

**А. Г. МОРЕНКО**

**БІОТЕХНОЛОГІЇ В ГАЛУЗІ ОХОРОНИ ЛЮДИНИ**

**Лабораторний практикум**

**Луцьк 2020**

УДК 616-092(076)

М 79

Укладач: *Алевтина Григорівна Моренко*, д.б.н., професор, завідувач кафедри фізіології людини і тварин СНУ імені Лесі Українки

Рецензенти: *Дмитроца Олена Романівна*, к.б.н., доцент кафедри фізіології людини і тварин СНУ імені Лесі Українки;

*Іванців Василь Воодимирович*, к.і.н., завідувач кафедри екології та агрономії Луцького національного технічного університету.

М 79. Біотехнології в галузі охорони здоров'я: Лабораторний практикум. / Укладач А. Г. Моренко

Лабораторний практикум складений згідно діючої навчальної програми з «Біотехнології в галузі охорони здоров'я» і розрахований для студентів спеціальності 091 Біологія, освітньої програми «Лабораторна діагностика». Включає лабораторні роботи, присвячені дослідженню методів генетичної трансформації плазмиди бактерії *E.coli*, культивуванню мікроорганізмів на живильних середовищах, виготовлення, фіксації і фарбування мікроскопічних препаратів, виділення мікотичної культури із наступною оцінкою її антибіотичної активності, визначення дії антибактеріальної речовини на культуру бактерії *E.coli*, *Staphylococcus*, трансплантації і технології 3D друку тканин і органів.

Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, 2020, 25 с.

УДК 616-092(076)

М 79

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	4
<b>Лабораторна робота 1.</b> Методика генетичної трансформації плазмиди бактерії E.coli.....	5
<b>Лабораторна робота 2.</b> Методи стерилізації.....	7
<b>Лабораторна робота 3.</b> Живильні середовища для культивування мікроорганізмів.....	10
<b>Лабораторна робота 4.</b> Метод поверхневого і глибинного культивування клітин.....	12
<b>Лабораторна робота 5.</b> Виготовлення мікроскопічних препаратів. Методи фарбування бактерій. Фарбування бактерій за Грамом.....	14
<b>Лабораторна робота 6.</b> Методика виділення мікотичної культури із наступною оцінкою її антибіотичної активності.....	17
<b>Лабораторна робота 7.</b> Визначення дії антибактеріальної речовини на культуру бактерії E.coli, Staphylococcus.....	18
<b>Лабораторна робота 8.</b> Методика трансплантації тканин і органів.....	19
<b>Лабораторна робота 9.</b> Біотехнологія 3d друку органів і тканин.....	21
<b>Лабораторна робота 10.</b> Фракціонування клітинного екстракту методом диференціального центрифугування.....	23
<b>Лабораторна робота 11.</b> Метод мікроскопії при дослідженні клітин тваринного походження.....	24
<b>Практична робота 1.</b> Збереження біорізноманіття життя: банк біоматеріалів.....	25
<b>Практична робота 2.</b> Характеристика біооб'єктів рослинного і тваринного походження.....	25
<b>Практична робота 3.</b> Методи медичної біотехнології.....	25
<b>РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА</b> .....	26

## ВСТУП

Методичний збірник “Біотехнології в галузі охорони здоров’я: лабораторний практикум” містить розробку форм виконання ряду класичних лабораторних робіт з біотехнології на сучасному методичному рівні. Включає лабораторні роботи, присвячені дослідженню методів генетичної трансформації плазмиди бактерії *E.coli*, культивуванню мікроорганізмів на живильних середовищах, виготовлення, фіксації і фарбування мікроскопічних препаратів, виділення мікотичної культури із наступною оцінкою її антибіотичної активності, визначення дії антибактеріальної речовини на культуру бактерії *E.coli*, *Staphylococcus*, трансплантації і технології 3D друку тканин і органів. Під час лабораторного практикуму студенти повинні поглибити знання з теоретичних основ даного курсу, навчитись на практиці використовувати методики генної інженерії як базовий принцип біотехнології, створення генетично модифікованих організмів. Студенти повинні вміти використовувати методики роботи із клітинним матеріалом: культивування, посіву, аналізу, фракціонування, дії препаратів антибіотичного ряду на бактеріальні культури. Студенти повинні оволодіти технікою безпеки застосування біотехнологій. Кожна лабораторна робота вміщує матеріал домашньої теоретичної підготовки студента і опис методик по виконанню лабораторно-практичної роботи в аудиторії.

В основу лабораторного практикуму закладена мотивація, яка повинна забезпечити можливість для кожного студента якомога більш самостійно оволодіти необхідними знаннями і практичними навичками з курсу «Біотехнології в галузі охорони здоров’я», оволодіти знаннями про актуальні і дискутовані сучасні біотехнології, про законодавчу базу та етичні принципи їх застосування в різних галузях суспільного виробництва і охорони здоров’я, про стратегічні напрямки регенеративної медицини. Лабораторний практикум є досить важливим в системі підготовки магістрів за освітньою програмою «Лабораторна діагностика» спеціальності 091 «Біологія», оскільки розвиток сучасної біомедичної науки потребує від фахівця всебічних знань стосовно біотехнологій, що застосовуються для діагностики і лікування людського організму.

## Лабораторна робота 1

### Методика генетичної трансформації плазмиди бактерії Ecolі

Мета: Ознайомитися з методикою проведення генетичної трансформації плазмиди бактерії Ecolі і отримання рекомбінантної ДНК.

Об'єкт дослідження: бактерії Ecolі

Обладнання: бактерії Ecolі, плазмиди ДНК, поживний розчин, хлористий кальцій, лід, мікропіпетки, водяна баня лабораторна, інкубаторна установка, чашки петрі, мікроцентрифужні пробірки, зубна паличка.

Генетична рекомбінація - утворення зміненої хромосоми внаслідок або нормального біологічного обміну генів, або об'єднання генів, одержаних з різних джерел, здатних після цього виявляти свої біологічні функції: брати участь у процесах реплікації, транскрипції, трансляції. При генетичній рекомбінації нова молекула ДНК утворюється шляхом розриву й об'єднання ланцюгів ДНК. У природі є різноманітні форми переносу, обміну і змінення спадкової інформації, які служать джерелом утворення організмів із новими властивостями.

У останні роки особлива увага приділяється генетично рухливим елементам, які отримали назву «стрибаючих» генів, тобто таким ділянкам ДНК, які можуть зміщуватися з одних частин генома в інші. При цьому вони або залишають хромосому (втрачаються), або знову вбудовуються в її структуру або в іншу хромосому. Ці мігруючі елементи беруть участь у регуляції дії генів та індукуванні хромосомних перебудов. До них відносяться IS-елементи - інсерційні сегменти (від англ. insertion sequences), які складаються з 800-1500 нуклеотидних послідовностей, і транспозони (від англ. transpose - переміщувати) - складніші мігруючі елементи, які містять 3000-25000 нуклеотидних пар, часто з IS-елементами. Здатність мігруючих елементів у кількості від невеликих ділянок і до 5000-10000 нуклеотидних пар вбудовуватись у різні ділянки ДНК за участю особливої ферментної системи, яка впізнає і пришиває транспозони на нове місце, зумовлена наявністю на обох їхніх кінцях прямих або обернених (інсерційних) послідовностей основ нуклеотидів (типу АЛЛА і ТТТТ або ААТТ і ТТАА).

Таким шляхом ген або набір генів може зміщуватися з місця на місце в межах однієї й тієї ж хромосоми, з плазмиди або фага в бактеріальну хромосому, або із плазмиди у фаг. З'ясовані закономірності було використано при одержанні гібридних (рекомбінантних) ДНК. Виявилось, що гени з різних організмів можна штучно об'єднати й отримати нові рекомбінантні молекули ДНК, які можуть служити виключно цінним інструментом у генетичних дослідженнях, а також широко використовуватися із практичною метою.

Розвиток методів виділення генів, об'єднання їх у нових сполученнях (гібридизація молекул ДНК), введення потім у клітини хазяїна та їх клонування (накопичення) стало важливим біохімічним досягненням, яке відкрило нову еру в молекулярній біології. Перспективи використання рекомбінантних ДНК сприяли виникненню нового напрямку в науці - генної інженерії.

