошо дренируемой почвой.

Ксерические местообитания — местообитания, в которых продукция растений ограничивается доступностью воды.

Латеризация — выщелачивание силикатов из почвы, происходящее обычно в теплых влажных областях, где почва имеет щелочную реакцию.

Леталь. Ген (или хромосомная мутация), вызывающий гибель организма до достижения им половозрелости; если леталь доминантна, то погибают все ее носители, если же она рецессивна, то погибают только гомозиготы.

Летальные гены - гены, вызывающие гибель организма в 100% случаев.

Летальные мутации – мутации, несовместимые с жизнью.

Лигаза - фермент, способный устранять разрывы в молекуле ДНК, восстанавливая ковалентные связи между 5¹ - и 3¹ – концами молекул.

Лизогения - способность фага существовать в бактерии в виде профага, являющегося компонентом бактериального генома.

Лимфоциты-В - вид лейкоцитов, которые синтезируют и секретируют иммуноглобулины.

Лимфоциты –Т - вид лейкоцитов, которые выполняют различные функции в ходе иммунного ответа.

Локус - место в хромосоме, в котором картируется ген, отвечающий за определенный признак; локус может быть представлен любым аллелем данного гена.

Макроэволюция. Эволюция на уровне более высоких систематических категорий, чем вид; приводит к возникновению новых родов, семейств и других таксонов более высокого ранга.

Маркер (генетический) - любой аллель, используемый в эксперименте.

Медицинская генетика - наука, изучающая роль наследственности в патологии человека, закономерности передачи от поколения к поколению наследственных болезней, разрабатывающая методы диагностики и профилактики наследственной патологии, включая болезни с наследственной предрасположенностью

Межвидовая конкуренция — конкуренция между особями, принадлежащими к разным видам.

Мейоз - два последовательных деления клетки (I и II мейотические деления), в результате которых образуется исходное

гаплоидное число хромосом в каждой из четырех образовавшихся клеток. Эти клетки созревают и превращаются в гаметы (сперматозоиды и яйцеклетки).

Менделевская популяция. Группа скрещивающихся между собой организмов, образующая единый генофонд.

Метафаза – стадия митоза и мейоза, при которой хромосомы выстраиваются на экваторе клетки, образуя метафазную пластинку.

Микориза — тесная ассоциация между грибами и корнями деревьев, облегчающая последним поглощение минеральных веществ из почвы.

Мини-сателлитные последовательности (повторы) – простые tandemно повторяющиеся нуклеотидные последовательности генома эукариот с длиной повторяющейся части от 1 до 7 нуклеотидов.

Микросателлиты – присутствующие в эухроматине короткие tandemно повторяющиеся последовательности ДНК

Митоз - деление эукариотической соматической клетки.

Митохондриальные ДНК - небольшие кольцевые молекулы ДНК, присутствующие в митохондриях; кодируют некоторые компоненты митохондрий.

Мицелла — сложная почвенная частица, образующаяся в результате соединения гу-мусных и глинистых частиц и несущая на своей поверхности отрицательный заряд.

Модификационная изменчивость - ненаследственная фенотипическая изменчивость, возникающая под влиянием условий среды и не изменяющая генотип.

Мозаицизм - присутствие в организме клеток (точнее клонов) разного генотипа.

Молчащие мутации - не изменяют продукта, кодируемого геном.

Моногибридное скрещивание - скрещивание, при котором у родителей учитывается один признак, контролируемый одним локусом.

Моноцистронный оперон - кодирует один белок.

Мультимерные белки - состоят более чем из одной субъединицы.

Мутагенез – процесс возникновения мутаций.

Мутагены - факторы, увеличивающие частоту возникновения мутаций, вызывая изменения в ДНК.

Мутация – скачкообразное, стойкое изменение в структуре ДНК и кариотипе.

Мутуализм — взаимоотношения между двумя видами, выгодные для обоих.

Наследование - процесс передачи наследственной информации от одного поколения другому.

Наследственность - свойство организмов обеспечивать материальную и функциональную преемственность между поколениями, а также обеспечивать специфический характер онтогенеза в определенных условиях среды.

Наследственные болезни - болезни, вызываемые мутацией генов одного или нескольких локусов и сопровождающиеся появлением аномалий, уродств и т.д.

Наследуемость - в широком смысле – доля общей фенотипической вариации, остающаяся после исключения вариации, определяемой внешними условиями. В узком смысле – отношение аддитивной генетической вариации к общей фенотипической вариации.

Не зависящие от плотности факторы — факторы, влияние которых на особей, составляющих популяцию, не изменяется с изменением плотности популяции.

Непрерывная изменчивость. Изменчивость в отношении признака, по которому особи лишь слегка отличаются друг от друга, но не распадаются на четко очерченные классы.

Неравновесность по сцеплению. Неслучайное распределение частот аллелей, принадлежащих разным локусам.

Нерасхождение - неспособность хроматид (дуплицированных хромосом) расходиться к противоположным полюсам во время митоза или мейоза.

