

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

ГЕНЕТИКА

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до вивчення дисципліни, виконання
контрольної і лабораторних робіт
для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія»
заочної форми навчання**

Всі цитати, цифровий та фактичний
матеріал, бібліографічні відомості
перевірені. Написання одиниць
відповідає стандартам

Підпис автора _____

« ____ » _____ 2009 р.

СХВАЛЕНО

на засіданні кафедри
біотехнології мікробного синтезу
Протокол №6
від 26.11.2009 р.

Київ НУХТ 2009

Генетика: Метод. вказівки до вивч. дисципліни, викон. контрол. і лабор. робіт для студ. напрямку 6.051401 «Біотехнологія» заоч. форми навчання / Уклад.: О.І. Скроцька. – К.: НУХТ, 2009. – 42 с.

Рецензент **О.В. Карпов**, д-р біол.наук

Укладач: **О.І. Скроцька**, канд. біол. наук

Відповідальний за випуск **Т.П. Пирог**, д-р біол. наук, проф.

ЗМІСТ

ЗМІСТ.....	3
1. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ.....	4
2. ЗМІСТ ЗАНЯТЬ З ДИСЦИПЛІНИ.....	6
2.1 Лекційні заняття.....	6
2.2 Лабораторні заняття.....	12
3. ПИТАННЯ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ДО ІСПИТУ.....	13
4. ВИМОГИ ДО ВИКОНАННЯ КОНТРОЛЬНИХ РОБІТ.....	14
5. ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ.....	18
5.1 Правила роботи у мікробіологічній лабораторії.....	18
5.2 Лабораторна робота № 1. Визначення титру бактерій та бактеріофагів.....	20
5.3 Лабораторна робота № 2. Мутагенез у мікроорганізмів. Фізичні фактори мутагенезу.....	28
5.4 Лабораторна робота № 3. Виділення плазмідної ДНК з клітин мікроорганізмів. Методи руйнування клітин. Отримання ДНК у нативному вигляді.....	35
6. ЛІТЕРАТУРА.....	41

1. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ

Дисципліна “Генетика” належить до циклу спеціальних предметів, вивчення яких є необхідним при підготовці фахівців для біотехнологічної галузі. Ця дисципліна є однією з найважливіших у системі підготовки фахівців з біотехнології, оскільки на сучасному етапі у якості продуцентів біологічно активних сполук та об’єктів біотехнології використовуються генетично модифіковані штами мікроорганізмів. Провідне місце у сучасній біотехнології займають методи генетичного аналізу, який лежить в основі селекції необхідних продуцентів, та різноманітні методи генетичної інженерії.

Предметом дисципліни є ознайомлення студентів з основними положеннями і сучасним станом молекулярної біології, генетики та генної інженерії.

Метою навчальної дисципліни є необхідність надання майбутнім фахівцям-біотехнологам теоретичні знання та практичні навички з аналізу генетичних процесів і явищ у мікроорганізмів та розкрити їх значення у сучасному біотехнологічному процесі з подальшим застосуванням отриманих знань під час вивчення розділів спеціальних технологій, проходження виробничої практики, виконання НДРС, курсових і дипломних проектів, а також у науково-дослідній та виробничо-практичній роботі.

Зв’язок з іншими дисциплінами. Дана дисципліна базується на знаннях, здобутих студентами при вивченні загальної біології, біології клітини, біохімії, загальної мікробіології та вірусології.

Роль у підготовці майбутніх фахівців. Опанування дисципліни дозволить майбутнім фахівцям проводити роботи, пов’язані з отриманням мутантних мікроорганізмів, здійснювати спрямований мутагенез, використовуючи певні мутагенні агенти, дасть можливість удосконалювати існуючі технології, шляхом впливу на процеси культивування мікроорганізмів, акцентує увагу на зниженні витрат матеріальних ресурсів та енерговитрат.

Вимоги до навчальної підготовки студентів. Для успішного опанування даної дисципліни студентам необхідно мати досвід роботи з культурами мікроорганізмів, навички роботи з комп’ютерними програмами Word, Excel для обробки даних за допомогою текстових та графічних редакторів; знати принципи роботи пошукових програм в мережі Internet, мати базовий рівень знання англійської мови.

[illegible]

2. ЗМІСТ ЗАНЯТЬ З ДИСЦИПЛІНИ

2.1. Лекційні заняття

№ п/п	Тема та зміст заняття	Кількість годин за формою навчання	
		денною	заочною
1	2	3	4
1	Предмет, методи та історія розвитку генетики. <i>Основні етапи розвитку генетики.</i> Перші уявлення про спадковість. Праці Г. Менделя. Поява терміну “хромосоми”. Мутаційна теорія Г. де Фриза. Створення хромосомної теорії спадковості. Розвиток біохімічної генетики. “Народження” молекулярної генетики. Сучасний період розвитку генетики. <i>Розвиток генетики в Україні.</i> Роботи Навашина С.Г. та його учнів. Застосування методів експериментального мутагенезу у селекції (Сапегін А.О., Юр’єв В.Я.). Видання першого україномовного підручника з генетики (Гришко М.М.). Розвиток еволюційної генетики (Поляков І.М., Рижков В.Л., Лукін Є.І. Виявлення мутагенної дії ДНК (Тарнавський М.Д., Сітько П.О., Гершензон С.М.). Заборона вивчення генетики (Лисенко Т.Д.). Провідні наукові заклади з розвитку різних напрямів генетики. <i>Методи генетики.</i> Гібридологічний аналіз. Селекційний метод. Цитогенетичний метод. Популяційний метод. Молекулярно-генетичний метод. Мутаційний метод. Генеалогічний аналіз. Близнюковий метод. Література: [1, 2, 5, 6, 7, 12]	2	0,5
2	Клітина – основна структурно-функціональна одиниця життя. <i>Клітинна теорія.</i> Відкриття клітини. Основні положення клітинної теорії сформульовані Т. Шванном. Положення сучасної клітинної теорії. <i>Будова і функції цитоплазматичної мембрани.</i> Перші уявлення про структуру елементарної мембрани. Рідинно-мозаїчна модель будови елементарної мембрани. Властивості та функції мембран.	4	0,5

1	2	3	4
2	<i>Транспорт речовин у клітину.</i> Пасивний транспорт. Активний транспорт. Цитоз (ендоцитоз, екзоцитоз, фагоцитоз, піноцитоз). <i>Анаболічна та катаболічна система клітини.</i> Клітинні органели, які беруть участь у реакціях пластичного (анаболічна система) та енергетичного (катаболічна система) обміну, їх роль та функції. Етапи енергетичного обміну. <i>Неклітинні форми життя.</i> Віруси і бактеріофаги (загальна характеристика, генетичний апарат, реплікація) Література: [4, 5, 8, 13]		
3	Структура та функції клітинного ядра. <i>Структура клітинного ядра.</i> Оболонка інтерфазного ядра. Ядерні пори. Ядерний сік (каріолімфа). Хроматин ядра. Ядерце. Основні функції ядра. <i>Характеристика, будова і класифікація хромосом.</i> Відкриття хромосом. Особливості функціональних перетворень хромосом. Будова метафазної хромосоми. Типи хромосом. Групи хромосом людини. Функції хромосом. <i>Правила хромосом.</i> Правило сталості числа хромосом. Правило парності хромосом. Правило індивідуальності хромосом. Правило безперервності хромосом. Література: [2, 3, 7, 8, 11, 13]	2	1
4	Клітинний цикл. <i>Клітинний і мітотичний цикли.</i> Клітинний цикл. Мітотичний цикл. Періоди інтерфази. <i>Мітоз.</i> Відкриття мітозу. Головні причини початку мітозу. Стадії мітозу: профаза, прометафаза, метафаза, анафаза і телофаза. Інші способи поділу клітин. <i>Мейоз.</i> Два етапи мейотичного поділу (мейоз I та мейоз II). Фази мейозу. <i>Генетична роль мітозу і мейозу.</i> Література: [1, 3, 7, 8, 12, 13]	4	1

1	2	3	4
5	Нуклеїнові кислоти як носії генетичної інформації. <i>Структура ДНК та РНК.</i> Відкриття ДНК І.Ф. Мішером. Розшифрування структури ДНК Д. Уотсоном і Ф. Криком. Будова ДНК. Правило комплементарності. Існування ДНК у різних конформаціях. Біологічна роль ДНК. Структура РНК. Типи клітинних РНК. <i>Реплікація молекули ДНК.</i> Умови, необхідні для матричного синтезу ДНК. Реплікони. Лідуюча і відстаюча нитка ДНК. Фрагменти Оказаки. <i>Рівні упаковки генетичного матеріалу.</i> Нуклеосомний рівень упаковки ДНК. Соленоїдний рівень упаковки генетичного матеріалу. Хроматидний рівень упаковки. Рівень метафазної хромосоми. <i>Стійкість і репарація генетичного матеріалу.</i> Забезпечення стійкості генетичного матеріалу. Фотореактивація. Темнова репарація <i>Біосинтез білків.</i> Генетичний код, його властивості. Інформація про первинну структуру білкової молекули. Транскрипція. Трансляція (ініціація, елонгація, термінація). <i>Докази генетичної ролі нуклеїнових кислот.</i> Трансформація бактерій. Реплікація бактеріофагів. Створення гібридних вірусів. <i>Функції нуклеїнових кислот у реалізації генетичної інформації.</i> Література: [1, 2, 3, 6, 10, 11, 13]	4	2
6	Закономірності успадкування та принципи спадковості. <i>Закони Г. Менделя й умови їхнього прояву.</i> Поняття гібридизації. Особливості гібридологічного методу Г. Менделя. Перший закон Г. Менделя. Другий закон Г. Менделя. Третій закон Г. Менделя. Умови, необхідні для прояву законів Г. Менделя. <i>Взаємодія генів.</i> Взаємодія алельних генів – повне домінування, неповне домінування, наддомінування і кодомінування. Взаємодія неалельних генів – комплементарність, епістаз і полімерію.	6	1