Генна інженерія, або техніка рекомбінантних ДНК, включає сукупність прийомів, що дозволяють шляхом експериментальних операцій *in vitro* перенести генетичний матеріал з одного організму (джерела генів) в інші (хазяїну або реципієнту) таким чином, щоб забезпечити спадковість цих генів у новому для них організмі. Генна інженерія - це отримання живих організмів з попередньо заданими спадковими ознаками, з певним обміном речовин.

У методах генної інженерії використовують такі операції:

- 1) отримання гена;
- 2) отримання гібридної (рекомбінантної) ДНК;

- 3) сполучення рекомбінантної ДНК із так званою векторною молекулою, яка здатна доставляти ген у клітину хазяїна і тим самим забезпечувати реплікацію чужорідного гена;
- 4) введення отриманої рекомбінантної ДНК у клітину хазяїна;
- 5) клонування рекомбінантної ДНК (рекомбінантних клітин);
- 6) відбір клітин, де розмножуються (клонуються) введені чужорідні гени.

#### **Хід роботи:**

1. Трансляція відеофільмів щодо теоретичних основ утворення рекомбінантної ДНК.
2. Методика генетичної трансформації плазмиди бактерії *E. coli*:
  - Помітити 2 мікроцентрифужні пробірки як «+ ДНК» і «- ДНК».
  - Помістити 500 мл розчину охолодженого хлористого кальцію в пробірку «- ДНК».
  - За допомогою зубної палички перемістити 8-10 колоній бактерії *E. coli* із чашки Петрі в пробірку «- ДНК».
  - За допомогою зубної палички перемішати клітини у пробірці «- ДНК».
  - Легко постукати про пробірці «- ДНК».
  - Перемістити 250 мл клітинної суспензії з пробірки «- ДНК» до пробірки «+ ДНК».
  - Помістити обидві пробірки у ємкість з льодом.
  - Додати 10 мл ДНК плаزمіни до пробірки «+ ДНК». Помістити пробірку у ємкість з льодом.
  - Тримати пробірки у ємкості з льодом 10 хвилин.
  - Після того помістити обидві пробірки у водяну баню при температурі 42 градуси за Цельсієм на 90 секунд.
  - Помістити пробірки у ємкість з льодом на 2 хвилини.
  - Додати по 250 мл поживного розчину у обидві пробірки.
  - Пробірки помістити у водяну баню при температурі 37 градусів за Цельсієм на 40 хвилин.
  - Приготувати чашки Петрі з агаром і внести позначення
  - Дістати пробірки з водяної бані по завершенні терміну.
  - Помістити по 250 мл клітинного розчину з кожної пробірки у відповідні позначені чашки Петрі.
  - Перемішати клітини зигзагоподібними рухами на поверхні агару у чашках Петрі.
  - Закрити пробірки і зібрати їх разом для поміщення у інкубатор.
  - Залишити чашки Петрі в інкубаторі при температурі 37 градусів за Цельсієм на ніч.
  - Спостерігати результат вирощених клітин і відмінності.

Зробити висновки

## Лабораторна робота 2

### Методи стерилізації

Мета: ознайомитися з принципами й методами стерилізації, засвоїти правила підготовки посуду й інструментів до стерилізації.

Матеріали й устаткування: вата гігроскопічна, марля (бинт), нитки, ножиці, скляні палички, піпетки градуйовані ємністю 1, 2, 5 і 10 мл, колби конічні й круглі плоскодонні (колби Виноградського, колби Ерленмейєра) ємністю 250, 500, 1000 мл, чашки Петрі, металеві пінцети, крафт-папір, олівці для скла, спиртівки, бактеріологічні петлі, шпатель Дригальського, автоклав, сушильна шафа.

Стерилізація є одним із найважливіших і необхідних прийомів у мікробіологічній практиці. Культивування організмів проводиться обов'язково в стерильних умовах. Під **стерилізацією** розуміють повне знищення живих мікроорганізмів та їх спочиваючих форм (спор) у живильних середовищах, посуді, сухих матеріалах, на інструментах і інших предметах лабораторного устаткування.

Існують різні методи стерилізації: фізичний, механічний і хімічний.

#### **Фізичні методи стерилізації:**

- прожарювання в полум'ї;
- стерилізація сухим жаром (гарячим повітрям у сушильній шафі);
- стерилізація кип'ятінням;
- стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування);
- стерилізація текучою парою;
- дробова стерилізація (тиндалізація);
- пастеризація;
- стерилізація ультрафіолетовим опроміненням.

#### **Хімічні методи стерилізації:**

- дезінфекція антисептиками.

#### **Механічний метод стерилізації:**

- фільтрування за допомогою мембранних фільтрів і фільтрів Зейтца.

Можливість та доцільність застосування того чи іншого способу визначається особливостями матеріалу, що підлягає стерилізації, його фізичними й хімічними властивостями, метою дослідження.

Найчастіше в мікробіологічній практиці застосовується термічна стерилізація.

*Стерилізація випалюванням у полум'ї пальника.* Невеликі скляні й металеві предмети (голка, петля, пінцет, скальпель, палички, шпатель) стерилізують прожарюванням у полум'ї безпосередньо перед використанням. Стерилізація досягається обуглюванням мікроорганізмів, що знаходяться на їхніх поверхнях. Випалюванням у полум'ї користуються для стерилізації поверхні ватних пробок, горла посуду.

*Стерилізація в автоклаві парою під тиском.* Найбільш надійний і універсальний метод стерилізації живильних середовищ і матеріалів – стерилізація насиченою парою під тиском вище атмосферного. Підвищений тиск пари створюється у спеціальних герметично закритих товстостінних апаратах (автоклавах). Предмети, що підлягають стерилізації в автоклаві, загортають у папір. Повна стерилізація живильних середовищ забезпечується нагріванням протягом 20 хвилин за умови  $121^{\circ}\text{C}$  і надлишкового тиску 1 атм.

*Стерилізація кип'ятінням.* Стерилізацію металевих інструментів і гумових трубок проводять кип'ятінням. Спори деяких бактерій зберігають життєздатність під час кип'ятіння у дистильованій воді протягом декількох годин, тому рекомендується стерилізацію кип'ятінням проводити у 2 %-ному розчині карбонату натрію протягом 10 хв. У цих умовах спори гинуть.

*Стерилізація сухим жаром.* Сухим жаром стерилізують в основному скляний посуд. Щоб уникнути зараження предметів, що простерилізовані, із повітря, їх перед стерилізацією загортають в обгортковий папір і виймають із нього тільки перед роботою.

*Стерилізація текучою парою. Дробова стерилізація, або тиндалізація.* Живильні середовища (молоко, солод, желатин), воду, гумові трубки й інші предмети, що псуються від дії сухого жару, піддають стерилізації текучою парою. Стерилізації текучою парою роблять у кип'ятильнику Коха чи в автоклаві з відкритим вентиляем. Воду в них доводять до кипіння, і пара, що утвориться, обтікає об'єкти. Температура живильних середовищ, що стерилізуються, досягає 100°C. Нагрівання протягом 30–45 хвилин приводить до загибелі вегетативних клітин бактерій, але спори їх не гинуть. Наступного дня нагрівання повторюють. За цих умов гинуть вегетативні клітини, що розвилися зі спор. Для забезпечення повної стерильності рідину залишають ще на добу і знову повторюють нагрівання. Таку стерилізацію називають дробною, або тиндалізацією.

*Пастеризація.* В основі пастеризації лежить нагрівання рідин до температури менше 100°C. Мета її – знищення безспорових бактерій у рідинах, що втрачають живильні властивості під час кип'ятіння (молоко, пиво, вино й ін.). Здійснюється пастеризація нагріванням рідин при 60°C упродовж 30 хвилин, чи при 75°C упродовж 15 хвилин, або при 80°C упродовж 10 хв.

*Холодна стерилізація.* Органічні рідини, що не виносять нагрівання, звільняють від бактерій, пропускаючи через стерильні дрібнопористі фільтри. Ці фільтри затримують мікроорганізми, їх називають бактеріальними фільтрами. Бактеріальні фільтри мають різні номери. Фільтри №1 мають середній діаметр пір 0,3 мкм, вони найбільш надійні. Перед уживанням мембранні фільтри стерилізують кип'ятінням. Фільтри поміщають у теплу дистильовану воду і кип'ятять 30 хвилин, змінюючи її 2–3 рази.