Неслучайное скрещивание. Система скрещивания, при которой частота скрещиваний различных типов между носителями каких-либо признаков отличается от частоты, ожидаемой при случайном скрещивании.

Нехватка - утрата концевых участков хромосом.

Нитрификация — разложение азотсодержащих органических соединений микроорганизмами с образованием нитратов и нитритов.

Новообразование - тип взаимодействия неаллельных генов, когда при их сочетании в одном организме развивается новая форма признака.

Норма реакции - генотипически определяемая способность организма изменять степень выраженности признаков в определенных пределах в зависимости от условий среды.

Нуклеоид - ядерная зона в прокариотической клетке; она содержит хромосому, но не окружена мембраной. Компактное образование у бактерии, содержащее ДНК.

Нуклеосома - основная структурная единица хроматина, состоящая из ~ 200 нуклеотидных пар ДНК и октомера гистоновых белков.

Образ искомого — поведенческий селективный механизм, дающий возможность хищникам повысить эффективность поисков жертвы, имеющейся в изобилии и представляющей; стоящую добычу.

Обратная транскриптаза - РНК-зависимая ДНК-полимераза – фермент, осуществляющий синтез ДНК на матрице РНК.

Общая продукция — суммарная энергия или питательные вещества, ассимилированные организмом, популяцией или сообществом в целом. См. также *Чистая продукция*.

Однонаправленная репликация - единственная репликационная вилка движется от определенной точки, называемой местом начала репликации.

Однонуклеотидные замены (полиморфизмы) – генные мутации, затрагивающие один нуклеотид.

Олиготрофный водоем — водоем с низким содержанием питательных веществ и низкой продуктивностью.

Онтогенез - индивидуальное развитие организма от оплодотворения яйцеклетки до естественной смерти.

Ооцит - женская половая клетка до оплодотворения.

Оперон - единица транскрипции и регуляции у бактерий, состоящая из структурных генов, регуляторного гена (генов) и контролирующих элементов, узнаваемых продуктами регуляторного гена.

Оподзоливание — распад и удаление глинистых частиц из кислых почв в областях с холодным и влажным климатом.

Осмоз — диффузия веществ, растворенных в воде, через клеточную мембрану.

Отбор. См. *Естественный отбор* и *Искусственный отбор*.

Отношение полов. Отношение числа мужских особей к числу женских (выражаемое иногда в процентах) сразу после оплодотворения (первичное отношение полов), у новорожденных (вторичное отношение полов) и при достижении половозрелости (третичное отношение полов).

Отрицательная обратная связь — стремление системы противодействовать вносимому извне изменению и возвращаться к устойчивому состоянию.

Палиндром - последовательность ДНК, которая остается неизменной, если на одной из цепей ДНК ее читать справа налево; состоит из прилежащих друг к другу инвертированных поворотов.

Панмиксия - свободное скрещивание.

Партеногенез -. Развитие организма из гамет самки без участия гамет самца.

Патогенность - способность паразитировать в организме животного.

Пенетрантность - частота, с которой доминантный или рецессивный ген в гомозиготном состоянии проявляется фенотипически.

Первичная продуктивность — скорость ассимиляции (общая первичная продуктивность) или скорость накопления (чистая первичная продуктивность) энергии и питательных веществ зелеными растениями и другими автотрофами.

Первичная сукцессия — последовательность сообществ, развивающихся во вновь возникшем местообитании, лишенном жизни.

Пищевая сеть — абстрактное понятие, позволяющее представить себе различные пути потока энергии через популяции, составляющие сообщество.

Пищевая цепь — абстрактное понятие, позволяющее представить себе прохождение энергии через популяции, из которых складывается сообщество.

Плазида - кольцевая внехромосомная ДНК, способная к автономной репликации.

Планктон — мелкие взвешенные в воде растения (фитопланктон) и животные (зоопланктон).

Плейотропия - влияние одного гена на развитие двух или более признаков.

Плодовитость — скорость, с которой особь продуцирует потомков (обычно применительно к самкам).

Подвид. Популяция (или группа популяций), отличающаяся от других таких же популяций того же вида частотами генов, хромосомными перестройками или наследуемыми фенотипическими признаками. Между подвидами иногда наблюдается некоторая репродуктивная изоляция, недостаточная, однако, для того, чтобы считать их самостоятельными видами.

Пойкилотермные (холоднокровные) организмы — организмы, не способные регулировать температуру тела.

Полевая влагоемкость — количество воды, удерживаемое почвой против действия силы тяжести.

Полигенный признак - Признак, определяемый многими генами, каждый из которых оказывает лишь небольшое влияние на проявление этого признака.

Поликлимаксная теория — гипотеза, согласно которой сукцессия ведет к одному из ряда четко выраженных климаксных сообществ в зависимости от локальных условий среды.

Полимерия - такой тип взаимодействия, при котором на один признак влияет несколько разных, но сходно действующих неаллельных генов.