1	2	3	4
	<i>Типи, механізми та значення кросинговеру.</i> Механізм кросинговера “розрив – об’єднання”. Одинарне і багаточисельне перехрестя хромосом. Нерівний кросинговер. Мітотичний (соматичний) кросинговер. Біологічне та еволюційне значення кросинговеру. <i>Закономірності нехромосомного успадкування.</i> Цитоплазматична спадковість. Пластидна спадковість. Мітохондріальна спадковість. Псевдоцитоплазматична спадковість. <i>Основні положення хромосомної теорії спадковості</i> Положення хромосомної теорії спадковості. Генетична карта хромосоми. Цитологічна карта хромосоми. Міжнародна програми “Геном людини”. Література: [1, 2, 3, 6, 7, 11, 12]		
7	Генетичний аналіз мікроорганізмів. <i>Організація генетичного апарату бактерій.</i> Основа генетичного апарату прокаріот. Процеси, що регулюються генами. Поняття про плазмід. <i>Генетична рекомбінація у прокаріот.</i> Три способи генетичної рекомбінації у прокаріот – кон’югація, трансформація, трансдукція. <i>Кон’югація у бактерій.</i> Відкриття кон’югації. Процес кон’югації. “Чоловічі” (донори) і “жіночі” (реципієнти) клітини кишкової палички. Три типа клітин-донорів. <i>Статевий фактор у кишкової палички, його роль.</i> Відкриття статевого фактору та його значення. <i>Трансформація.</i> Відкриття трансформації Ф. Гріффітсом. Компетентність. Стадії процесу трансформації. <i>Трансдукція.</i> Типи трансдукції: загальна (неспецифічна), органічна (специфічна) і абортівна трансдукція. <i>Уявлення про плазмід, епісоми, мігруючі елементи геному, їхня роль у перенесенні генетичної інформації.</i> Література: [1, 2, 4, 5, 7, 9]	6	2

1	2	3	4
8	Мінливість. <i>Типи мінливості.</i> Поняття про спадкову і неспадкову мінливість. Модифікаційна мінливість. Комбінативна мінливість. Мутаційна мінливість. <i>Класифікація мутацій.</i> За причинами, що викликають мутації – спонтанні та індуковані. За клітинами, які змінилися – генеративні і соматичні. За результатами для організму – летальні, напівлетальні, нейтральні і позитивні. За змінами генетичного матеріалу – геномні, хромосомні, генні. Література: [3, 6, 10, 11, 12]	4	1
9	Регуляція експресії генів. <i>Класифікація генів.</i> Регуляторні і структурні гени. Конститутивні і індукцибельні гени. <i>Регуляція роботи генів.</i> Речовини-індуктори і репресори <i>Регуляція роботи генів у прокаріот.</i> Схема регуляції транскрипції у прокаріот запропонована Ф. Жакобом і Ж. Моно. Оперон, промотор, ініціатор, ген-оператор, ген-регулятор, структурні гени, термінатор, білок-репресор. <i>Регуляція роботи генів у еукаріот.</i> Схема регуляції транскрипції у еукаріот розроблена Г. П. Георгієвим. Транскриптон, інформативна та неінформативна зони, гени-регулятори, гени-оператори, промотор, ініціатор, структурні гени, інтрони, екзони, термінатор, білки-репресори. <i>Механізми реалізації генетичної інформації.</i> Принципові відмінності між про та еукаріотами. Література: [1, 2, 3, 4, 9, 12]	4	1
10	Генетика як теоретична основа біотехнології. <i>Мета та методологія генної інженерії.</i> Сучасна стратегія генної інженерії. Явище генетичної трансформації. Метод трансдукції. Методи гібридизації. Ферменти генної інженерії.	6	2

1	2	3	4
	<i>Векторні молекули.</i> Загальна характеристика векторів, їх класифікація, властивості. Плазмідні вектори, фагові вектори, вектори-транспозони, вірусні вектори, гібридні вектори. <i>ДНК-технології.</i> Отримання фрагментів ДНК із природного матеріалу. Хімічний синтез ДНК. Синтез комплементарної ДНК на матриці РНК. <i>Основні напрями генної інженерії мікроорганізмів.</i> Про- та еукаріоти як об'єкти генної інженерії. Біосинтез інсуліну людини. Мікробний синтез гормону росту людини – соматотропіну. Виробництво рекомбінантних інтерферонів. <i>Значення генної інженерії.</i> <i>Соціальні та етичні аспекти генної інженерії.</i> Література: [1, 3, 5, 9, 12]		
11	Генетичні процеси на рівні організму та популяції. <i>Генетика статі.</i> Теорії визначення статі. Диференціювання статі в процесі розвитку. Варіації визначення статі. Аномалії поєднання статевих хромосом. Співвідношення статей. <i>Генетика популяцій.</i> Генетичні процеси у великих популяціях (закон Харді-Вайнберга). Генетичні процеси в малих популяціях. <i>Основи генетики людини.</i> Основні методи дослідження генетики людини: генеалогічний, близнюковий, цитогенетичний, біохімічний і популяційний. Генетичні захворювання і спадкові хвороби. Література: [3, 5, 6, 7, 12]	6	2
Всього:		48	14

2.2. Лабораторні заняття

№ п/п	Тема заняття	Кількість годин
1	2	3
1	Визначення титрів бактерій та бактеріофагів. Загальні правила роботи з бактеріями та бактеріофагами. Одержання окремих колоній бактерій. Способи зберігання мікроорганізмів (короткострокові, довгострокові). Методи зберігання бактеріофагів. Особливості поживних середовищ, які застосовуються для генетичних досліджень. Особливості роботи з генетично зміненими культурами. Визначення титрів бактерій та бактеріофагів. Метод розведень. Поверхневий і глибинний метод визначення титру бактерій.	4
2	Мутагенез у мікроорганізмів. Фізичні фактори мутагенезу. Термін “мутація”. Фізичні фактори мутагенезу. Мутаційна дія іонізуючих випромінювань (електромагнітні, рентгенівські, космічні, α-, β-, γ-хвилі). Вплив ультрафіолетового випромінювання на генетичний апарат клітини. Механізм мутагенної дії фізичних факторів мутагенезу. Мутагенез у мікроорганізмів. Значення мутагенезу для одержання нових продуцентів та підвищення якості вже існуючих. Статистична обробка результатів мутагенезу.	4
3	Вилучення плазмідної ДНК з клітин мікроорганізмів. Методи руйнування клітин. Отримання ДНК у нативному вигляді. Поняття “плазміда”. Загальні властивості бактеріальних плазмід. Застосування векторних плазмід у генній інженерії. Методи виділення плазмідної ДНК з клітин мікроорганізмів – виділення за допомогою тритона X-100, виділення плазмідної ДНК за допомогою додецилсульфата натрію, виділення за допомогою лізоцима. Виділення плазмідної ДНК з великою молекулярною масою. Методи руйнування клітин. Виділення позахромосомної ДНК у нативному вигляді.	4
Всього:		12

3. ПИТАННЯ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ДО ІСПИТУ

1. Історія розвитку генетики.
2. Розвиток генетики в Україні.
3. Методи генетики.
4. Клітинна теорія.
5. Будова і функції цитоплазматичної мембрани.
6. Транспорт речовин у клітину.
7. Анаболічна система клітини.
8. Катаболічна система клітини.
9. Структура клітинного ядра.
10. Характеристика, будова і класифікація хромосом.
11. Правила хромосом.
12. Клітинний і мітотичний цикли.
13. Мітоз.
14. Мейоз.
15. Структура і біологічна роль ДНК.
16. Види, структура і властивості РНК.
17. Реплікація молекули ДНК.
18. Рівні організації спадкового матеріалу.
19. Стійкість і репарація генетичного матеріалу.
20. Біосинтез білків.
21. Докази генетичної ролі нуклеїнових кислот
22. Перший закон Г. Менделя.
23. Другий закон Г. Менделя.
24. Третій закон Г. Менделя.
25. Умови прояву законів Г. Менделя.
26. Взаємодія алельних генів.
27. Взаємодія неалельних генів.
28. Кросинговер – його суть та механізм дії.
29. Біологічне та еволюційне значення кросинговеру.
30. Закономірності нехромосомного успадкування.
31. Цитоплазматична спадковість.
32. Пластидна спадковість.
33. Мітохондріальна спадковість.
34. Положення хромосомної теорії спадковості.
35. Побудова генетичної і цитологічної карти хромосоми.
36. Організація генетичного апарату бактерій.
37. Генетична рекомбінація у прокаріот.
38. Кон'югація у бактерій.
39. Поняття трансформації у мікроорганізмів.
40. Явище трансдукції.
41. Статевий фактор у кишкової палички, його роль.

42. Плазмиди, епісоми та мігруючі елементи геному.
43. Види мінливості.
44. Модифікаційна мінливість.
45. Комбінативна мінливість.
46. Мутаційна мінливість.
47. Класифікація мутацій.
48. Спонтанні та індуковані мутації.
49. Характеристика хромосомних мутацій.
50. Генні мутації.
51. Класифікація генів.
52. Значення індукторів і репресорів у регуляції роботи генів.
53. Регуляція роботи генів у про- та еукаріот.
54. Механізми реалізації генетичної інформації.
55. Мета та методологія генної інженерії.
56. Ферменти генної інженерії.
57. Загальна характеристика векторів та їх класифікація.
58. Використання плазмідних векторів у генній інженерії.
59. Особливості фагових векторів.
60. Застосування вірусних векторів.
61. Гібридні вектори: фагміди, косміди, фазміди
62. Отримання фрагментів ДНК із природного матеріалу.
63. Хімічний синтез ДНК.
64. Синтез комплементарної ДНК на матриці РНК.
65. Основні напрями генної інженерії мікроорганізмів.
66. Біосинтез інсуліну людини.
67. Мікробний синтез соматотропіну.
68. Виробництво рекомбінантних інтерферонів.
69. Значення генної інженерії.
70. Соціальні та етичні аспекти генної інженерії.
71. Генетика статі.
72. Теорії визначення статі.
73. Генетичні процеси у великих популяціях.
74. Генетичні процеси в малих популяціях.
75. Основи генетики людини.
76. Генетичні захворювання і спадкові хвороби.