Предмети, що виготовлено з термолабільних пластмас, наприклад, центрифужні пробірки, стерилізують ультрафіолетовими променями. Час опромінення встановлюють експериментально. Воно залежить від потужності бактерицидної лампи й відстані між лампою й об'єктом.

### **Хід роботи:**

1. Провести стерилізацію лабораторного інструменту випалюванням у полум'ї пальника.
2. Провести стерилізацію лабораторного інструменту в автоклаві парою під тиском.
3. Провести стерилізацію лабораторного інструменту кип'ятінням.
4. Провести стерилізацію лабораторного інструменту сухим жаром.
  - Посуд перед стерилізацією ретельно миють, висушують і загортають в папір (для збереження стерильності після прогрівання).
  - Кожну піпетку завертають окремо в довгі смужки паперу шириною 4 – 5 см. У широкі кінці піпеток, заздалегідь вставляють ватяні тампони. Обмотку починають з протилежного кінця поступовим рухом паперу по спіралі і закінчують біля кінця з тампоном. Папір повинен щільно охоплювати піпетку. Загорнуті піпетки для оберігання паперу від забруднення і розривів завертають по декілька штук разом або поміщають в спеціальні металеві або картонні пенали.
  - Чашки Петрі загортають разом по 2 – 4 штуки. Колби, пробірки закривають ватяними пробками, а зверху паперовими ковпачками.
  - Посуд, що підготовлений до стерилізації, завантажують в сушильну шафу не дуже щільно, щоб забезпечити циркуляцію повітря та рівномірне прогрівання предметів, що стерилізуються. Відмічають час, коли температура в шафі досягне 165–180°. Підтримують цю температуру протягом двох годин. Якщо шафа не забезпечена терморегулятором, необхідно весь час стежити за температурою, оскільки при пониженні її посуд не простерилізується, а при нагріві вище 180° папір і пробки починають обвуглюватися.

- По закінченні стерилізації вимикають нагрівальний пристрій. Шафу не відкривають до тих пір, поки температура в ній не впаде до 80°, тому що при різкому охолодженні може порушитися стерильність матеріалу і тріснути сильно нагріте скло.

Простерилізований посуд зберігають в закритому, захищеному від пилу місці. Розгортають його безпосередньо перед використанням.

Зробити висновки.

## Лабораторна робота 3

### Живильні середовища для культивування мікроорганізмів

Мета: ознайомитися з різними видами живильних середовищ для культивування мікроорганізмів різних систематичних груп.

Матеріали й устаткування: вата гігроскопічна, марля (бинт), нитки, ножиці, скляні палички, піпетки градуйовані ємністю 1, 2, 5 і 10 мл, колби конічні й круглі плоскодонні (колби Виноградського, колби Ерленмейєра) ємністю 250, 500, 1000 мл, чашки Петрі, металеві пінцети, крафт-папір, олівці для скла, спиртівки (сухе пальне), бактеріологічні петлі, шпателі Дригальського, автоклав, сушильна шафа, різні поживні середовища для культивування мікроорганізмів різних систематичних груп.

*Характеристика живильних середовищ для культивування мікроорганізмів різних систематичних груп.* Мікроорганізми розрізняються з хімічного складу, типу живлення, дихання, способу одержання енергії, розмноження, стійкості до факторів навколишнього середовища. Живлення є найважливішою функцією мікроорганізмів. Як і всім іншим організмам, їм необхідний набір різних хімічних елементів. Для накопичення, виділення, культивування й збереження мікроорганізмів користуються живильними середовищами. До складу цих середовищ включено живильні речовини, що необхідні у здійсненні обміну між бактеріальною клітиною та середовищем. Обмін речовин мікроорганізмів (бактерій) включає два основних процеси – одержання енергії (енергетичний обмін) і біосинтез речовин клітини (конструктивний обмін). Ці два обміни є різними сторонами єдиного метаболізму.

Мікроорганізми повинні бути забезпечені джерелом енергії й одержувати ззовні в необхідних кількостях елементи, що входять у їхній склад для здійснення біосинтезу, розмноження і росту. Це – біогенні (С, О, Н, N); зольні елементи (P, S, K, Mg, Ca, Fe) і мікроелементи, що стимулюють ріст клітинної маси (у малих дозах) – Zn, Mn, B, Cu, Mo, Co і ін.

#### **Хід роботи**

1. Ознайомитися з рецептурами різних натуральних і синтетичних живильних середовищ.

##### *Рідкі живильні середовища.*

1) М'ясну воду готують додаючи до дрібно подрібненого м'яса (без жиру і сухожилля) воду (на 100 г м'яса, 200 мл води) і витримують, періодично перемішуючи, 18-24 години при  $t^{\circ}$  4-6 $^{\circ}$ C, потім кип'ятять 1 годину. Утворилася м'ясну воду фільтрують через полотняний фільтр, кип'ятять до згорання білка і фільтрують через паперовий фільтр.

2) Картопляне середовище використовується для виділення й культивування спороутворюючих амілолітичних бактерій. Для його готування бульби картоплі ретельно промити, очистити від шкірки і дрібно нарізати. 200 г такої картоплі залити 1 л водопровідної води, прокип'ятити протягом 20–30 хв. Відвар профільтрувати через вату і розлити в судини і простерилізувати (1 годину тиском 1 атм чи 30 хвилин тиском 1,5 атм).

##### 3) Приготування м'ясо-пептонного бульйону

Для фільтрування агарових середовищ застосовують ватно-марлевий фільтр. Для його готування скляну лійку покрити марлевою серветкою такої величини, щоб кінці серветки були перекинуті через край лійки назовні, потім на марлю покласти шар гігроскопічної вати і змочити фільтр гарячою дистильованою водою. Агаризоване середовище налити на фільтр у гарячому виді. Процес фільтрації вести в нагрітій водяній бані.

Після фільтрації живильні середовища розливають в судини (колби Ерленмейєра ємністю 250 мл). Наливати треба не вище 2/3 висоти судини. Посуд заздалегідь ретельно миють, висушують, закривають ватно-марлевими пробками, що охороняє середовище від зараження мікроорганізмами, які знаходяться в навколишньому повітрі. Тому пробки повинні бути досить щільними, з рівномірним розподілом волокон вати. Не можна обертати пробки судин, що будуть стерилізуватися в автоклаві, целофаном чи іншими матеріалами, що не пропускають пару. Пара повинна обов'язково проникати через пробку в судину, інакше середовища не нагріються до потрібної температури і не простерилізуються. Посуд необхідно заздалегідь простерилізувати, якщо налити в нього середовища стерилізують текучою парою чи тиском не більш 0,5 атм. Якщо ж живильні середовища стерилізують під тиском вище 1 атм, то попередня стерилізація посуду необов'язкова.

Середовище з агаром нагрівають на киплячій водяній бані до повного його розплавлення. Якщо передбачається вирощування мікроорганізмів на скошеному агаризованому середовищі в пробірках, то кожен пробірочку заповнюють середовищем не більш, ніж на 1/3. Для розливання живильних середовищ користуються лійкою. Потрібно стежити за тим, щоб край пробірок чи флаконів не був змочений живильним середовищем, тому що ватно-марлеві пробки можуть приклеїтись до скла під час стерилізації і будуть важко вийматися, ускладнюючи процес роботи.

Поверх ватно-марлевої пробки на колби й флакони варто надягти паперові ковпачки й підписати назву живильного середовища та дату її готування.

Щоб середовище не підсихало, його скошують після стерилізації, перед посівом. Для цього пробірки з розплавленим на киплячій водяній бані середовищем устанавлюють у похилому положенні і дають середовищу застигти. Скошена агаризоване середовище не повинно доходити до ватної пробки на 4–6 см. Середовище, що призначено для культивування бактерій у чашках Петрі, розливають по 15–20 мл у пробірки більшого об'єму, ніж для скошеного агаризованого середовища чи стерилізують у колбах. В останньому випадку до стерилізації агар не розплавляють.

2) Приготування середовища Ендо. Середовище використовується в першу чергу для виявлення *Escherichia coli*.

40 гр агару Ендо розчити в 1 л дистильованої води, прокип'ятити до повного розчинення агару 2-3 хвилини, профільтрувати і знову довести до кипіння, остудити до температури 45-50 градусів, розлити в стерильні чашки Петрі шаром 3-4 мл, після застигання підсушити при температурі 37 гр. ротягом 40-60 хв. Готове живильне середовище необхідно використати в день приготування. Зберігати висівання у темряві.