Полиморфизм - одновременное присутствие в популяции двух или более аллелей с частотой больше 0,01.

Полиморфность. Доля полиморфных локусов в популяции.

Полипептид. Последовательность аминокислот, связанных между собой ковалентными пептидными связями; белок.

Полиплоид. Клетка, ткань или организм с тремя или более полными хромосомными наборами.

Полиплоидия - увеличение числа хромосом, кратное гаплоидному набору.

Полифакторный признак - признак, обусловленный многими локусами.

Половые хромосомы. Хромосомы, участвующие в определении пола и различающиеся у представителей разных полов (ср. *Аутосомы*).

Полувиды. Популяции, различающиеся слишком сильно для того, чтобы считать их подвидами, но недостаточно сильно, чтобы рассматривать их как самостоятельные виды.

Пополнение — добавление новых особей к популяции за счет размножения или иммиграции.

Популяционная генетика - раздел генетики, изучающий генетическую структуру и генетические процессы, происходящие в популяциях.

Популяция - совокупность особей одного вида, обитающих на определенной территории и свободно скрещивающихся между собой

Пороговый признак - признак, распределение которого при расщеплении происходит прерывисто, но наследуется он полифакторно.

Потенциальная эвапотранспирация — *количество влаги, которое могло бы выделиться путем эвапотранспирации при определенных температуре и влажности, если бы количество воды было избыточным.*

Поток генов. Медленный обмен генами (односторонний или двусторонний) между популяциями, обусловленный распространением гамет или расселением особей из популяции в популяцию; синоним: *миграция*.

Почва — твердый субстрат наземных сообществ, образующийся в результате взаимодействия климатических и биологических факторов с подстилающей геологической породой.

Почвенный горизонт — ясно выраженная зона почвы, образующаяся на определенной глубине в результате выветривания и внесения в почву органических веществ.

Принцип конкурентного исключения — гипотеза, согласно которой два или несколько видов не могут сосуществовать за счет одного и того же ресурса, количество которого мало по сравнению с потребностью в нем.

Приспособленность. Репродуктивный вклад организма или генотипа в следующие поколения (ср. *Дарвиновская приспособленность*).

Провирус - двухцепочная последовательность ДНК, встроенная в хромосому эукариот и соответствующая геномной РНК ретровирусов.

Промотор - участок ДНК, ответственный за связывание РНКполимеразы, инициирующей транскрипцию.

Процессинг - совокупность реакций, ведущих к превращению первичных продуктов транскрипции и трансляции в функционирующие молекулы.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) – амплификация ДНК в условиях *in vitro* (в пробирке).

Прыгающие гены - последовательность ДНК, способная переносить себя в различные новые сайты локализации в пределах генома, например, транспозоны, инсерционные последовательности.

Прямая конкуренция — оттеснение особей от тех или иных ресурсов в результате агрессивного поведения других организмов или использования ими токсинов.

Пустошь — неплодородная земля с бедным растительным покровом, что связано с какими-либо физическими или химическими свойствами почвы.

Разнообразие — число видов в данном сообществе или в данной области. Разнообразие в данном местообитании называют аразнообразием, а сумму всех видов, обитающих во всех местообитаниях в пределах данной области, называют Р-разнообразием.

Раса. См. Подвид.

Регуляторный ген. В широком смысле – любой ген, регулирующий или модифицирующий действие других генов. В узком смысле – ген, кодирующий аллостерический белок, который (самостоятельно или в сочетании с корепрессором) регулирует генетическую транскрипцию структурных генов в опероне, связываясь с оператором (ср. *Ген-модификатор, Структурный ген*).

Расщепление - образование в потомстве гибридов особей с различными признаками.

Регрессия - частичный возврат потомства к среднему для популяции при отборе лучших и худших по количественным признакам родителей.

Резистентность - устойчивость организма к действию физических, химических и биологических агентов, вызывающих патологическое состояние.

Рекомбинантная ДНК - искусственно полученная молекула ДНК.

Рекомбинация. Образование новых сочетаний отдельных участков молекул ДНК (хромосом).

Рекон - минимальная часть гена, которая может быть обменена путем кроссинговера с другим гомологичным участком аллельного ему гена, находящегося в другой хромосоме.

Репарация – восстановление повреждённой структуры ДНК.

Репрессор - ген, подавляющий действие другого гена.

Репликон – часть молекулы ДНК, в которой осуществляется синтез новой ДНК в одноцепочечной форме.

Репликация - процесс самовоспроизведения нуклеиновых кислот, обеспечивающий точное воспроизведение генетической информации.

Репликационная вилка - точка, в которой цепи родительской двухцепочной ДНК расходятся для того, чтобы могла произойти репликация.

Репликационный глазок - область реплицирующейся ДНК внутри протяженного нереплицирующегося района.

Репродуктивная изоляция. Неспособность организмов скрещиваться друг с другом вследствие биологических различий между ними.

Репродуктивные изолирующие механизмы. Любые биологические особенности организма, препятствующие скрещиванию его с представителями других видов.