4. ВИМОГИ ДО ВИКОНАННЯ КОНТРОЛЬНИХ РОБІТ

Вивчення дисципліни закінчується написанням контрольної роботи. Для правильного її виконання необхідно зрозуміти суть запитання і дати відповідь за його змістом. Не слід переписувати текст підручника чи іншого видання, а необхідно давати посилання на відповідні джерела таким чином, щоб автор мав свою думку з приводу питання, що розглядається. Виклад змісту відповіді повинен бути вичерпний, зрозумілий, послідовний та обґрунтований.

Обов'язковим є посилання на використану літературу, яка повинна бути оформленою за чинними вимогами, без помилок. Обсяг відповідей не обмежується.

Для виконання контрольної роботи пропонуються 25 варіантів. Номер варіанта потрібно вибирати за двома останніми цифрами номера залікової книжки. Номери залікових книжок, які закінчуються цифрами від 01 до 25, відповідають варіантам робіт від 1 до 25. Якщо останні цифри залікової книжки понад 25, то номер варіанта контрольної роботи визначається шляхом послідовного віднімання від двох останніх цифр числа 25. Наприклад, залікова книжка має номер 345678, останні цифри 78. Щоб визначити варіант контрольної роботи необхідно зробити наступні дії: $78 - 25 = 53$, $53 - 25 = 28$, $28 - 25 = 3$. Отже необхідно виконати контрольну роботу під номером 3.

Форма захисту контрольної роботи – усне опитування.

ВАРІАНТИ КОНТРОЛЬНИХ РОБІТ

В а р і а н т № 1

1. Історія розвитку генетики.
2. Взаємодія неалельних генів.
3. Мутаційний вплив іонізуючих випромінювань.

В а р і а н т № 2

1. Розвиток генетики в Україні.
2. Кросинговер – його суть та механізм дії.
3. Мутаційна дія ультрафіолетових променів.

В а р і а н т № 3

1. Методи генетики.
2. Біологічне та еволюційне значення кросинговеру.
3. Класифікація мутацій.

В а р і а н т № 4

1. Клітинна теорія.
2. Закономірності нехромосомного спадкування.
3. Спонтанні та індуковані мутації.

В а р і а н т № 5

1. Будова і функції цитоплазматичної мембрани.
2. Цитоплазматична спадковість.
3. Характеристика хромосомних мутацій.

В а р і а н т № 6

1. Транспорт речовин у клітину.
2. Пластидна спадковість.
3. Генні мутації.

В а р і а н т № 7

1. Анаболічна система клітини.
2. Мітохондріальна спадковість.
3. Класифікація генів.

В а р і а н т № 8

1. Катаболічна система клітини.
2. Організація генетичного апарату бактерій.
3. Значення індукторів і репресорів у регуляції роботи генів.

В а р і а н т № 9

1. Структура і функції клітинного ядра.
2. Генетична рекомбінація у прокаріот.
3. Мета та методологія генної інженерії.

В а р і а н т № 10

1. Характеристика, будова і класифікація хромосом.
2. Кон'югація у бактерій.
3. Регуляція роботи генів у еукаріот.

В а р і а н т № 11

1. Правила хромосом.
2. Поняття трансформації у мікроорганізмів.
3. Механізм реалізації генетичної інформації у прокаріот.

В а р і а н т № 12

1. Клітинний і мітотичний цикли.
2. Види репарації ДНК.
3. Механізм реалізації генетичної інформації у еукаріот.

В а р і а н т № 13

1. Мітоз – відкриття, стадії, значення.
2. Явище трансдукції.
3. Регуляція роботи генів у прокаріот.

В а р і а н т № 14

1. Мейоз – відкриття, стадії, значення.
2. Статевий фактор у кишкової палички, його роль.
3. Загальна характеристика векторів, класифікація, властивості.

В а р і а н т № 15

1. Структура, форми та властивості ДНК.
2. Види мінливості.
3. Застосування плазмідних і вірусних векторів у генній інженерії.

В а р і а н т № 16

1. Структура, властивості та типи РНК.
2. Модифікаційна мінливість.
3. Ферменти генної інженерії: зворотня транскриптаза, рестриктази, лігази, полімерази і нуклеази.

В а р і а н т № 17

1. Реплікація молекули ДНК.
2. Генетичні процеси у великих популяціях.
3. ДНК-технології.

В а р і а н т № 18

1. Хромосомний рівень організації генетичного матеріалу.
2. Плазмід, епісоми та мігруючі елементи геному.
3. Генетичні процеси в малих популяціях.

В а р і а н т № 19

1. Генний рівень організації спадкового матеріалу.
2. Основні напрями генної інженерії мікроорганізмів.
3. Основи генетики людини.

В а р і а н т № 20

1. Біосинтез білків.
2. Перший закон Г. Менделя.
3. Генетичні захворювання і спадкові хвороби.

В а р і а н т № 21

1. Докази генетичної ролі нуклеїнових кислот.
2. Другий закон Г. Менделя.
3. Положення хромосомної теорії спадковості.

В а р і а н т № 22

1. Третій закон Г. Менделя.
2. Генетична і цитологічна карта хромосоми.
3. Біосинтез інсуліну людини.

В а р і а н т № 23

1. Взаємодія алельних генів.
2. Умови прояву законів Г. Менделя.
3. Мікробний синтез соматотропіну.

В а р і а н т № 24

1. Біологічна роль мутацій.
2. Основні методи дослідження генетики людини.
3. Виробництво рекомбінантних інтерферонів.

В а р і а н т № 25

1. Мутагенна дія хімічних сполук.
2. Генетика статі.
3. Соціальні та етичні аспекти генної інженерії.

5. ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

5.1. Правила роботи у мікробіологічній лабораторії

При роботі у мікробіологічній лабораторії слід суворо дотримуватись вимог, викладених у *інструкції з техніки безпеки*. У разі, якщо студент не ознайомлений з зазначеними вимогами, він повинен повідомити про це викладача. Студент несе *персональну відповідальність* за власну безпеку під час перебування у лабораторії, що підтверджує *підписом у журналі з техніки безпеки* при проведенні інструктажу.

Основні положення

Перед початком кожної лабораторної роботи студент повинен ознайомитись з особливостями техніки безпеки при проведенні лабораторної роботи та поставити свій підпис у журналі.

Під час виконання лабораторної роботи категорично забороняється користуватися мобільними телефонами та залишати їх увімкненими.

У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі. Усі студенти повинні працювати в чистих бавовняних халатах, які мають бути застебнуті на всі ґудзики. Волосся необхідно прибрати з обличчя та сховати під шапочку.

Кожен студент працює на постійному місці та виконує завдання індивідуально. На робочому місці потрібно підтримувати зразковий порядок. Особисті речі повинні зберігатися в спеціально відведеному місці.

У лабораторії забороняється вживати їжу та напої.

Під час виконання лабораторної роботи студентам заборонено пересуватися по лабораторії без зайвої потреби. Всі рухи повинні бути спокійними та виваженими.

До роботи не допускаються студенти, які мають пошкодження на відкритих ділянках шкіри не оброблені та не заклеєні бактерицидним пластиром.

Працюючи з відкритим полум'ям (газовий пальник, спиртівка), потрібно дотримуватися таких вимог: запалювати спиртівку та газовий пальник лише за допомогою сірника. Забороняється запалювати запальничкою та іншою запаленою спиртівкою (газовим пальником); гасити запалену спиртівку потрібно, закривши доступ повітря спеціальним ковпачком, а газовий пальник – перекриттям доступу газу. Розташовувати спиртівку потрібно на відстані не меншій ніж 20 см від краю робочого стола. Запалену спиртівку заборонено пересувати з місця на місце. По закінченню роботи з газовими пальниками необхідно перевірити, що вихід газу перекрито.

При випадковому займанні ватно-марлевого корку необхідно терміново загасити його, закривши доступ повітря.

При роботі з живими культурами мікроорганізмів необхідно слідкувати за наявністю запобіжних ватних тампонів у піпетках та ватно-марлевих корків у пробірках.

Роботу з культурами мікроміцетів можна проводити лише за наявності індивідуальних засобів захисту дихальних шляхів.

У разі випадкового потрапляння мікробного матеріалу на шкіру дослідника, або стіл чи підлогу це місце треба ретельно обробити дезинфікуючим розчином.

Роботу у мікробіологічному боксі дозволено проводити лише за проходження додаткового інструктажу з техніки безпеки, наявності відповідного захисного одягу (халат, шапочка, захисна маска та захисні окуляри). Категорично забороняється заходити у бокс при увімкненій бактерицидній лампі.

Всі предмети, використані у роботі з живими мікроорганізмами, мають бути знезаражені фламбуванням (петлі, голки), кип'ятінням (пробірки, чашки Петрі), обробленням дезінфікуючими розчинами (шпателі, піпетки, предметні й покривні скельця).

Під час стерилізації лабораторних інструментів (шпателі, скальпелі, голки, петлі тощо) у розчині спирту необхідно слідкувати, щоб інструменти, що стерилізуються, були охолоджені.

При випадковому займанні спирту необхідно терміново загасити його, закривши доступ повітря до ємкості, у якій він знаходиться.

Забороняється користуватися скляним посудом, що має сколи, тріщини, гострі краї.