Зробити висновки.

## Лабораторна робота 4

### Метод поверхневого і глибинного культивування клітин

Мета: навчитися проводити культивування мікроорганізмів поверхневим і глибинним способами.

Матеріали й устаткування: вата гігроскопічна, марля (бинт), нитки, ножиці, скляні палички, піпетки градуйовані ємністю 1, 2, 5 і 10 мл, колби конічні й круглі плоскодонні (колби Виноградського, колби Ерленмейера) ємністю 250, 500, 1000 мл, чашки Петрі, металеві пінцети, крафт-папір, олівці для скла, спиртівки (сухе пальне), бактеріологічні петлі, шпателі Дригальського, автоклав, сушильна шафа, різні поживні середовища для культивування мікроорганізмів різних систематичних груп.

Культивування можна проводити поверхневим або глибинним, періодичним та безперервним методами, в аеробних або анаеробних умовах.

Спосіб культивування залежить від кінцевої мети культивування: накопичування біомаси або отримання окремого продукту життєдіяльності мікроорганізму (метаболіту).

**Поверхневий метод.** Поверхнєве культивування заключається у вирощуванні аеробних мікроорганізмів на поверхні рідких і твердих поживних середовищ. При цьому мікроорганізми отримують кисень безпосередньо із повітря. У зв'язку з цим при поверхневому культивуванні стараються збільшити площу зіткнення середовища з повітрям. При поверхневому культивуванні на рідких середовищах мікроорганізми ростуть у вигляді плівок (наприклад, при виробництві лимонної кислоти)

**Глибинний метод.** Цей метод культивування використовують на рідких середовищах, в яких мікроорганізми розвиваються по всій товщі. Поєднання поживного середовища і мікроорганізмів, які ростуть в ньому називають культуральною рідиною. Так як мікроорганізми можуть утилізувати тільки розчинний в воді кисень, розчинити кисню у воді невелика, то для забезпечення росту аеробів їх необхідно постійно збагачувати киснем. Процес підведення кисню в глибину рідкого середовища називається аеруванням. Аерування здійснюється шляхом продування стерильного повітря через культуральну рідину.

Глибинний метод широко використовується для отримання біомаси мікроорганізмів (пресовані хлібопекарські дріжджі, кормових дріжджів) і різних продуктів життєдіяльності мікроорганізмів (органічні кислоти, ферменти, антибіотики, амінокислот).

Примусову аерацію в ферментаторах поєднують із перемішуванням середовища за допомогою мішалок, які обертаються із частотою від десятків до тисяч обертів за хвилину. Це забезпечує максимальний контакт клітин із киснем повітря, із поживними речовинами, різко збільшується поверхність стикання клітин і дозволяє підтримувати максимальну швидкість утворення виводу і метаболітів із клітин.

Перевага глибинного культивування заключається у тому, що цей спосіб не потребує великих площ і громіздкого обладнання, об'єм ферментаторів можна збільшити за рахунок збільшення висоти. Перевагою являється також простота обслуговування, можливість автоматизації, а головне, зручність видалення непошкодженого цільного продукту із культуральної рідини.

Глибинний метод застосовують і на твердих поживних середовищах. Він забезпечує виявлення мактерій-анаеробів.

Глибинне культивування мікроорганізмів може бути періодичним або безперервним. При **періодичному** методі культивування весь об'єм поживного середовища засівають чистою культурою і вирощування ведуть в оптимальних умовах відповідний час до накопичення потрібної кількості цільового продукту. Оскільки культивування ведеться на поживному середовищі (в стаціонарних умовах), який не

відновлюється клітини весь час знаходяться в умовах які змінюються. Спочатку мікроорганізми мають усі поживні речовини, а потім поступово їх кількість зменшується і починається отруєння шкідливими продуктами обміну. В зв'язку з цим культура в своєму розвитку проходить чотири ф а з и р о с т у і розмноження, на протязі яких змінюються розміри клітин, швидкість розмноження, морфологічні і фізіологічні властивості.

Перша фаза – лаг – фаза, фаза затримки росту, настає зразу ж після внесення культури мікроорганізмів в живильне середовище. В цій фазі мікроорганізми не розмножуються, а пристосовуються до середовища, проходить підвищення вмісту нуклеїнової кислоти, збільшення розміру. Ця стадія являється підготовкою до подальшого інтенсивного росту і розмноження.

Друга фаза – фаза логарифмічного росту характеризується високою швидкістю розмноження клітин, тому що в середовищі багато живильних речовин і мало шкідливих продуктів обміну. Час, який необхідний для подвоєння числа клітин, називається тривалістю генерації. У сприятливих умовах клітини бактерій діляться кожні 20 – 30 хвилин, їх число збільшується в геометричній прогресії (1,2,4,8,16 і.т.д.).

Третя фаза – стаціонарна (фаза зрілості), коли розмноження мікроорганізмів сповільнюється і швидкість розмноження і відмирання врівноважуються, в результаті чого число клітин остається постійним.

Четверта фаза – фаза відмирання, коли клітини починають гинуть і їх кількість знижується за рахунок відмирання і автолізу.

Періодичне культивування відбувається у багатьох виробництвах, основаних на життєдіяльності мікроорганізмів. Недоліком періодичного культивування являється нераціональні витрати часу на проходження всіх чотирьох стадій розвитку культури, причому період самої активної життєдіяльності – фаза логарифмічного росту – займає невелику частину виробничого циклу.

#### **Хід роботи:**

1. Ознайомитися із поверхневим методом культивування мікроорганізмів на поверхні рідкого і твердого поживного середовища (біомаса розташовується на поверхні середовища).
2. Ознайомитися із глибинним методом культивування мікроорганізмів на поверхні твердого поживного середовища.  
Здійснюємо посів суспензії на поверхні агару у чашці Петрі. Після цього заливаємо поверхню тонким шаром розплавленого і охолодженого до 40 °С агару. Таким чином створюються анаеробні умови та проростають лише мікроорганізми-анаероби.
3. Помістити живильні середовища із посівами мікроорганізмів у термостат при температурі 37 °С.

Зробити висновки.

## Лабораторна робота 5

### Виготовлення мікроскопічних препаратів.

#### Методи фарбування бактерій. Фарбування бактерій за Грамом.

Мета: навчитися виготовляти мікроскопічні препарати, проводити фарбування бактерій.

Матеріали і устаткування: халати, ковпачки, маски, захисні окуляри, латексові рукавиці, мікроскопи, імерсійна олія, предметні та накривні скельця, пастерівські піпетки, бактеріологічні петлі, спиртівки, препарувальні голки, розчин фарб метиленової синьки, фуксину тощо, сінна настойка та мікробні культури, дезінфекційні розчини.

Для виготовлення фіксованих, а також живих мікропрепаратів зазвичай користуються культурами сінної і картопляної паличок (*Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, які виготовляють за кілька днів до занять. Під час виконання лабораторної роботи необхідно дотримуватися певних правил з техніки безпеки при роботі з живими культурами мікроорганізмів, а саме:

- Не тримати на робочому столі сторонніх предметів,
- Відкривати та закривати пробірку з мікроорганізмами необхідно виключно у полум'ї пальника,
- Під час виготовлення препарату пробку необхідно затиснути одночасно мізинним і безіменним пальцями, а не затискати пробку між ними.
- Відкрити пробірку з мікроорганізмами необхідно тримати над полум'ям пальника, нахилена під невеликим кутом, отвором вгору,
- Під час виготовлення препарату предметне скло тримати виключно за грані,
- Скло з незафіксованими мікроорганізмами повинно знаходитися виключно за полум'ям пальника,
- Залишки культури мікроорганізмів спалити у полум'ї пальника та ретельно простерилізувати усю петлю.
- Після закінчення роботи ваткою, змоченою 70° етиловим спиртом, протерти поверхню стола та вимити руки.

Мікроскопічні препарати бувають двох видів.

1. Живі (нативні) у вигляді препаратів «висяча крапля» і «роздушена крапля».
2. Фіксовані або вбиті.

1. *Вивчення мікроорганізмів у живому стані* найчастіше проводять на мікроскопічних препаратах «Роздушена крапля» або «Висяча крапля».