Рестрикция - процесс разрезания молекулы ДНК ферментами – рестриктирующими эндонуклеазами.

Ресурс — вещество или объект, необходимый организму для поддержания нормального существования, роста и размножения. Если количество данного ресурса мало по сравнению с потребностью в нем, то его называют ограничивающим ресурсом. Невозобновляемые ресурсы (например, пространство) существуют в фиксированных количествах и могут быть полностью использованы; возобновляемые ресурсы (например, пища) производятся со скоростью, которая может частично определяться их использованием.

Рецепторы - макромолекулярные структуры клеточной поверхности, с помощью которых клетки узнают антигены.

Рецессивность - отсутствие проявления одного из аллелей в гетерозиготе.

Рецессивный аллель. Аллель (или соответствующий признак), проявляющийся лишь в гомозиготном состоянии.

Рецессивный ген - ген, влияющий на развитие признака только в гомозиготном состоянии.

Рибонуклеиновая кислота (РНК). Полинуклеотид, содержащий в отличие от ДНК урацил вместо тимина и сахар рибозу вместо дезоксирибозы

Рибосома - органоид цитоплазмы, с участием которого происходит синтез белка в клетке.

РИМ. См. *Репродуктивные изолирующие механизмы.*

мРНК – матричная, информационная РНК (иРНК), кодирующая белки.

РНК – одноцепочечные полимерные молекулы нуклеиновых кислот, участвующие в процессах биосинтеза белка и выполняющие разные функции (мРНК, тРНК, рРНК).

Сайт – место, занятое точковой мутацией внутри цистрона, т.е. любая пара нуклеотидов в двухцепочечной молекуле ДНК

Сальтационное видообразование. См. *Квантовое видообразование.*

Самооплодотворение. Образование зиготы из мужских и женских гамет, продуцируемых одним и тем же организмом.

Сверхдоминирование. Явление, при котором какой-либо признак (обычно приспособленность) проявляется в гетерозиготе сильнее, чем в обеих гомозиготах.

Секвенирование – определение нуклеотидной последовательности ДНК

Сексдукция - перенос у бактерий фактором F генетического материала из одной клетки в другую

Селективное значение. См. *Адаптивное значение.*

Селективный сдвиг. При искусственном отборе разность между средними значениями признака у потомства отобранных родителей и в родительском поколении в целом.

Селекционный дифференциал. При искусственном отборе разность между средними значениями признака у особей, отбираемых в качестве родителей следующего поколения, и в целой популяции.

Серия — последовательный ряд стадий изменения сообщества в определенной области, ведущий к устойчивому состоянию. См. также *Сукцессия.*

Серповидноклеточная анемия. Наследственное заболевание человека, при котором в эритроцитах содержатся аномальные молекулы гемоглобина; обусловлена гомозиготностью по аллелю, кодирующему β-цепь гемоглобина.

Симпатрические популяции. Популяции или виды, обитающие по крайней мере частично на одной территории (ср. *Аллопатрические популяции*).

Синапсис - конъюгация двух пар сестринских хроматид гомологичных хромосом, происходящая во время мейоза; образующаяся структура называется бивалентом.

Синэкология — взаимоотношения организмов и популяций с биотическими факторами среды.

Системы групп крови - совокупность антигенов, контролируемых одним локусом.

Система скрещивания. Характер выбора брачного партнера в популяциях, размножающихся половым путем; принято различать случайное и ассортативное (предпочтительное) скрещивание.

Скорость накопления биомассы — отношение веса к годовой продукции (обычно применительно к растениям).

Случайная выборка. Выборка, организуемая таким образом, что каждая особь популяции или каждый ген в геноме обладает равной с другими вероятностью попасть в нее.

Случайное скрещивание. Случайный выбор брачного партнера по отношению к какому-то одному или нескольким признакам. Синоним: панмиксия (ср. *Ассортативное скрещивание*).

Случайный дрейф генов. Изменение частот генов в ряду поколений, происходящее в результате случайных флуктуаций.

Смещение признака — дивергенция в признаках двух в остальном сходных видов в области перекрывания их ареалов, вызванная селективными действиями конкуренции между этими видами в области перекрывания.

Соматические клетки. Все клетки тела, за исключением гамет и тех клеток, из которых развиваются гаметы.

Сообщество — ассоциация взаимодействующих популяций, обычно определяемая характером их взаимодействия или местом, где они живут.

Сплайсинг - процесс удаления интронов и объединения экзонов в мРНК.

Стабилизирующее скрещивание - скрещивание, восстанавливающее соотношение генотипов в популяции в соответствии с формулой Харди-Вайнберга.

Стресс - состояние организма, возникающее в ответ на воздействие сильных раздражителей или различных повреждающих факторов внешней среды.

Структурный ген - кодирует РНК или белок.

Субвитальные гены - гены, вызывающие гибель менее 50% особей.