В лабораторії необхідно дотримуватися обережності **під час роботи з хімічними речовинами**. За необхідності (робота з концентрованими хімічними речовинами) потрібно використовувати засоби індивідуального захисту (рукавички, респіратори, гумовий фартух, захисні окуляри). При розведенні концентрованої кислоти необхідно кислоту вносити у розчинник, а не навпаки. При потраплянні будь-яких хімічних речовин на шкіру необхідно змити реактив великою кількістю води. Нейтралізувати вплив кислоти необхідно слабким розчином соди, а вплив лугу – слабким розчином оцтової кислоти. Роботу з концентрованими та леткими хімічними речовинами необхідно проводити під витяжною шафою.

Необхідно суворо дотримуватися **вимог електробезпеки**. Забороняється використовувати несправне електрообладнання і вмикати прилади без дозволу викладача або лаборанта, а також торкатися поверхні приладу мокрими руками.

При роботі в лабораторії бажано знаходитися без косметики на обличчі та з коротко остриженими нігтями.

Після закінчення роботи студент повинен упорядкувати робоче місце, руки необхідно ретельно вимити, а за потреби обробити дезинфікуючим розчином. Слід мати індивідуальний рушник або серветки для витирання рук.

5.2. Лабораторна робота № 1

ВИЗНАЧЕННЯ ТИТРУ БАКТЕРІЙ ТА БАКТЕРІОФАГІВ

Мета роботи: засвоєння правил пересівання та зберігання бактерій і бактеріофагів; ознайомлення та опанування методів визначення титру бактерій і бактеріофагів.

Обладнання, матеріали та об'єкти: термостат; чашки Петрі з повним агаризованим середовищем; пробірки з 4,5 мл фосфатного буфера; пробірки з 4,5 мл розведеного 0,5 % NaCl бульйону Хоттингера; пробірки з 3 мл 0,7 % повного агаризованого середовища; стерильні піпетки; шпателя; суспензія культури клітин *Escherichia coli* концентрацією 10^9 клітин/мл; суспензія бактеріофага T4B концентрацією 10^9 частинок/мл.

Загальні відомості

Пересівання й зберігання бактерій і бактеріофагів. У генетичних дослідженнях мікроорганізмів велике значення мають якісні показники висіваних або пересіваних культур бактерій і бактеріофагів. Техніка висіву бактерій багато в чому подібна до загальноприйнятих правил. Однак є ряд істотних відмінностей:

- 1) одержання генетично чистої культури, тобто очищеної від супутніх мутантів і ревертантів;
- 2) відбір монотипових колоній за морфологічними і фізіолого-культурними ознаками після висіву бактерій на спеціальні середовища;
- 3) дотримання фізичних умов вирощування бактерій (температура, період культивування, доступ кисню, щільність середовища, освітленість).

Пересівання музейних культур варто робити якомога рідше (не частіше двох разів на рік), тому що під час пересівань завжди існує небезпека потрапляння мутантів або ревертантів, що виникають у культурі, у пересіваний матеріал. У ході послідовних пересівів вони можуть поступово витіснити первісну культуру. У процесі ведення музейних культур варто періодично очищати їх від можливих мутантів або ревертантів відбором матеріалу із клонів, тобто окремих колоній, що вирости з одиничних клітин, або спор одночасно з перевіркою їхніх генотипів.

Для одержання окремих колоній використовують різні методи висіву клітин на тверді поживні середовища. У генетичних дослідженнях застосування механічних методів виділення мікроорганізмів у чисту культуру неможливо, тому що як на рівні однієї клітини можна виявити фенотипові ознаки культури? Тільки клон може дати відповідь на це питання.

Бактеріофаг вирощують на генетично чистих культурах зараженням їх на рідкому або твердому поживному середовищі із наступним відмиванням фага від субстрату й фільтрацією через мембранні мікропористі фільтри. Фаги містяться в рідкій фазі. Зберігання генетично чистих клонів бактерій і бактеріофагів – відповідальний етап генетичних досліджень. Тому і до їх

вирощування, і до їх зберігання ставляться жорсткі вимоги. У процесі зберігання мутантного музейного штаму важливо не допустити нагромадження ревертантів у його культурі. До умов оптимального зберігання мутантних мікроорганізмів належать такі, що забезпечують максимальне виживання мікроорганізмів і, водночас, зводять до мінімуму їхнє розмноження, яке перешкоджає селективному розмноженню виниклих ревертантів або нових мутантів. Способи зберігання класифіковані по трьох групах:

- I – короткочасне (кілька тижнів) – колонії зберігають на агаровому середовищі при температурі $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- II – середньої тривалості (1 – 2 роки) при температурі $20 - 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ – у стовпчиках агару, розлитого по флаконах, щільно закритих пробками;
- III – тривале (понад 2 роки) – у 15 % гліцерині при температурах $-20 \dots -70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для бактерій найкращим способом зберігання є ліофільно висушений стан (у запаяних ампулах). Свіжовирощені бактерії суспендуються в скляній ампулі в середовищі, що складається з однієї частини бульйону, трьох частин сироватки крові й однієї частини 7,5 % розчину глюкози.

Суспензію швидко заморожують в рідкому азоті або суміші твердої вуглекислоти з ацетоном й висушують під вакуумом.

Також можна зберігати культури бактерій у 3 – 5 мл флаконах, що загвинчуються (або інших герметичних). У флакон заливають майже доверху напіврідкий (0,6 – 0,7 %) поживний агар. Після застигання в нього уколом висівають культуру й інкубують протягом 18 – 24 год. Потім пробку щільно загвинчують й парафінують. Культуру зберігають при температурі $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ більше року.

Непогані результати отримані у процесі зберігання культури, засіяної в стовпчик напіврідкого поживного агару, залитого в закриту ватно-марлевою пробкою пробірку. Після інкубації в термостаті агар зверху заливають шаром 0,5 – 1,0 см вазелінової олії, простерилізованої в сушильній шафі при $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 1,5 год. Зберігання при температурі $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ забезпечує життєздатність культури до одного року.

Цвілеві гриби не втрачають життєздатність, якщо культуру вирощують на повному поживному середовищі, розлитому у вигляді скошеного агару.

Метод зберігання бактеріофага залежить від його виду. Так, бактеріофаг Т4 зберігають у стерильному бульйоні в герметично закритих пробірках або флаконах при температурі $0 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до кількох років. Бактеріофаг Р1 кс зберігають у стерильному буфері з хлористим кальцієм у холодильнику.

Фаг досить швидко втрачає активність, тому для його зберігання використовують суспензії з високим титром: $10^{10} - 10^{11}$ частинок/мл. Пересівають фаг Р1кс один – два рази на рік.

Багато видів бактеріофагів можна зберігати й за звичайних температурних умов у водному середовищі або середовищі фізіологічного розчину без видимих порушень генетичних ознак протягом досить тривалого періоду часу.

Поживні середовища, використовувані в генетичних дослідженнях на клітинах мікроорганізмів, в основному не відрізняються від звичайних середовищ, однак слід зважати на те, що:

- хімічні речовини, використовувані для приготування середовищ, мають бути високого ступеня чистоти;
- поживні середовища слід готувати тільки на дистильованій воді і з компонентів, які були попередньо роздільно простерилізовані;
- у деяких випадках для стерилізації середовищ застосовують методи фільтрації й виморожування;
- для приготування середовищ потрібно чітко дотримуватись дозування компонентів, температури й тривалості стерилізації;
- всі застосовувані середовища – синтетичні;
- багато поживних середовищ є дефіцитними по окремих компонентах живлення, тобто є диференційованими;
- досить часто поживні середовища використовують у вигляді дво- або багат шарового субстрату; при цьому як за складом, так і за консистенцією вони можуть бути неоднакові;
- у практиці генетичних досліджень застосовують правило підсушування поживних середовищ (видалення конденсаційної вологи), яке, в основному, стосується середовищ, розлитих у чашки Петрі; підсушування сприяє швидкому усмоктуванню мікробної суспензії; його проводять в сушильній шафі при температурі не більше 60 °С звичайно протягом 1 год.

Визначення титру бактерій й бактеріофагів. Визначення титру бактерій й бактеріофагів у генетичних дослідженнях необхідно для встановлення генетичної взаємодії між бактеріями й фагом, активності репродукції фага, ступеня стійкості бактерій до дії фага тощо.

Для визначення титру бактерій використовують звичайні мікробіологічні методи (висів розведень на чашки Петрі).

Для визначення титру бактеріофага розроблено ряд методик одержання фагових лізатів. Одна з них ґрунтується на ефекті утворення зон просвітління (бляшок), які відповідають кількості інфекційних фагових частинок, що містяться в лізаті.

В основі методу розведень лежить титрування суспензії мікроорганізмів і наступний розсів її на тверде поживне середовище. Вважають, що кожна життєздатна клітина, спора або вірусна частинка утворить окрему колонію. Підрахувавши число вирослих на чашках колоній і знаючи розведення й об'єм висіяних проб, можна обчислити кількість життєздатних одиниць в 1 мл вихідної культури (суспензії) за формулою

$$N = \frac{nd}{V},$$

де n – середня кількість колоній на чашці (для даного розведення); d – розведення; V – об'єм висіяної проби, мл.

Зручне для підрахунку число колоній на звичайно використовуваних чашках Петрі (діаметр 90 – 100 мм) становить: для бактерій – 50...200; цвілевих грибів – 20...50; бактеріофагів – 200...600.

Успіх аналізу забезпечують:

1. точність у відборі проб і розведень;
2. разове використання піпеток;
3. гомогенність суспензії культури;
4. підсушування середовища при висіві рухливих форм мікроорганізмів (наприклад *E. coli*);
5. суворий контроль температури й складу розріджувача (вода, дистилат, буфер);
6. запобігання інактивації бактеріофагів і вірусів у сольових розчинах, які не містять білку або желатини при їхньому розведенні або струшуванні.