2. *Вивчення мікроорганізмів у фіксованому стані* проводять під імерсійним збільшенням мікроскопа на мікропрепаратах, які готують у такій послідовності:

- виготовлення мазка культури або мазка-відбитка;
- підсушування мазка до повітряного сухого стану;
- фіксація мазка, яку здійснюють високою температурою (на полум'ї спиртівки або газового пальника) або хімічними речовинами (метанолом, етанолом, ацетоном, спирт-ефіром та іншими речовинами); фіксацією мазка досягаємо а) знезараження бактерій; б) денатурації білку бактерій, що полегшує сприймання бактеріальною клітиною барвників; в) кращого прилипання мікробів до поверхні предметного скла.

— фарбування, яке може бути простим, коли застосовують лише один барвник, і складним, коли застосовують два і більше барвників (фарбування бактерій за Грамом, мікобактерій за Ціль-Нільсеном, спор за Пешковим і т.д.);

- промивання;
- підсушування;
- розглядання під великим збільшенням мікроскопа.

Прокаріотні мікроорганізми можна поділити на дві групи – грам позитивні і грам негативні. Така назва з'явилася після запропонованого у 1884 році датським вченим Г. Грамом диференціального методу забарвлення бактерій, за яким одні бактерії забарвлюються у синьо-фіолетовий колір (**грампозитивні**), а інші бактерії забарвлюються у червоний або рожевий колір (**грамнегативні**).

Сутність цього методу полягає в тому, що комплекс генціанового **фіолетового** барвника (генціанвіолет) з йодом після обробки мазка **спиртом утримується** клітинними покривами *одних* бактерій і вимивається з **покривів** інших. Для визначення такої здатності необхідно **використовувати** додатковий барвник, яким обрано контрастний – червоний (**фуксин**). Здатність забарвлюватися або не забарвлюватися у синьо-фіолетовий колір відображає фізичні властивості клітинної стінки мікроорганізмів. Після проникнення у клітину розчинна хлорна форма генціан-віолету переходить у нерозчинну йодну форму і випадає в осад. При цьому цитоплазма клітини забарвлюється у синьо-фіолетовий колір.

Наступна обробка препарату розчинником (етиловий спирт, ацетон) екстрагує ліпіди із цитоплазматичної мембрани, що призводить до підвищення її пористості. Таким чином, мембрана не є перешкодою для вимивання комплексу генціан-віолет-йод. Тому прокаріоти, у яких клітинна стінка складається із моношару муреїну із крупними порами, клітини втрачають комплекс генціан-віолет-йод і забарвлюються у червоний колір, тобто негативно за Грамом. Прокаріоти, у яких клітинна стінка має багатшаровий монопористий муреїновий шар, комплекс генціан-віолет-йод не вимивається після обробки спиртом, а тому вони зберігають синьо-фіолетовий колір, тобто забарвлюються у грампозитивно.

#### **Хід роботи:**

1. Виготовлення мікропрепарату «роздушена крапля».

На чисте знежирене скло наносять 18-годинну культуру *Bacillus mesentericus* краплю огіркового розсолу або крапельку суспензії іншої досліджуваної культури. Накривають покривним скельцем; надлишок рідини збирають фільтрувальним папером і розглядають під об'єктивом \*40.

2. Виготовлення мікропрепарату «Висяча крапля».

На покривне скельце наносять краплю досліджуваної культури. Краї ямки на предметному склі змазують вазеліном або якоюсь олією (можна імерсійною). Предметне скло обережно накладають на покривне скельце таким чином, щоб крапля досліджуваної культури розмістилася по центру ямки предметного скла, але не торкалася країв ямки.

Предметне скло із прикріпленим до нього покривним скельцем обережно перевертають, кладуть на предметний столик мікроскопа, наносять краплю імерсійної олії на покривне скельце і розглядають під імерсійним об'єктивом.

3. Простий метод фарбування мікропрепаратів.

Готують мазок культури *Bacillus subtilis* (сінна паличка), висушують, фіксують у полум'ї пальника та для забарвлення наносять розчин *метиленової синьки* (час контакту з клітинами ~ 3-5 хв.), промивають водою і розглядають під імерсійним об'єктивом.

Можна використати інші барвники, наприклад *фарбу Ребігера*, яка є розчином генціанвіолету у формаліні. Для фарбування цією фарбою не потрібно фіксувати препарат, а просто після висихання його нанести фарбу на 15-20 сек. І добре промити водою.

4. Фарбування мікропрепаратів за Грамом.

На зафіксований мікропрепарат кладуть фільтрувальний папір і на нього наносять генціановий фіолетовий барвник так, щоб папір повністю був зволожений барвником. У разі нещільного прилягання паперу до скла, легко натиснути на папір пінцетом.

Через 2 хв. папір знімають і на препарат наносять розчин Люголя на 2 хв. Розчин Люголя зливають й обробляють препарат 96° етиловим спиртом 30-60 сек. або йодований спирт — на 2 хв. Препарат промивають до чистої води і дофарбувати фуксином протягом

2 хв. Барвник змивають водою, препарати висушують та мікроскопують під імерсійним об'єктивом.

Зробити висновки

## Лабораторна робота 6

### Методика виділення мікотичної культури із наступною оцінкою її антибіотичної активності

Мета: Навчитися виділяти мікотичну культуру методом водно-грунтових розведень із наступною оцінкою її антибіотичної активності.

Матеріали і устаткування: ґрунт, мікропіпетка, ваги, пінцет, чашки Петрі (6), пробірки (10), тверді живильні середовища: Чапека, сусло-агар, дистильована вода (10 мл), олівці для скла, спиртівки (сухе пальне), бактеріологічні петлі, шпателі Дригальського.

#### Хід роботи:

Оволодіти методикою виділення мікотичної культури методом водно-грунтових розведень із наступним висівом на тверді живильні середовища: Чапека, сусло-агар.

1. 1 мг ґрунтового субстрату помістити у пробірку у із 10 мл дистильованої води. Ретельно перемішати субстрат і воду.
2. Провести послідовне розведення отриманої суспензії у 10 пробірках, додаючи по 1 мл до кожної наступної пробірки із попередньої пробірки. Тобто 1 мл суспензії додаємо з першої пробірки до другої, далі 1 мл суспензії додаємо з другої пробірки до третьої, і так далі до десятої пробірки. В кожній наступній пробірці концентрації ґрунту у воді стає меншою. Під час проведення розведень проводити заходи стерилізації.
3. З кожної з останніх п'яти пробірок провести висів по 0,1 мл суспензії на живильне середовище у чашці Петрі.
4. Розподілити суспензію на поверхні живильного середовища в кожній із чашек Петрі і залишити на 24 години в термостаті при температурі 37 градусів за Цельсієм.
5. Через 24 години спостерігати різні типи колоній.
6. Додати тестовий організм (*Aspergillus niger*) і залишити на 24 години в термостаті при температурі 37 градусів за Цельсієм.
7. Спостерігати зони гальмування бактеріального росту, зони пониженого росту бактерій, мікотичну культуру із антибіотичною активністю.
8. Визначити антибіотичну активність мікотичної культури, виходячи з того, що високоактивними вважають культури, у яких зона затримки росту мікроорганізму становить 25 мм і більше, помірно активними культурами зважають із зоною затримки росту 10-25 мм і слабоактивними – із зоною менш 10 мм.

Оволодіти методикою виділення мікотичної культури методом висіву дрібноземом.

1. Висів ґрунтових грудочок проводиться безпосередньо на живильне середовища (наприклад, сусло-агар) у чашці Петрі. Для цього 10- 15 грудочок ґрунту розміром  $\leq 1$  мм стерильним пінцетом рівномірно наносять на відстані 1-2 см один від одного на поверхні середовища.
2. Чашку Петрі із висіяною культурою залишити на 24 години в термостаті при температурі 37 градусів за Цельсієм.
3. Спостерігати зони гальмування бактеріального росту, зони пониженого росту бактерій, мікотичну культуру із антибіотичною активністю.

Зробити висновки.

## Лабораторна робота 7

### Визначення дії антибактеріальної речовини на культуру бактерій E.coli, Staphylococcus

Мета: навчитися визначати дію антибіотиків на культуру бактерій E.coli, Staphylococcus та змішаної.

Матеріали і устаткування: бактерії E.coli, Staphylococcus, мікропіпетка, пінцет, чашки Петрі (1), живильне середовище (м'ясо-пептонний агар), пробірки, спиртівки, бактеріологічні петлі, шпателі Дригальського, антибіотики на паперових дисках, термостат.