Субклимакс — одна из стадий сукцессии в серии, которая не смогла дойти до климатического климакса вследствие пожара, недостатка каких-либо веществ в почве, перевыпаса и других подобных факторов.

Сублетальные гены (полулетальные) - гены, обуславливающие гибель 50-99% особей.

Сукцессия — последовательное замещение популяций в какомлибо местообитании путем закономерного продвижения к устойчивому состоянию.

Суперген. Участок ДНК, содержащий несколько тесно сцепленных генов, влияющих на один признак или на ряд взаимосвязанных признаков.

Сцепление. Мера независимости с которой аллели двух генов расходятся в разные клетки в мейозе или при скрещиваниях.

Сцепленность - свойство генов одной хромосомы наследоваться совместно; измеряется в процентах рекомбинации между локусами.

Сцепление с полом - способ наследования, характерный для генов, находящихся в половых хромосомах (обычно в X-хромосоме).

Сцепленность с полом. Сцепление генов, находящихся в половых хромосомах.

Талассемия - заболевание человека, вызванное отсутствием α -или β -глобина в его эритроцитах.

Теломера - естественный конец хромосомы.

Теория мозаичного климакса — гипотеза о том, что сукцессия завершается возникновением весьма разнообразных недискретных климаксных сообществ, характер которых зависит от локального климата, почвы, наклона местности, интенсивности выпаса и т. п.

Тератология - наука, изучающая уродства.

Терминатор - последовательность ДНК, находящаяся на конце транскрипта и ответственная за прекращение транскрипции.

Терминирующий кодон - один из трех триплетов УАГ, УАА или УГА, вызывающих терминацию синтеза белка; их также называют бессмысленными кодонами.

Термоклина — слой воды, в пределах которого происходит быстрое изменение температуры и переход от теплового верхнего слоя (эпилимнион) к холодному нижнему (ги-полиимнион).

Тотипотентность - способность любой соматической клетки дать начало новому организму.

Точка начала репликации (ori) - последовательность ДНК, в которой происходит инициация репликации.

Точковые мутации - изменение одной пары оснований.

Трансгеноз - экспериментальный перенос генов, выделенных из определенного генома или искусственно синтезированных, в другой геном.

Трансдукция - перенос генов из одной бактериальной клетки в другую при помощи бактериофага.

Транскрипция - процесс синтеза РНК на ДНК-матрице.

Транслокация - перемещение гена или участка хромосомы из одного локуса в другой.

Трансляция - процесс синтеза белка на матричной мРНК.

Трансмиссибельная геномная нестабильность (transmissible genomic instability) (или НСГ клеток полового пути, или «половая»

НСГиндуцирование (и/или передачи) состояния НСГ в ряду клеточных генераций или поколений на организменном уровне, от родителей к потомкам, т.е. из генома родительских гамет в соматические клетки организма потомков.

Трансплантация эмбрионов - метод ускоренного воспроизводства высокопродуктивных животных (доноров) путем получения и пересадки эмбрионов менее ценным животным (реципиентам).

Транспирация — испарение воды листьями и другими частями растения.

Транспозон - последовательность ДНК, способная реплицироваться и внедрять одну из копий в новое место генома.

Трансформация бактериальных клеток - приобретение нового генетического маркера в результате включения экзогенной ДНК.

Трансформация эукариотических клеток - переход в состояние неконтролируемого роста; имеет много общего или совпадает с опухолевым перерождением клеток.

Триплет - набор трех нуклеотидов (синоним кодона).

Трисомия – наличие добавочной хромосомы в кариотипе диплоидного организма.

Трофическая структура — организация сообщества, основанная на пищевых взаимоотношениях популяций.

Трофический уровень — положение в трофической цепи, определяемое числом этапов передачи энергии.

Удельная теплоемкость — количество энергии, которое необходимо сообщить 1 г какого-либо вещества, чтобы изменить его температуру на 1 °С. По определению, для того чтобы повысить температуру 1 г воды на 1 °С, требуется 1 кал энергии.

Упаковочный коэффициент - отношение длины ДНК к длине структуры, которая ее содержит.

Усилители транскрипции (enhancer) - участки ДНК (50-100 п.о.), усиливающие транскрипцию с ряда эукариотических промоторов, находящихся по отношению к ним в **цис**-положении, эти элементы оказывают свое действие независимо от того, с какой стороны промотора они располагаются.

Условно летальные мутации - вызывают гибель клетки или вируса только в определенных (непермиссивных) условиях, но не проявляют своего летального действия в других условиях.

Устойчивость — внутренне присущая системе способность противостоять изменениям.

Участки сплайсинга - последовательности, непосредственно окружающие границы между экзонами и интронами.

Фаг (бактериофаг) - бактериальный вирус.

Факторы инициации (IF) - белки, которые специфически связываются с малой субчастицей рибосомы на стадии инициации белкового синтеза.

Факторы элонгации - белки, циклично ассоциирующие с рибосомой в соответствии с включением каждой новой аминокислоты в полипептидную цепь.