Для визначення титру використовують два методи – поверхневий і глибинний (двошаровий). За першого – на агарову пластину вносять піпеткою 0,1 мл суспензії, яку ретельно розтирають шпателем. За другого – суспензію з розведенням піпеткою вносять у розплавлений і охолоджений до температури 45 – 48 °С напіврідкий 0,7 % агар і після перемішування виливають на поверхню більш щільного (2 % агар), попередньо підсушеного, середовища в чашці Петрі. Звичайно в 3 – 5 мл напіврідкого агару вносять 0,5 мл розведеної суспензії.

Бактеріальні клітини розводять у 0,05 М фосфатному буфері з рН – 7,0. Як повне агаризоване середовище застосовують агаризований бульйон Хоттингера. У разі висіву клітин двошаровим способом використовують напіврідке 0,7 % і щільний 2 %, при поверхневому способі – 2 % повне агаризоване середовище.

Фагову суспензію розводять вдвоє у розбавленому вдвоє бульйоні Хоттингера з 0,5 % NaCl. Штамом-хазяїном є культура *E. coli*. Для висіву проб з розведень використовують 0,7 % ПА і 2 % повне агаризоване середовище.

Хід роботи

І. Розведення й розсів бактеріальної культури.

1. На занятті використовують нічну культуру *E. coli*, вирощену на поживному середовищі з концентрацією 10^9 клітин/мл. Із цієї культури готують послідовні розведення (до семи розведень), для чого в кожен пробірник вносять по 4,5 мл фосфатного буфера (рис. 1).

З вихідної культури відбирають по 0,5 мл (перед відбором проб суспензія ретельно перемішується) і переносять у першу пробірку, не занурюючи піпетку в буфер. Культури розводять за загальноприйнятою схемою.

Розсів бактеріальної культури проводять двома способами – поверхневим і двошаровим.

2. При поверхневому розсіві з п'ятого, шостого та сьомого розведень беруть проби по 0,1 мл і обережно, не ушкоджуючи агар, наносять на чашки з повним агаризованим середовищем.

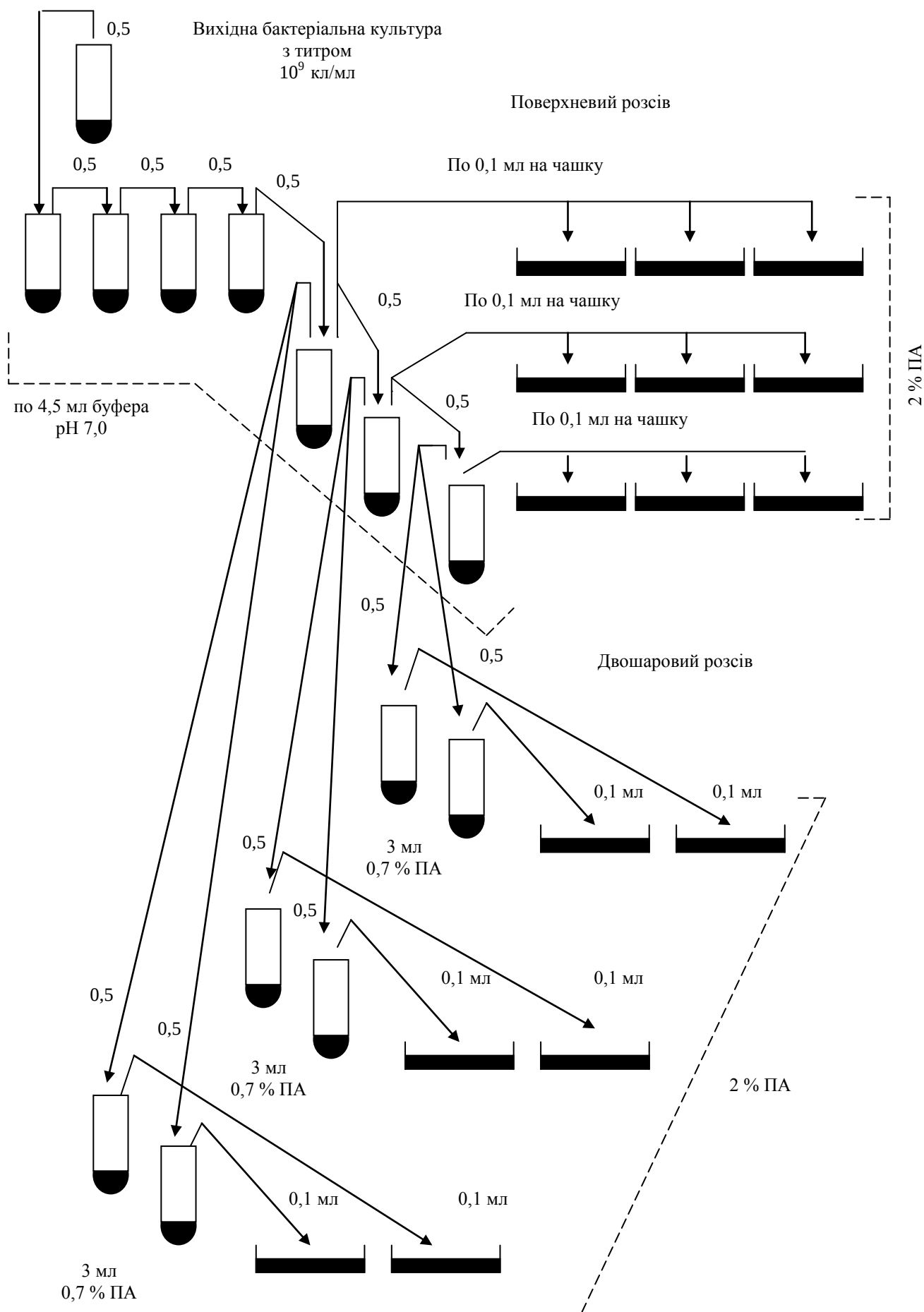


Рис. 1. Схема титрування й розсіву суспензії *E. coli* (ПА – повне агаризоване середовище).

Суспензію рівномірно розтирають по всій поверхні середовища мікробіологічним шпателем. Якщо аналіз виконують на паралельних чашках, з кожного розведення розтирання суспензії проводять тим самим шпателем.

3. При двошаровому методі розсіву з пробірок 5, 6 і 7 відбирають проби по 1 мл і вносять по 0,5 мл у дві пробірки, що містять по 3 мл розплавленого напіврідкого агару (пробірки з агаром мають перебувати у водяній бані при температурі 46 °С). Суспензію в агарі швидко перемішують струшуванням і виливають на чашки із твердим поживним попередньо підсушеним середовищем. Розлите середовище треба рівномірно розподілити по поверхні агару. Процедура розсіву триває 5 – 7 с. Після застигання агару (10 – 15 хв) чашки в переверненому стані поміщають у термостат з температурою 37 °С й інкубують протягом 24 год.

II. Розведення й розсів суспензії бактеріофага.

1. Використовується вихідна суспензію бактеріофага Т4В концентрацією 10^9 частинок/мл, приготовлену розведенням фаголізу.

Розведення бактеріофага проводять у ряді з семи пробірок, які містять по 4,5 мл розведеного 0,5 % NaCl бульйону (рис. 2).

Вихідну суспензію бактеріофагу розводять до 10^{-7} частинок/мл.

2. Висів бактеріофага проводять двошаровим методом. Для цього з розведення 10^{-6} і 10^{-7} частинок/мл відбирають проби по 1 мл і вносять по 0,5 мл у кожен з двох пробірок з 3 мл розплавленого напіврідкого агару (при температурі 46 °С). Напіврідкий агар попередньо заражають бактеріями, для чого в кожен пробірку вносять по 0,1 мл суспензії *E. coli* з титром 10^9 клітин/мл. Вміст кожної пробірки перемішують і виливають у чашку – верхній шар – на нижній шар підсушеного 1,2 % повного агаризованого середовища. Після застигання верхнього шару чашки поміщають у переверненому вигляді в термостат і витримують протягом 18 – 24 год при температурі 28 °С. Аналіз отриманих результатів включає в себе підрахунок кількості колоній, що виросли на чашках, і бляшок.

3. Результати заносять у табл. 1 і 2. Обчислюють кількість життєздатних бактеріальних клітин і частинок бактеріофага у перерахунку на 1 мл культури *E. coli* і суспензії фага Т4В.

Крім того, варто враховувати:

Чи є десятикратні розходження між розведеннями 10^{-5} і 10^{-6} , 10^{-6} і 10^{-7} частинок/мл?

Яка розбіжність результатів між паралельними розведеннями?

Яка різниця між даними, отриманими двошаровим і поверхневим методами розсіву?