#### Хід роботи:

1. Зробити суспензії E.coli, Staphylococcus та змішаної на м'ясо-пептонному бульйоні в пробірках.
2. Висіяти бактеріальну культуру E.coli, Staphylococcus та змішаної на живильне середовище та відібрати залишки.
3. Помістити висіяні культури в термостат на 20-30 хв.
4. Помістити антибіотики на дисках на висіяні культури.
5. Чашки Петрі із висіяними бактеріальними культурами E.coli, Staphylococcus та змішаної і антибіотиками на дисках залишити на 24 години в термостаті при температурі 37 градусів за Цельсієм для інкубування.
6. Спостерігати зони гальмування бактеріальних культур E.coli, Staphylococcus та змішаної довкола антибіотиків на дисках.
7. Замалювати одержані результати щодо гальмування росту бактеріальних культур E.coli, Staphylococcus та змішаної в результаті дії антибіотиків.

Зробити висновки.

## Лабораторна робота 8

### Методика трансплантації тканин і органів

Мета: Ознайомитися з методикою трансплантації тканин і органів людини.

Об'єкт: людина

Багато хвороб, в тому числі, що загрожують життю людини, пов'язані з порушеннями в діяльності конкретного органу (наприклад, ниркова недостатність, серцева недостатність, цукровий діабет та ін.). Далеко не у всіх випадках ці порушення можна виправити за допомогою традиційних фармакологічних або хірургічних впливів.

Існує ряд альтернативних шляхів для відновлення функцій органів пацієнтам у разі тяжкого ураження:

Стимуляція процесів регенерації в організмі.

Заміна функцій органів за допомогою апаратів не біологічного походження

Використання донорських органів

Вирощування органів.

Сучасні технології регенеративної медицини мають потенціал для посилення функції органів або для ремонту пошкодженого органу або для відновлення пошкоджених органів та тканин. Дослідники вивчають можливі варіанти регенеративної медицини в трансплантації органів, так що об'єднання двох полів може принести користь один одному.

Донорські органи, що пересаджують від однієї людини до іншої, вже широко і часто успішно застосовуються в клінічній практиці. Однак цей напрямок стикається з низкою проблем, таких, як серйозний дефіцит донорських органів, проблема реакції відторгнення чужого органу імунною системою і ін.

Більшість пожертвувань органів і тканин відбувається після того, як донор помер. Але деякі органи та тканини можна пожертвувати, поки донор живий. Щороку відбувається приблизно 4 живих пожертвувань з кожних 10. Більшість живих пожертвувань відбувається між членами сім'ї або між близькими друзями. Деякі люди стають альтруїстичними живими донорами, вирішивши пожертвувати комусь, чого вони не знають.

Незважаючи на розвиток і успіхи трансплантології, назріла необхідність створення *in vitro* штучних органів, які змогли б стати альтернативою донорським органам. Для лікування термінальної стадії хронічної серцевої недостатності можна було би використовувати тканеінженерне серце в якості трансплантата, що дозволило б уникнути призначення імуносупресивної терапії і істотно прискорити час очікування донорського серця.

Розробка методик створення подібних органів - досить тривалий процес, що вимагає всебічного вивчення та виборів способів отримання тканеінженерних каркасів, їх морфологічних, механічних властивостей, можливості їх подальшої рецелюляризації і впливу, яке дані матриксу надаватимуть на стовбурові клітини]. У розвитку сучасної тканинної інженерії пріоритетним напрямком є розробка біоінженерних каркасів і біоматеріалів, застосування яких дозволило б вирішувати як етичні, так і імунологічні проблеми трансплантології. Каркас тканеінженерного органу не повинен викликати імунного відторгнення при трансплантації, а також мати токсичність по відношенню до засіяних на нього клітин і організму-реципієнту,

Один з найбільш розроблених способів отримання каркасів для тканеінженерних органів - децелюляризація, тобто видалення клітин з нативних органів, в результаті чого отримують близькі до нативним органам за складом і властивостями матриксу. Далі новоутворені конструкції рецелюляризують аутологічними стовбуровими клітинами. Таким чином, отримують тканеінженерні органи, що складаються, як і нативні, з стромы (донорської) і паренхіми, утвореної з клітин самого пацієнта. Надалі донорський

децеллюляризований каркас може піддаватися біодеградації, заміщаючи новоствореним стовбуровими клітинами позаклітинним матриксом.

### **Хід роботи**

Демонстрація навчальних фільмів:

1. Методика трансплантації органа (нирки).
2. Decellularizing and Growing Organs.
3. Методика трансплантації тканин (шкіри).

Зробити висновки.

## Лабораторна робота 9

### Біотехнологія 3d друку органів і тканин

Мета: Ознайомитися з *біотехнологією 3d друку органів і тканин*.

Об'єкт: людина

Технологію виготовлення фізичних тривимірних об'єктів із використанням цифрових даних розробив американець Чарльз Халл у 1984 році. Через два роки її запатентували і дали назву «Стереолітографія». Після цього винахідник заснував компанію 3D Systems і розробив перший промисловий апарат для 3D-друку, але тільки у 2000-х почалася активна інтеграція адитивних технологій у медицину.

У сучасній медицині застосування тривимірних технологій розвивається в кількох напрямках. Зокрема це сканування органів за допомогою комп'ютерної томографії (КТ) та магнітно-резонансної томографії (МРТ). Переваги тривимірних знімків перед площинними очевидні: під час 3D-сканування фахівець може виявити приховані проблеми і згодом призначити пацієнтові прицільніше лікування та запобігти розвитку тяжких захворювань. Також створюються 3D-моделі органів, які дають змогу вивчити патологію і попрактикуватися перед проведенням операції. Крім того, активно створюються імпланти на основі тривимірних зображень за допомогою 3D-принтерів, розробляються технології створення штучних кісток, тканин, кровоносних судин і органів. І якщо першими двома позиціями використання 3D-друку вже нікого не здивуєш, то надруковані на принтері органи та кістки й досі лишаються якщо не фантастикою, то екзотикою, прекрасним технологічним майбутнім, у яке крокує світова медицина.

#### Хід роботи

Демонстрація навчальних фільмів.

1. Antony Atala's lecture
2. What We Can Print Out In 3D In Medicine

**Переклад відео:** Давайте подивимося, що ми можемо роздрукувати в 3d. Ми живемо в час 3d друку, що є насправді революційною технологією. Такі компанії, як Органово або 3D Systems зробили значний прорив в останні кілька років. Це не може бути далеко від повсякденного використання. Ми можемо роздрукувати медичні пристрої, обладнання, потім пізніше біоматеріали, тканини, органи, клітини і навіть ліки.

Давайте подивимося зараз приклади, що ми можемо роздрукувати на практиці вже сьогодні. Перші 3d принтери просто стали доступні у великих магазинах США. А тепер з кресленнями все більше і більше об'єктів можна роздрукувати, і є все більше і більше сканерів, які можна використовувати для створення креслень цих об'єктів у реальному житті.

Але давайте почнемо з простіших речей, предметів і медичного обладнання. Є організація, яка називається Not possible Labs, що базується в Каліфорнії. Вона поставляє 3d принтери в Судан, де хаос війни залишив багатьох людей без кінцівок. І тепер вони можуть друкувати кінцівки і дешевше їх протезувати. У сільській клініці у Болівії вони можуть використовувати 3d принтер для створення індивідуальних протезів таким чином.

Відносно біоматеріалів, тканин - вже є досвід друку кровоносних судин, серцевого клапана, вушного хряща, синтетичної шкіри. І ми побачимо все більше і більше прикладів, коли біоматеріали друкуються в 3d. Компанія Органово друкує тканини печінки, які є повністю функціональними. Ці повнофункціональні тканини печінки можуть бути використані для тестування токсичності лікарських засобів. І тепер вони мають нове партнерство з Єльським Університетом щоби переконатися, що фармацевтичні компанії

могли би використовувати ці тканини печінки, роздруковані в 3d, для тестування ліків, а не використовувати тварин у лабораторіях.

Друк трансплантованих людських органів може назавжди ліквідувати листи очікування. Спочатку ми можемо розраховувати побачити друківані простіші органи, як шкіра, серце, сечовий міхур, а потім більш складні. Але давайте зосередимося на ліках. Що, якби ми могли роздрукувати ліки в 3d? Шотландська група під керівництвом Лі Кронін працювала над цим. Вони хочуть, щоб пацієнти зверталися до лікаря і отримували рецепт у вигляді моделі препарату. Правильний персоніфікований лікарський препарат у відповідних дозуваннях може бути роздрукований в 3d при аптеці. Ціла індустрія фармацевтичних препаратів може змінитися через цю нову технологію.