Фактор-F - фактор фертильности — эписома, контролирующая способность бактерий к конъюгации.

Факторы-R - эписомы, обеспечивающие устойчивость бактерий к лекарственным препаратам.

Фармакогенетика - раздел медицинской или ветеринарной генетики, изучающий наследственно обусловленные реакции человека и животных на лекарственные препараты.

Феногруппа - совокупность антигенов, которые наследуются как единое целое.

Фенокопия - изменение признака под влиянием внешних факторов, ведущее к копированию признаков, обусловленного генотипом.

Фенотип. Совокупность всех доступных наблюдению признаков организма, возникающих в результате взаимодействия между генотипом и окружающими условиями, в которых происходит развитие организма.

Фенотипическая варианса (дисперсия). Дисперсия частоты распределения особей по какому-либо признаку или совокупности признаков (ср. *Генетическая варианса*).

Ферменты рестрикции - узнают определенные короткие последовательности в ДНК и расщепляют ее иногда в месте связывания, а иногда в каком-либо другом месте (это зависит от типа фермента).

Фиксация азота — биологическая ассимиляция атмосферного азота с образованием азотсодержащих соединений.

Филогенез - история развития вида.

Флуоресценция — специфическое свечение, возникающее в результате применения специфических флюоресцентных красителей.

Фитопланктон — См. *Планктон*.

Фотосинтез — *использование световой энергии для образования простых Сахаров из двуокиси углерода и воды.*

Фрагменты Оказаки - короткие фрагменты ДНК длиной несколько тысяч (бактерии) или несколько сотен (эукариоты) нуклеотидов образуется в результате прерывистой репликации; впоследствии ковалентно соединяются в непрерывную цепь.

Функциональная реакция — изменение скорости использования жертвы отдельной особью хищника в ответ на изменение плотности жертвы. См. также *Количественная реакция*.

Хиазма - петля, образуемая хромосомами при конъюгации хромосом в период редукционного деления.

Химеры - растения или животные со смешанными тканями двух организмов.

Хроматиды - хромосомные копии, образующиеся при репликации.

Хромомера - интенсивно окрашиваемая гранула; ее можно различить как составную часть хромосомы при определенных условиях (особенно на ранних стадиях мейоза).

Хромосомы - Нитевидная структура в ядре клетки, содержащая гены, расположенные в линейной последовательности; молекула ДНК, представляющая весь геном прокариотических клеток; молекула ДНК в комплексе с гистонами и другими белками в эукариотических клетках.

Хромосомная мутация (перестройка). Изменение структуры или числа хромосом в наборе.

Хромосомный набор. Совокупность всех хромосом в ядре нормальной гаметы или зиготы. Каждый тип хромосом может быть представлен в одном экземпляре (моноплоидный или гаплоидный набор) или в большом числе экземпляров (полиплоидный набор).

Хромосомная нехватка - потеря в результате мутации конца хромосомы.

Хромосомный полиморфизм. Популяционный полиморфизм по хромосомным перестройкам.

Центровая теория гена - теория о том, что ген состоит из отдельных функциональных участков – центров, которые могут независимо изменяться при мутациях.

Центромера - область хромосомы, в которую входит участок прикрепления к митотическому или мейотическому веретену.

Цианобактерии - группа фототрофных прокариотических организмов (традиционное название – синезеленые водоросли).

Циклический климакс — устойчивая циклическая последовательность сообществ, ни одно из которых само по себе не является устойчивым.

Циклы таксонов — циклы расширения и сокращения географического ареала и плотности популяции данного вида или более высокой таксономической категории.

Цитогенетика - раздел генетики, изучающий строение клетки и ее органоидов и изменение их при возникновении мутаций.

Цистрон - генетическая единица, выявляемая путем комплементационного теста; эквивалентна гену и означает единицу ДНК, кодирующую белок.

Цитоплазматическое наследование - характерно для признаков, определяемых митохондриальными генами, и генами, локализованными в хлоропластах.

Частотно-зависимый отбор. Естественный отбор, направление и (или) интенсивность которого зависит от частоты генотипов или фенотипов в популяции.

Числовые мутации - изменение числа хромосом в кариотипе.

Чистая продукция — общее количество энергии или питательных веществ, накапливаемых организмом в результате роста и размножения; общая продукция минус дыхание.

Чистая скорость размножения — ожидаемое число потомков, которое самки могут произвести в среднем за всю свою жизнь.

Чистые линии - организмы, гомозиготные по изучаемым признакам.

Эвапотранспирация — суммарное количество влаги, выделяемой растениями в результате транспирации и испаряемой с поверхностей воды и почвы.

Эволюция - процесс исторического развития живой природы на основе изменчивости, наследственности и отбора.

Эвтрофикация — обогащение водоемов питательными веществами, часто вызываемое спусканием в них сточных вод и поверхностным стоком с удобряемых полей.

Эвтрофный водоем — водоем с обильным содержанием питательных веществ и высокой продуктивностью.