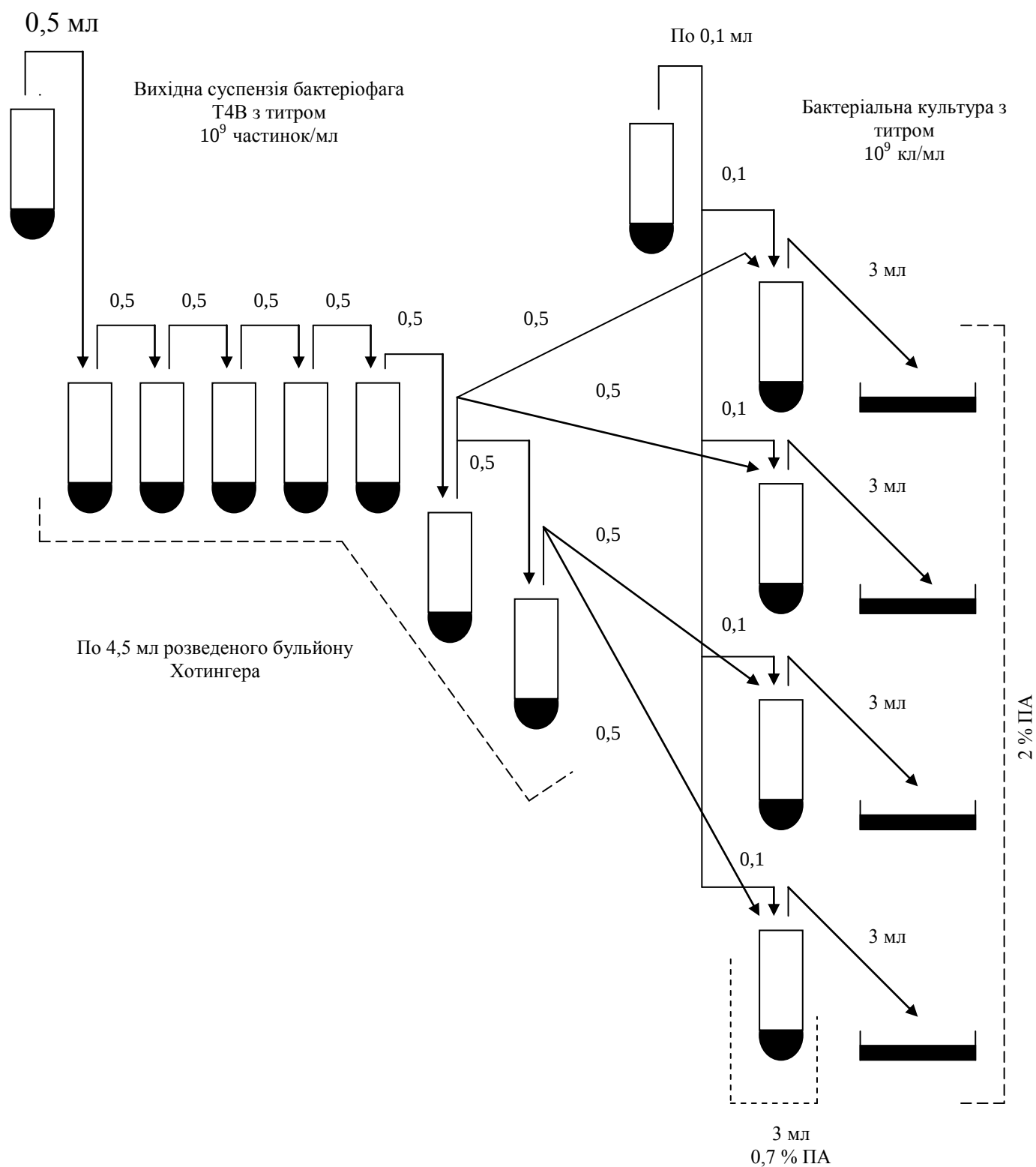


Рис. 2. Схема титрування й розсіву суспензії бактеріофага Т4В (ПА – повне агаризоване середовище).

Таблиця 1

Визначення концентрації життєздатних клітин у культурі *E. coli*.

Ряд	Розведення			Концентрація клітин у культурі
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
	Кількість колоній			
Поверхневий спосіб розсіву				
I				
II				
III				
IV				
Двошаровий спосіб розсіву				
I				
II				
III				
IV				

Таблиця 2

Визначення концентрації життєздатних частинок у суспензії бактеріофага T4B

Ряд	Розведення		Концентрація фагових частинок, мл ⁻¹
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
	Кількість бляшок на чашці		
I			
II			
III			
IV			

Контрольні запитання

1. Чим відрізняється робота з культурами в мікробіологічній і генетичній лабораторіях?
2. Які загальні вимоги до ведення чистих культур мікроорганізмів?
3. У чому полягає роль поживних середовищ для одержання очікуваного результату при дослідженнях?
4. Назвіть основні вимоги, пропоновані для зберігання мікроорганізмів?
5. Що означає мутантний або ревертантний вид мікроорганізмів?
6. Які принципові відмінності методів зберігання бактерій і бактеріофагів?
7. Як визначити титр бактерій? Що дає аналіз на титр? Що забезпечує успіх аналізу?
8. Як визначити титр бактеріофага? В чому суть методу? Які істотні відмінності у визначенні титру бактерій і бактеріофагів?

Література: [2, 4, 9, 12].

5.3. Лабораторна робота № 2

МУТАГЕНЕЗ У МІКРООРГАНІЗМІВ. ФІЗИЧНІ ФАКТОРИ МУТАГЕНЕЗУ.

Мета роботи: вивчення дії фізичних та хімічних факторів одержання мутантів; опанування методів статистичного опрацювання результатів індукованого мутагенезу.

Обладнання, матеріали та об'єкти: бактерицидна лампа БУВ-30П; 0,5 М розчин нітриту натрію; чашки Петрі з сусло-агаром; чашки діаметром 40 – 50 мм для опромінення; камера Горяєва; пробірки з 0,8; 1,6; 2,4; 4,9 мл води; пробірка з 0,9 мл води, з 0,9 та 4,5 мл фосфатного буфера (рН 8,0); пробірки з 8 мл ацетатного буфера (рН 4,4); стерильні пробірки і піпетки; прототрофний гаплоїдний штам дріжджів *S. cerevisiae* 15В-ПЧ.

Загальні відомості

Мутація – це стрибкоподібна зміна генетичного матеріалу під впливом факторів зовнішнього чи внутрішнього середовища, що передається нащадкам. Процес утворення мутацій називається мутагенезом, а фактори, що викликають мутації, – мутагенами. Мутагени спочатку впливають на генетичний матеріал особини, внаслідок чого може змінитися фенотип.

Мутагенні фактори підрозділяють на фізичні, хімічні і біологічні.

До фізичних мутагенних факторів відносяться різні види випромінювань, температура, вологість і ін. Основні механізми їхньої дії: 1) порушення структури генів і хромосом; 2) утворення вільних радикалів, що вступають у хімічну взаємодію з ДНК; 3) розриви ниток ахроматинового веретена поділу; 4) утворення димерів.

До хімічних мутагенів відносяться: а) природні органічні і неорганічні

речовини (нітрити, нітрати, алкалоїди, гормони, ферменти й ін.); б) продукти промислової переробки природних сполук – вугілля, нафти; в) синтетичні речовини, що раніше не зустрічалися в природі (пестициди, інсектициди, харчові консерванти, лікарські речовини); г) деякі метаболіти організму людини. Хімічні мутагени володіють великою проникаючою здатністю, викликають переважно генні мутації і діють у період реплікації ДНК. Механізми їхньої дії: 1) дезамінування; 2) алкілування; 3) заміни азотистих основ їхніми аналогами; 4) інгибування синтезу попередників нуклеїнових кислот.

До біологічних мутагенів відносяться: а) віруси (краснухи, кору, грипу), б) невірусні паразитарні агенти (мікоплазми, бактерії, рикетсії, найпростіші, гельмінти). Механізми їхньої дії: 1) віруси вбудовують свою ДНК у ДНК клітин хазяїна; 2) продукти життєдіяльності паразитів – збудників хвороб діють як хімічні мутагени.

Під впливом УФ-променів у клітинах мікроорганізмів відбувається димеризація двох сусідніх піримідинових основ у молекулі ДНК. Якщо такі димери не видаляються в процесі пострадіаційної репарації, вони викликають або загибель опроміненої клітини (летальність), або появу мутацій типу заміни пара основ. У зв'язку із цим в експерименті важливе значення має фактор доза-клітина. Для оцінки дії мутагенного агента суворо враховують кількісні показники. Їх використовують для графічного зображення залежностей. Графіки будують найчастіше в напівлогарифмічному масштабі. Інтенсивність опромінення вимірюють у ергах на квадратний міліметр (ерг/мм²).

У процесі обліку летальної й мутагенної дій будь-якого фактора звичайно обробляють моноклітинну суспензію досліджуваного штаму, концентрація клітин якої має бути попередньо визначена. Оптимальна кількість колоній на чашці має бути в межах 50 – 300.

У результаті вивчення дії мутагенів може бути виявлена частота індукованих мутацій аденинзалежності в локусах *ade1* і *ade2*. Мутантні клони набувають червоного забарвлення. Облік мутацій такого типу проводять при згущеному в 10 разів висіві на чашки з повним середовищем. При цьому кількість колоній на чашці може досягати 5000, однак забарвлені червоні клони добре помітні без збільшення.

Хід роботи

Для проведення роботи використовують прототрофний гаплоїдний штам дріжджів *S. cerevisiae* 15В-П4 (рис. 3). Опромінення УФ-променями проводять бактерицидною лампою БУВ-30П при інтенсивності випромінювання 20 ерг/мм²·с. Тривалість експозиції становить 60, 90 і 120 с (загальна доза дорівнює відповідно 1200, 1800, 2400 ерг/мм²).