Ви можете бачити, що 3D-друк є однією з тих тенденцій або технологій, які мають потенціал для кардинального перетворення практичної медицини і надання медичної допомоги вже сьогодні.

## Лабораторна робота 10

### Фракціонування клітинного екстракту методом диференціального центрифугування

Мета: Навчитися профедити фракціонування клітинного екстракту методом диференціального центрифугування

Матеріали і устаткування: гомогенізатор Поттера-Елведжема, марля, центрифуга.

#### Хід роботи:

1. Гомогенізація досліджуваного зразка. Для того щоб виділити клітинні органели, досліджуваний зразок подрібнюють і потім гомогенізують в забуференому середовищі з використанням гомогенізатора Поттера-Елведжема (тефлоновий товчач, що обертається в скляному циліндрі). Це порівняно м'який метод, який особливо кращий для виділення лабільних молекул і ультраструктур. Інші методики руйнування клітин включають ферментативний лізис, що руйнує клітинні стінки, або механічне руйнування заморожених тканин (помелом або за допомогою обертових ножів; під великим тиском; осмотическим шоком; багаторазовим чергуванням заморожування і відтавання).

Для виділення інтактних органел важливо, щоб середовище, в якому проводиться гомогенізація, було ізотонічним, тобто осмотичний тиск буфера повинний відповідати тиску в середині клітини. Якщо розчин гіпотонічний, органели будуть «вбирати» додаткову воду і лопнуть, а в гіпертонічних розчинах вони, навпаки, зморщуватимуться.

2. Фільтрування досліджуваного зразка. Слідом за гомогенізацією слід провести фільтрування через марлю для видалення інтактних клітин і сполучних тканин.

3. Диференційне центрифугування. Диференціальне центрифугування – це центрифугування при різних швидкостях обертання ротора. При цьому поступове збільшення відцентрової сили (величина, обернена нормальному прискоренню вільного падіння  $g = 9,81 \text{ м / с}^2$ ) призводить до послідовного осадження різних органел, тобто їх поділу відповідно до щільності і розміром. Ядро седиментує вже при прискоренні, що досягається за допомогою настільних центрифуг. Декантування супернатанта і ретельне повторне ресуспендування осаду дає фракцію, збагачену клітинними ядрами. Однак ця фракція все ще містить інші клітинні компоненти в якості домішок, наприклад фрагменти цитоскелету.

Осадження частинок менших розмірів і менш щільних, ніж ядро, отримують при поступовому збільшенні прискорення. Ця операція проводиться на більш потужних центрифугах, таких, як високошвидкісні центрифуги з охолодженням і ультрацентрифуги. Порядок осадження фракцій наступний: мітохондрії, потім мембранні пухирці (везикули) і рибосоми. Супернатант останнього центрифугування являє собою «цитозоль», тобто розчинні компоненти клітини, що перейшли при гомогенізації тканини в буферний розчин.

Виділення клітинних органел зазвичай проводять при низьких температурах ( $0-5^{\circ}\text{C}$ ) для того, щоб зменшити ступінь деградації матеріалу за рахунок реакцій, що каталізуються ферментами; останні вивільняються в процесі руйнування тканини. Додавання тіолів і хелатуючих агентів необхідно для захисту функціональних SH-груп від окислення.

4. Контроль чистоти фракцій за допомогою молекул-маркерів. У процесі фракціонування важливо контролювати чистоту фракцій. Присутність в певній фракції тієї чи іншої органели і наявність інших компонентів визначають за допомогою молекул-маркерів. Зазвичай це органелоспецифічні ферменти (ферменти-маркери). Розподіл ферментів-маркерів у клітині відображає локалізацію в ній відповідних каталітичних реакцій.

Зробити висновки.

## Метод мікроскопії при дослідження клітин тваринного походження

**Мета:** ознайомитися із методикою світлової мікроскопії і фарбування при дослідження клітин тваринного походження

**Матеріали і устаткування:** світловий мікроскоп, барвник, спиртівка, фільтрувальний папір, дистильована вода, ватні палички, латексні рукавиці, імерсійна олія, предметні і покривні скельця, розчин барвника Майн-Грюнвальда, Гімза-Романовського (5 крапельна 1 мл води).

**Об'єкт дослідження:** людина

Розмір клітин здебільшого становить від 0,001 до 0,1 мм, а відтак їх не можна побачити без мікроскопа. Більш того, клітини настільки малі, що їх будову неможливо не тільки вивчити, але й навіть зрозуміти без спеціальних збільшувальних приладів. Саме тому головним методом дослідження клітин є мікроскопія (від грец. мікрос – дрібний і скопус – бачу) – вивчення мікроб'єктів за допомогою спеціальних приладів – мікроскопів.

Світлова мікроскопія. Відкриття клітинної будови всіх живих істот сталося завдяки винайденню світлового мікроскопа, у якому використовується збільшувальна здатність опуклих скляних лінз. Цей прилад збільшує зображення дрібних предметів щонайбільше у 2 000 разів. В основу світлової мікроскопії покладено оптичні властивості світла. Межі роздільної здатності мікроскопа (тобто розмір найменшого об'єкта, який можна побачити за допомогою цього приладу) визначаються довжиною світлової хвилі, а тому частки, коротші за довжину світлової хвилі, у звичайний мікроскоп розглянути неможливо.

Здебільшого структури клітини безбарвні, тому у світловій мікроскопії застосовують спеціальні барвники, що роблять зображення окремих деталей клітини кольоровим, чітким і контрастним, зокрема надають можливість розглянути ядро та інші органоїди. Однак при цьому вбивається клітина. Саме тому головними факторами, що обмежували розвиток досліджень клітини, були не лише недосконалі мікроскопи, а й те, що вивчалися фіксовані, неживі матеріали. Останнє унеможливило спостереження за процесами, що відбуваються в клітинах.

Новітні технології дозволяють вести мікроскопічні дослідження живих клітин. До того ж сучасні мікроскопи поєднані з комп'ютерами, які здатні давати об'ємне зображення.

Хід роботи:

I. Методика фарбування клітин тваринного походження.

1. Одержання зразка клітини епідермісу ротової порожнини за допомогою ватної палички.
2. Перенесення клітин епідермісу на предметне скло. Огляд клітин у світловий мікроскоп.
3. Фіксація зразка метанолом.
4. Забарвлення зразка барвником Майн-Грюнвальда, Гімза-Романовського (5 крапельна 1 мл води) і повторний огляд у мікроскоп.

Зробити висновки

## **Практична робота 1**

### **Збереження біорізноманіття життя: банк біоматеріалів**

1. Збереження біорізноманіття життя: банк біоматеріалів. Методи кріоконсервації сперматозоїдів, яйцеклітин, ембріонів і культивованих клітин. Банки біологічних зразків і генетичного матеріалу.
2. Методи і уніфікація забору та зберігання біоматеріалу. Біотехнологія генофонду - кріоконсервування і кріозбереження.
3. Кріоконсервування тканин для трансплантації органів і тканин. Використання методу кріоконсервування як потенційне джерело для клітинної терапії широкого спектра захворювань.
4. Особливості кріозбереження рослинних клітин і насіння: підсумки і перспективи кріопротектори в кріозбереження рослинних організмів.
5. Розробка ефективних умов кріоконсервування вищих і нижчих грибів, аспорогенних анаеробних бактерій і ін.

## **Практична робота 2**

### **Характеристика біооб'єктів рослинного і тваринного походження**

1. Об'єкти медичної біології - віруси, бактерії, гриби,
2. клітини (тканини) рослин, тварин і людини,
3. речовини біологічного походження (ферменти, лектини, нуклеїнові кислоти),
4. первинні і вторинні метаболіти.

## **Практична робота 3**

### **Методи медичної біотехнології**

1. Методи для отримання чистих продуктів: колоночная і тонкошарова хроматографія, електрофорез.
2. Створення нових біооб'єктів методами клітинної інженерії.
3. Мікроскопічні методи дослідження в біології.
4. Основні технологічні рішення, пов'язані з використанням холоду для фармацевтики, харчової галузі та різних напрямків медицини.

## РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В. Н. Анисимов. – СПб. : Наука, 2003. – 468 с.
2. Асланян М. М. Удивительная история овечки Долли. О клонировании позвоночных животных / М. М. Асланян // Биология в школе. – 1988. – №1. – С.5–10.
3. Біотехнологія рослин. М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах; за ред. В. Д. Мельничука. – К.: Вища освіта, 2003. – 520 с.
5. Великий М.М. Медична біотехнологія: генна терапія // Матеріали конференції “Новітні досягнення біотехнології”, Київ. – 2010. – С. 14-15.
7. Войтенко В. П. Системные механизмы развития и старения / В. П. Войтенко. – Л. : Наука, 1986. – 182 с.
8. Глик Б. Молекулярная біотехнологія : принципы и применение/ Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
10. Денісов В. К. Трансплантологія / В. К. Денісов. К. : Наук. думк., 1998. – 186 с.
11. Дмитренко Г. Н., Гвоздяк П. И. Биотехнология очистки высококонцентрированных сточных вод от органических растворителей // Химия и технология воды. – 2002. – 24, №2. – С. 185-190.
12. Дранник Г. Н. Клінічна імунологія і алергологія / Г. Н. Дранник. – Одеса : Астро Прінт, 1999. – 58 с.
13. Ермишин А. П. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А. П. Ермишин и др.; под ред. А. Л. Ермишина. – Минск. : Тэхналогія, 2005. – 430 с. – ISBN 985-458-1187.
14. Закон України “Про трансплантацію органів та інших анатомічних матеріалів людини”// Законодавство України про охорону здоров’я. – К. : Юрінком-Інтер, 2000. – С. 367–374.
15. Зеленин А. В. Введение в геномику растений / А. В. Зеленин, Е. Д. Бадаева, О. В. Муравенко // Молекулярная биология. – 2001. – Т. 35. – №3. – С. 339–348.
16. Зеленин А. В. Генная терапия и проблемы генетической безопасности / Зеленин А. В. // Генетика. – 1999. – Т. 38. – № 12. – С. 56–62.
17. Игнатъев И. Генетически модифицированные организмы и обеспечение биологической безопасности / Иван Игнатъев, Илья Тромбицкий, Анжела Лозан. – Кишинев : Экоспектр-Бендеры, 2007. 60 с.
18. Кравців Р. Й. Генетична інженерія : навчальний посібник / Р. Й. Кравців, А. Г. Колотницький, В. І. Буцяк. – Львів : Львівська національна академія ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького, 2008 – 2007. – 214 с.
22. Курило Л. Ф. Этико-правовые аспекты использования стволовых клеток человека / Курило Л. Ф. // Человек. – 2003. – № 3. – 23–27.
24. Кучук Н. В. Генетическая инженерия растений / Н. В. Кучук. – К. : Наук. думка, 1998. – 152 с.
25. Кучук Н. В. Генетична інженерія – входження в біологічну еру / Н. В. Кучук // Вісник НАНУ. – 1998. – №3–4. – С. 28–34.
26. Мельничук М. Д. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник / М. Д. Мельничук, О. Л. Кляченко, В. В. Бородай, Ю. В. Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д. Ю., 2014. – 252 с.
27. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія: підручник / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
33. Попова Т. Е. Биотехнология и социум / Т. Е. Попова, Е. В. Попова. – М. : Наука, 2000. – 108 с.
34. Пузік В. К. Культура ізольованих органів, тканин і клітин в біотехнології рослин / В. К. Пузік. – Харків: Харк. держ. аграр. ун-т ім. В. В. Докучаєва, 1997. – 98 с.
35. Репін В. С. Ембріональні стовбурові клітини: фундаментальна біологія та медицина / В. С. Репін, А. А. Ржанінова, А. А. Шаменко. – М. : [б. и.], 2002. – С. 121–125.

36. Ткачова Л. Актуальні проблеми генної інженерії / Л. Ткачова // Хімія. Біологія. – 2000. – №40. – Т. 100. – С. 7–8.
39. Фролькис В. В. Старение и увеличение продолжительности жизни / В. В. Фролькис. – Л. : Наука, 1988. – 237 с.
40. Фролькис В. В. Старение. Эволюция и продление жизни / В. В. Фролькис, Х. К. Мурадян. – Київ: Наукова думка, 1992. – 336 с.
41. Хрисанфова Е. Н. Основы геронтологии (Антропологические аспекты) : учебник для вузов / Е. Н. Хрисанфова. – М. : Владос, 1999. – 151 с.
42. Шевчук Е. Н. Философско–этические последствия клонирования человека / Е. Н. Шевчук. – Одесса : ЛАТСТАР, 2001. – С. 89–124. – (Социально–правовые аспекты клонирования человека).
43. Юлевич О. І. Біотехнологія: навчальний посібник / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль; за ред. М. І. Гиль. – Миколаїв: МДАУ, 2012. – 476 с.
45. Conner A. J. The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment / A. J. Conner, T. R. Glare, J. P. Nap. // The Plant J. – 2003. – Vol. 33. – P. 19–46.
46. Clark D.P., Pazdernik N.J. Biotechnology. – Amsterdam: Elsevier Inc., 2012 – 767 p.
47. Davic K. Cracking the Genome / Davic K. – N.Y. : The Free Press, 2001. – 260 p.
48. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria / Broothers W., Mitchell H. J., [ et al.] // Nature. – 2005. – Vol. 433. – P. 629–633.
49. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria / Broothers W., Mitchell H. J., [ et al.] // Nature. – 2005. – Vol. 433. – P. 629–633.
50. Initial Sequencing and Analysis of the Humen Genome / Lander E. S., [ et all.] // Nature. – 2001. – № 6822. – Vol. 39. – P. 860–921.
51. Phillips, T. (2008) Genetically modified organisms (GMOs): Transgenic crops and recombinant DNA technology. Nature Education 1(1):213.
52. Tuch B.E (2006). "Stem cells—a clinical update". Australian Family Physician. 35 (9): 719–21. PMID 16969445.
53. Verma I.M., Weitzman M.D. Gene therapy: twenty-first century medicine // Annual Rev. Biochemistry – 2005. – V.74. – P. 711-738.

### **Інформаційні ресурси:**

Stem Cell Information // National Institute of Health. U.S. Department of Health&Human Services. URL: <https://stemcells.nih.gov/info/basics/1.htm>

What are Stem Cells // Medical News Today. URL: [www.medicalnewstoday.com/info/stem\\_cell](http://www.medicalnewstoday.com/info/stem_cell)

What is a Stem Cell? // Canadian Stem Cell Foundation. URL: <http://stemcellfoundation.ca/en/about-stem-cells/what-is-a-stem-cell/>

Stem Cells // Wiley Online Library. URL: <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/journal/15494918>

Досягнення трансплантології в Україні і в світі // Асоціація кріобанків пуповинної крові, інших тканин і клітин людини. URL: <http://stemcellbank.org.ua/>

What is Cloning // Genetic Science Learning Center. URL: <https://learn.genetics.utah.edu/content/cloning/whatiscloning/>

The History of Cloning // Genetic Science Learning Center. URL: <https://learn.genetics.utah.edu/content/cloning/>

Cloning // National Human Genome Research Institute. URL: <http://www.genome.gov/25020028/cloning-fact-sheet/>

Cloning Dolly the sheep // Animal Research. Info. URL: [www.animalresearch.info/en/medical-advances/timeline/cloning-dolly-the-sheep/](http://www.animalresearch.info/en/medical-advances/timeline/cloning-dolly-the-sheep/)

Cloning // Internet Encyclopedia of Philosophy. URL: [www.iep.utm.edu/cloning/](http://www.iep.utm.edu/cloning/)

The Genetic Engineering Process. What is GMO // Institute for Responsible Technology. URL: <https://responsibletechnology.org/the-ge-process/>

GMO legislation // European Commission. URL: [ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation\\_en](http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation_en)  
Transplantation and Donation // U.S. National Library of Medicine. URL:  
<https://medlineplus.gov/transplantationanddonation.html>  
База знаний по биологии человека <http://humbio.ru/>  
SpringerLink's eBook collection – Education  
<https://link.springer.com/search?package=41171&date-facet-mode=in&facet-start-year=2018&previous-start-year=1924&facet-end-year=2018&previous-end-year=2019>  
John Wiley & Sons <https://www.onlinelibrary.wiley.com/>