Эвфотическая зона — верхние слои водоема, в которые проникает достаточное количество света, чтобы процессы фотосинтеза превышали или уравнивали процессы дыхания. См. также *Компенсационная точка*.

Экзон - любой отдельный фрагмент прерывистого гена, который сохраняется в зрелой РНК.

Экзонуклеазы - ферменты, последовательно отщепляющие нуклеотиды с концов полинуклеотидной цепи; могут быть специфичными в отношении 5' — или 3' — концов ДНК или РНК.

Экоклина — географический градиент структуры растительности, связанный с одним или несколькими изменяющимися факторами среды.

Экологическая эффективность — доля энергии (выражаемая в процентах) в биомассе, продуцируемой на одном трофическом уровне, которая включается в биомассу, продуцируемую следующим, высшим, трофическим уровнем.

Экологическое высвобождение — расширение использования местообитаний и ресурсов популяциями в областях с низким

разнообразием видов и вытекающей из него пониженной межвидовой конкуренцией.

Эколого-ветеринарная генетика – раздел ветеринарной генетики, изучающий влияние различных экологических факторов на наследственность животных, устойчивость к заболеваниям, сопряжённую эволюцию макро- и микроорганизмов, генетическую обусловленность накапливать или выводить из организма вредные вещества, генетически детерминированные реакции животных на лекарственные препараты.

Экосистема — вся совокупность взаимодействующих факторов физического и биологического мира определенного участка биосферы.

Экотип — генетически дифференцированная субпопуляция, ограниченная определенным местообитанием.

Экотон — местообитание, возникающее на стыке четко различающихся местообитаний; краевое местообитание, зона перехода между местообитаниями разного типа.

Экспрессивность - влияние данного аллеля на степень выраженности признака.

Экспрессия гена – активизация транскрипции гена, в процессе которой на ДНК образуется мРНК.

Электрофорез фрагментов ДНК – процесс, обеспечивающий разделение фрагментов ДНК на поверхности геля. Фрагменты движутся в геле, помещённом в постоянное электрическое поле, от отрицательного полюса к положительному в зависимости от размеров (чем больше относительная молекулярная масса фрагмента, тем медленнее он движется).

Электрофорез. Метод разделения молекул, основанный на их разной подвижности в электрическом поле.

Электроморфы. Аллоферменты, выявляемые с помощью электрофореза.

Эмбриогенетическая инженерия - активная перестройка генома животных путем вмешательства в их развитие на самых ранних стадиях онтогенеза.

Эндонуклеазы - ферменты, расщепляющие связи полинуклеотидной цепи нуклеиновых кислот; могут быть специфичны в отношении РНК одноцепочных или двухцепочных ДНК.

Энзимы – ферменты, вещества белковой природы, участвующие в биохимических реакциях.

Эпигенез – сумма всех взаимодействий между генами и средой, их функционирования, проявляющихся в процессе онтогенеза и в ряду дифференцированных клеток

Эпигенетическая изменчивость – наследуемое, но обратимое функциональное состояние гена не сопровождающееся изменением его нуклеотидной последовательности

Эпигенотип – генотип, развившийся в процессе контакта с внешней средой, т.е. фенотип как продукт взаимодействия конкретного генотипа с внешней средой при формировании каждого признака в рамках его нормы реакции

Эпилимнион — теплые, богатые кислородом поверхностные слои озера или другого водоема.

Эписома - плазида, способная интегрировать в бактериальную ДНК.

Эпистаз - тип взаимодействия, при котором один ген подавляется другим, неаллельным геном.

Эухроматин - представляет собой весь генетический материал интерфазного ядра, за исключением гетерохроматина.

Эффект основателя. Генетический дрейф, обусловленный тем, что исходно популяция состоит из очень небольшого числа особей.

Эффективность ассимиляции — доля потребленной организмом энергии (выражаемая в процентах).

Эффективность пищевой цепи — см. *Экологическая эффективность*.

Эффективная численность популяции. Число *размножающихся* особей в популяции.

Эффективность транспирации — отношение чистой первичной продукции к транспирации воды растением, обычно выражаемое в граммах на 1 кг воды.

Эффективность фотосинтеза — доля световой энергии, ассимилированная растениями; расчет основан либо на чистой продукции (чистая эффективность фотосинтеза), либо на общей продукции (общая эффективность фотосинтеза).

Эффективность чистой продукции — относительная доля (выражаемая в процентах) потребленной пищи, использованной организмом на рост и размножение.

Эффект положения - влияние положения гена в хромосоме на его действие.

Эффективность эксплуатации — относительная доля (выражаемая в процентах) потенциальной жертвы или кормовых растений, поглощаемых хищниками и растительноядными животными.

Ядерный матрикс - сплетение фибрилл, окружающих и пронизывающих ядро.

Ядро – жизненно важный органоид клеток эукариот, содержащий ДНК.

Ядрышко - обособленная область ядра, образуемая при транскрипции генов рРНК.