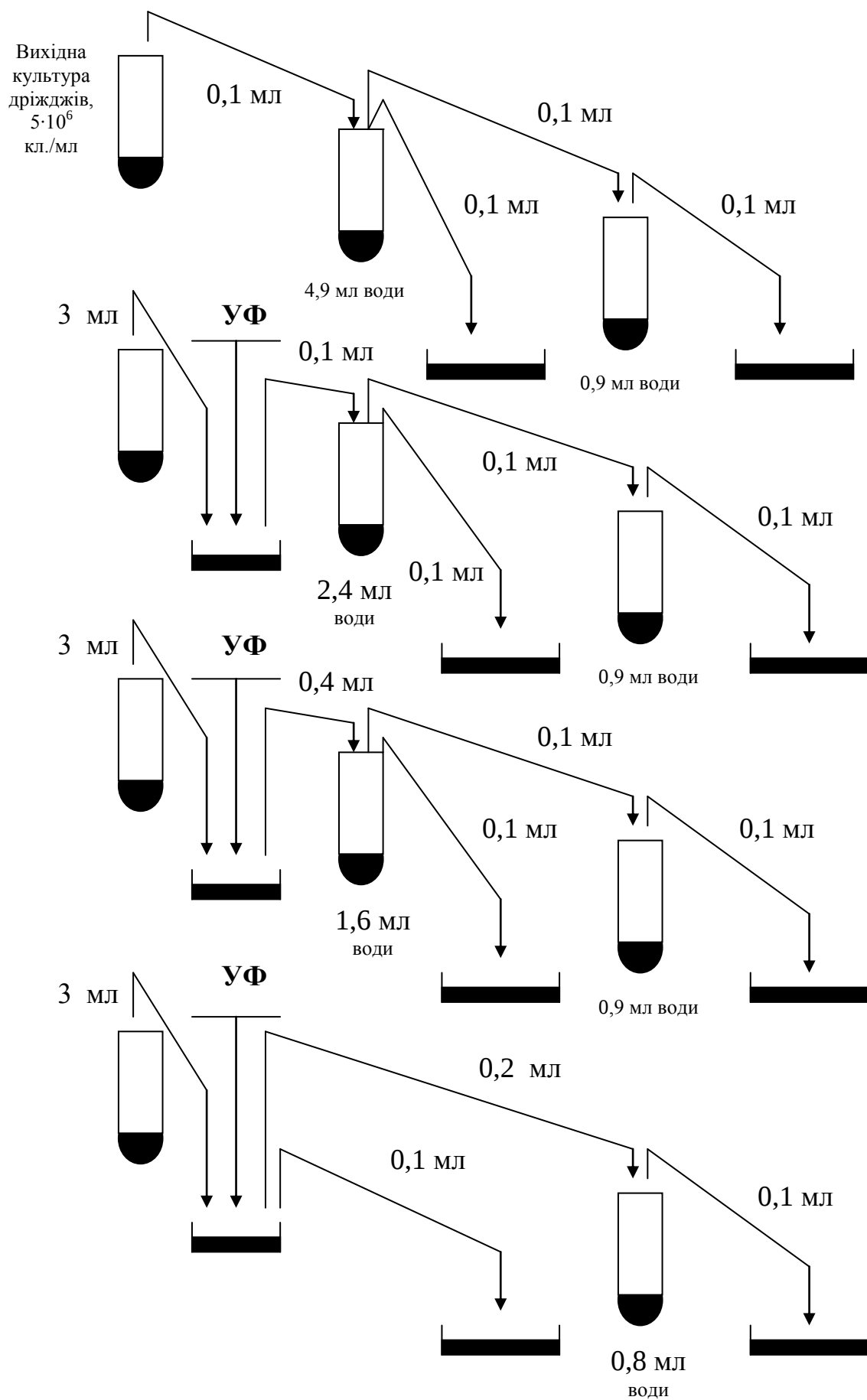


Рис. 3. Схема оброблення клітинної суспензії дріжджів УФ-променями

Відстань між джерелом УФ-променів і поверхнею чашки – не більше 35 см. Опроміненню піддають моноклітинну культуру з концентрацією $5 \cdot 10^6$ клітин/мл. Опромінення проводять у чашках діаметром 40 – 50 мм (під час опромінення кришку знімають). Оброблення опроміненої суспензії, розсів її на чашки, загортання чашок у папір слід проводити при червоному світлі, яке перешкоджає фотореактивації опромінених клітин.

1. Із приготовленої суспензії концентрацією $5 \cdot 10^6$ клітин/мл (методику приготування див. у лабораторній роботі 1) відбирають 0,1 мл для контрольного висіву на чашки. При цьому розводять суспензію до концентрації $1 \cdot 10^4$ клітин/мл внесенням 0,1 мл суспензії в 4,9 мл води (розведення I). Із розведення I 0,1 мл суспензії додають до 0,9 мл води (розведення II).

2. На чашку з попередньо залитим середовищем повного складу вносять по 0,05 мл суспензії з кожного розведення, після чого суспензію розтирають шпателем. Потім чашки вміщують у термостат з температурою 30 °С. Контрольний висів дає можливість визначити густину висіву вихідної суспензії, частоту появи спонтанних аденинзалежних мутантів і служить контролем для порівняння з результатами опромінення клітин.

3. Перший варіант. Під час опромінення суспензії клітин перенесена в чашки культура постійно перемішується легким погойдуванням (без розбризкування!). Після закінчення експозиції чашку закривають, виводять із опромінення й відбирають із суспензії пробу в кількості 0,1 мл. Переносять її у пробірку з 2,4 мл води для одержання розведення I. З розведення I відбирають 0,1 мл суспензії й переносять в 0,1 мл води (розведення II). У такий спосіб аналізують кожну дозу опромінення.

Другий варіант. Після відбору проби із суспензії, опроміненої мінімальною дозою, чашку знову поміщають під випромінювач, і експозиція щораз подовжується відповідно на 600 ерг/мм²·с). Сумарно клітини отримають дозу 2400 ерг/мм². Відбір проб для аналізу на ефективність дії УФ-променів здійснюють за послідовністю наведеною в табл. 3.

Всі засіяні чашки загортають у папір і вміщують у термостат з температурою 30 °С на 6 – 7 діб, після чого опрацьовують результати, які після статистичного опрацювання заносять у табл. 4.

Статистичне опрацювання результатів індукованого мутагенезу. Для статистичного опрацювання результатів, отриманих під час опромінювання чи дії мутагенів, досліди необхідно кілька разів повторити.

З кожного варіанта дослідів відбирають чашки з типовими колоніями для контролю і для кожної дози мутагену й підраховують кількість вирослих колоній (сумарно).

Обчислюють відсоток виживаємості при кожній дозі мутагену для даного досліді з огляду на вихідні розведення для висівів; виживаємість у контролі приймають за 100 %.

Таблиця 3

**Розрахунок розведень вихідної суспензії дріжджів *S. cerevisiae* 15В-ПЧ
після опромінення різними дозами УФ-променів (концентрація суспензії $5 \cdot 10^6$ клітин/мл)**

Доза Опромінен- ня	Передбачу- вана виживає- мість, %	Густота висіву суспензії на чашки, клітин/мл		Розведення вихідної суспензії		Рекомендовані розведення	
		Для обліку виживаємості	Для обліку частоти мутацій	Для обліку виживаємості	Для обліку частоти мутацій	Для обліку виживаємості	Для обліку частоти мутацій
Контроль	100	10^4	10^5	В 500 разів	В 50 разів	4,9 мл води + 0,1 мл суспензії (розведення І) з р.1 0,1 мл + 0,9 мл води (розведення ІІ)	Висів з розведення І, розведення ІІ
1 (1200 єрг/мм ²)	50	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$	250 разів	25 разів	2,4 мл води + 0,1 мл суспензії (розведення І) з р.1 0,1 мл + 0,9 мл води (розведення ІІ)	Висів з розведення І, розведення ІІ
2 (1200 + 600 єрг/мм ²)	10	10^5	10^5	50 разів	5 разів	1,6 мл води + 0,4 мл суспензії (розведення І) з р.1 0,1 мл + 0,9 мл води (розведення ІІ)	Висів з розведення І, розведення ІІ
3 (1800 + 600 єрг/мм ²)	1	10^6	$2 \cdot 10^6$	5 разів	Без розведення по 0,1 мл на чашку	0,8 мл води + 0,2 мл суспензії (розведення І)	Висів без розведення, з розведення 1

Приклад. Позначимо число колоній, що вирости на трьох чашках у контролі, N , а число колоній, що вирости на трьох чашках при даній дозі – n . Для контрольних чашок здійснюють розведення вихідної суспензії в 500 разів, а опроміненої суспензії – лише в 250 разів, тобто кількість клітин, що потрапили на кожну чашку після опромінення, буде в два рази більшою. Позначимо коефіцієнт розведення контролю буквою k . Приймаючи виживаємість клітин за 100 %, отримаємо виживаємість при тій або іншій дозі, %

$$S = \frac{\frac{n}{k} \cdot 100}{N} = \frac{100n}{kN}$$

або для першої дози

$$S_1 = \frac{\frac{n}{2} \cdot 100}{N} = \frac{50n}{N}.$$

Аналогічно розраховуємо виживаємість і для інших доз мутагену.

Отримані дані з виживаємість зводять у табл. 4 з урахуванням доз і кількості повторених дослідів, попередньо прологарифмувавши кожну величину виживаємість

$$x_i = \lg S_i.$$

Обчислюють середнє значення виживаємість для кожної дози за формулою

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}, \quad (1)$$

Таблиця 4

Вживаємість клітин дріжджів, оброблених мутагеном

Доза опромінення, с	Вживаність опромінених клітин у різних повторностях, %					Середнє значення логарифма виживаємість
	I	II	III	IV	V	
60						
90						
120						

Розраховують середнє квадратичне відхилення σ , похибку середнього арифметичного $m_{\bar{x}}$ за формулами

$$m_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}; \quad (2) \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}. \quad (3)$$

Користуючись таблицею Стюдента, визначають довірчі $m_{\bar{x}}t$ 95% інтервали середніх значень, враховуючи, що при p повторних дослідах число ступеней свободи дорівнює $p-1$.

На міліметровому папері будують графік залежності виживаємість опромінених клітин від дози УФ-променів. На осі абсцис відкладають значення використаних у досліді доз мутагенів (в ергах на квадратний міліметр або в

секундах), а по осі ординат – середні логарифми виживаємості. На графіку вгору й униз від крапок, що відповідають середнім значенням виживаємості для кожної із доз, відкладають довірчі інтервали, що показують розмах варіювання результатів у повторних дослідах.

Уважно розглядають вирослі на чашках колонії. Позначають тушшю всі мутантні клони, підраховують їхню кількість і записують у таблицю, складену за таким зразком:

Доза мутагену	Кількість переглянутих чашок	Середня кількість колоній на чашці	Загальна кількість переглянутих клонів	Кількість мутантних клонів	Частота мутацій аденозин-залежності
Контроль					
I					
II					
III					

Середню кількість колоній на чашці визначають підрахунком колоній на чашках, засіяних для обліку виживаності. Частоту індукованих мутацій для кожної дози визначають за формулою

$$C = \frac{M}{N},$$

де M – кількість мутантних клонів; N – кількість колоній на переглянутих чашках.