Яйцевой фолликул - небольшой мешочек из клеток в яичнике млекопитающих, внутри которого находится созревающее яйцо.

Яйцеклетка - женская репродуктивная клетка, из которой после оплодотворения ее сперматозоидом развивается новая особь того же вида.

Рекомендуемая литература:

Список основной литературы

- 1. Барковский Е.В. Современные проблемы биохимии. Методы исследований [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Е.В. Барковский [и др.]; под ред. проф. А.А. Чиркина. – Минск: Выш. шк., 2013. – 491 с.: ил. - ISBN 978-985-06-2192-4. - Режим доступа: <http://znanium.com/>
- 2. Применение молекулярных методов исследования в генетике: Учебное пособие / Л.Н. Нефедова. - М.: НИЦ Инфра-М, 2016. - 104 с. - Режим доступа: <http://www.znanium.com/>.

4.2. Список дополнительной литературы

- 1. Дементьева Т.А., Короткевич О.С. Практикум по биологической химии. Новосибирск, 2010.- 76 с.
- 2. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. — Новосибирск: Новосиб. ун-т, 2002.- 219 с.
- 3. Константинова И.С. Основы цитологии, общей гистологии и эмбриологии животных/Константинова И.С., Булатова Э.Н., Усенко В.И. – М.: Изд-во: Лань, 2015. – 240 с. (ЭБС).

4.3. Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»

Таблица 3. Перечень информационных ресурсов

№ п/п	Наименование	Адрес
1.	Официальный сайт Минсельхоза России	http://www.mcx.ru/
2.	Аграрная российская информационная система	http://aris.ru/
3.	Единый сервисный портал Минсельхоза России http://service.mcx.ru/Home/RegistersAndRegisters	
4	Федеральное бюджетное учреждение науки государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор	http://www.vector.nsc.ru

5	Лаборатория «Медиген»	http://www.medigen.ru/
6	ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора	http://www.obolensk.org/
7	Лаборатория генетики человека ИОГенРАН	http://humgenlab.vigg.ru/
8	НИИ медгенетики СО РАМН	.http://www.medgenetics.ru
9	Национальный институт биологических наук Академии наук Китая, Пекин	http://www.nibs.ac.cn/english/index.php
10	"РУП Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского", Минск	http://belniig.by/ru/branches
11	Сотрудничающий центр Всемирной организации здоровья животных по заболеваниям домашней птицы, Юго-Восточная	http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=8647
	исследовательская лаборатория домашней птицы	
12	Центр электромагнитной безопасности России	http://www.tesla.ru
13	Центр дозиметрии	http://www.dozimetr.biz
14	Управление по этическим проблемам в биотехнологических исследованиях	http://www.hhs.gov/ohrp/
15	Биотехнологический образовательный портал государственного университета Айовы.	http://www.biotech.iastate.edu/publications/mendel/ModuleIIP1.
16	Электронно-библиотечная система НГАУ	http://nsau.edu.ru/library/ecatalogue/
17	Электронная библиотечная система издательства «Лань»	www.e.lanbook.com
18	Научная электронная библиотека eLibrary.ru	www.eLibrary.com
19	Электронно-библиотечная система издательства «Инфра-М»	www.znaniyum.com

СОДЕРЖАНИЕ

Цели и задачи дисциплины "Современные методы исследования"	3
--	---

Раздел 1 Объективные методы исследования

Тема 1.1 Основные группы объективных методов исследования организма.	5
Тема 1.2 Физико-химические методы анализа.	6
Тема 1.3 Электрохимические методы	8
Тема 1.4 Хроматографические методы	16
Тема 1.5 Микроскопия	26
Тема 1.6 Методы иммунодиагностики. ИФА	33

Раздел 2 Молекулярно-генетические методы исследования

Тема 2.1 Молекулярно-генетические методы. Методы анализа ДНК Лабораторная работа № 1 "Выделение и анализ ДНК"	38
Тема 2.2 Молекулярно-генетические методы. ДНК-полиморфизм. Лабораторная работа № 2 "Анализ полученных препаратов ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле"	40
Тема 2.3. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) Лабораторная работа № 3 "Качественное определение присутствия ГМО в продуктах питания методом ПЦР"	43
Тема 2.4. ДНК-технологии в анализе генов, связанных с продуктивностью животных	

Лабораторная работа № 4 "Рестрикционный анализ полученного препарата ДНК" (2 ч)	52
Тема 2.5. Методы ДНК-диагностики. Идентификация мутаций.	
Лабораторная работа № 5 " Определение однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) TNF α методом ПЦР. Электрофоретическая детекция»	55
Тема 2.6 . Проточная цитометрия.	57
Раздел 3 Математические методы	
Тема 3.1 Математические методы в зоотехнии и биологии.	64
Словарь	69
Список литературы	97

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии
Составитель
Себежко Ольга Игоревна

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методические указания к практическим занятиям

В авторской редакции
Компьютерная вёрстка О.И. Себежко

Формат 210x297 8,7 усл. печ. л.