Частота появи спонтанних аденозинзалежних мутантів при такій вибірці близька до нуля.

Всі дані з частоти індукованих мутацій за винятком спонтанного фону зводять у таблицю за повторними дослідами, як це було зроблено під час обліку виживаності. Розраховують середнє значення частот мутацій та їхні довірчі інтервали за формулами (2) і (3). Середню частоту індукованих мутацій обчислюють за формулою

$$\bar{x}_c = \frac{\sum x_i}{n},$$

де x_i значення частот мутацій, отримані в різних повторностях досліду для даної дози; n – кількість повторених дослідів.

За отриманими даними будують графік залежності виживаності клітин від дози мутагену та криву доза – ефект для частоти індукованих мутацій аденозинзалежності.

Контрольні запитання

1. Яка роль мутагенів у природі й експерименті?
2. Які мутагенні фактори викликають зміни в геномі клітини?
3. Як оцінити дію мутагену?
4. На чому ґрунтується статистичне опрацювання результатів дії мутагенів? Які основні розрахунки?

Література: [2, 3, 9, 12].

5.4. Лабораторна робота № 3

ВИДІЛЕННЯ ПЛАЗМІДНОЇ ДНК З КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ. МЕТОДИ РУЙНУВАННЯ КЛІТИН. ОТРИМАННЯ ДНК У НАТИВНОМУ ВИГЛЯДІ.

Мета роботи: ознайомлення з методами підготовки і руйнування бактеріальних клітин для виділення нуклеїнових кислот; опанування методу виділення плазмідної ДНК.

Обладнання, матеріали та об'єкти: центрифуга з частотою обертів 6000 та 10000 об/хв; качалка; буферний розчин 0,01 М трис-НСl, 0,15 М NaCl, 0,1 М ЕДТА (БР I, рН 8,0); буферний розчин 0,01 М трис-НСl, 2 М NaCl, 0,1 М ЕДТА (БР II, рН 8,0); БР I, що містить лізоцим у концентрації 2 мг/мл; розчин з 0,15 М NaCl і 0,015 М цитрату натрію (стандартний сольовий розчин – ССР); 5% розчин додецилсульфату натрію (ДДС); суміш хлороформ – октиловий спирт, ХОС (9:1) або суміш хлороформ – ізоаміловий спирт, ХІС (24:1); хлороформ – ССР (1:10); розчин панкреатичної РНКаз (0,4 мг/мл); 96 % і 70 % етанол; хімічна склянка на 50 – 100 мл; стерильні піпетки; пробірки із притертою пробкою; штам *Bacillus subtilis* 23, вирощений на глюкозо-сольовому середовищі (або середовищі Спіцайзена) з доданням бульйону Хоттингера (10 %).

Загальні відомості

Термін "плазмід" був уперше застосований Дж. Ледербергом в 1952р. для позначення всіх позахромосомних спадкоємних детермінант. Нині під цим терміном розуміють незалежно реплікуючу позахромосомну ДНК бактерій.

Плазмід – звичайні компоненти бактеріальних клітин, але вони також можуть зустрічатись у низчих еукаріот. У більшості випадків плазмід – це суперспіралізовані ковалентно-замкнені кільцеві молекули ДНК довжиною від 2 до 600 тисяч пар нуклеотидів. Завдяки кільцевій структурі плазмідні ДНК не підпадають під вплив екзонуклеаз. Існують також і лінійні плазмід, стійкість яких до дії екзонуклеаз забезпечується білками, що знаходяться на кінцях молекули ДНК.

Клітини, які отримують плазмід, як правило, отримують і нові ознаки. Ці ознаки лягли в основу назв вперше виявлених плазмід, а саме: F-плазмід (фактор статі), які надають клітинам донорних властивостей; Col-плазмід, які сприяють синтезу коліцинів; R-плазмід, що визначають стійкість клітин до антибіотиків.

Плазмід дають клітинам різноманітні фенотипові ознаки, зокрема, стійкість до антибіотиків (ампіциліну, тетрацикліну, хлорамфеніколу та ін.), катіонів (вісмута, кадмія, кобальта, ртуті, свинцю), аніонів (арсенату, арсеніту), мутагенів (акридинів, етидіум-броміду, УФ-хвилям), бактеріоцинів. Отримавши певні плазмід, клітини здатні викликати біодеградацію камфори, ксилону, нафталіну, n-алканів, толуолу; можуть синтезувати антибіотики, бактеріоцини, гемолізін, інсектециди, пігменти, поверхневі антигени, токсини; використовувати у якості джерела вуглецю різноманітні цукри і незвичні

амінокислоти; здатні кон'югувати з реципієнтними штамми бактерій; можуть індукувати пухлини у рослин⁴ а також здійснювати рестрикцію і модифікацію ДНК.

Основними біологічними властивостями плазмід є здатність до реплікації, кон'югативність, інтегративність, несумісність, стабільність і фенотипові ознаки, які вони надають бактеріям.

Плазміди відіграють роль своєрідних посередників (векторів) при міжклінному обміні генами. Більшість таких генів, зокрема, гени стійкості до антибіотиків, попадають до плазмід за допомогою транспозонів і інтегронів. Цей процес сприяє швидкій адаптації клітин до факторів зовнішнього середовища. Частота таких явищ в природі порівняно невисока. Але на протязі останніх десятиліть вона суттєво виросла у зв'язку з неконтрольованим використанням антибактеріальних препаратів і забрудненням навколишнього середовища промисловими відходами.

Підготовка бактеріальної культури для проведення досліджень. У дослідженнях важливе значення має вибір бактеріальної культури та її культивування з метою одержання достатньої кількості клітинної біомаси – матеріалу для генетичних досліджень. У зв'язку із цим звертають увагу, по-перше, на склад поживного середовища та на пов'язані з цим проходженням клітинами фаз розвитку, по-друге, на утворення достатньої кількості біомаси, по-третє, на формування клітинних структур, що добре піддаються генетичному аналізу. Для виділення плазмідної ДНК із клітин *E. coli* K-12 останні вирощують на багатому поживному при середовищі при температурі 37 °С в умовах слабкої аерації (досягається легким погойдуванням колби). Відношення об'єму середовища до об'єму колби 1:25. Вирощування проводять протягом 10 – 12 год. Концентрація клітин у середовищі має досягти щільності, що дорівнює $5 \cdot 10^7$ клітин/мл (при цьому спостерігається ампліфікація ДНК).

Руйнування клітин для виділення нуклеїнових кислот. Залежно від того, який мікроорганізм узято для досліджень (грампозитивний або грамнегативний, його таксономічне положення) застосовують три методи руйнування клітин:

- 1) за допомогою хімічного детергенту;
- 2) з використанням сумісної дії детергентів і гідролітичних ферментів;
- 3) за допомогою таких фізичних методів як руйнування під дією ультразвуку, у результаті різкої зміни тиску або під час струшування зі скляними кульками (діаметром 0,1 – 0,7 мм).

Для руйнування клітин з використанням детергентів і виділення ДНК бактеріальну культуру центрифугують при частоті обертання 6000 об/хв протягом 10 хв при температурі 4 °С.

Осад промивають холодним розчином 0,1 М NaCl, 10 мМ тріс-HCl, 1 мМ EDTA, рН 8,0 і центрифугують при частоті обертання 6000 об/хв протягом 10 хвилин.

Клітини ресуспендують у розчині 50 мМ глюкози, 25 мМ тріс-HCl, 10 мМ EDTA, рН 8,0 з 5 мг/мл лізоциму (кристалічного). До 1 г клітин додають 6 мл цього розчину. Суміш залишають на 10 – 20 хв при кімнатній температурі.

Потім до суміші додають 0,2 М розчин NaOH, 1,4 мл 1% розчину ДДС і протягом 10 – 15 хв перемішують вміст склянки.

ДНК можна отримати також по методу Савули й Кроуфорда (*Savula R.V., Krawford 1972*). Методика виділення ДНК складається з таких етапів:

1) клітини донора *E. coli* K12 вирощують із використанням аерації при 30 – 35 °С до ранньої стаціонарної фази в 10 мл *L*-бульйону. Аерацію здійснюють пропусканням бульбашок повітря через середовище в пробірках (пробірки 25×200 мм) через скляні палички діаметром 4 – 5 мм, що виходять через корок пробірки. Палички через гумові трубки приєднують до акваріумного мікрокомпресора, дотримуючись правила подавання стерильного повітря). Або аерують культуру клітин струшуванням на качалці в колбах, занурених у водяну баню;

2) клітини осаджують центрифугуванням при частоті обертання 6000 об/хв 10 хв і ресуспендують у 2,4 мл сольового буфера з ЕДТА (БР І);

3) додають 100 мкл 6 % розчину ДДС й інкубують суспензію 10 хв при температурі 37 °С для забезпечення лізису клітин;

4) освітлюють лізат додаванням 50 мкл 5 М KCl і після охолодження при температурі 0 °С (в льоді) протягом 10 хв центрифугують 20 хв при частоті обертання 10000 об/хв і охолодженні для відділення клітинного дебрису;

5) надосадову рідину, що містить ДНК, нагрівають при температурі 50–60 °С протягом 5 хв для інактивації залишкових ферментів;

6) стерильність лізату перевіряють висівом на чашки з *L*-агаром і витримуванням протягом 10 – 12 год при температурі 30 – 39 °С;

7) якщо потрібно, осаджують ДНК додаванням двох об'ємів 96 % холодного етанолу й намотують її на скляну паличку з гачком на кінці, а потім розчиняють ДНК у ССР;

8) визначають концентрацію ДНК кольоровою пробою з дифеніламіном, тому що в отриманому препараті можуть міститися РНК й інші домішки, що поглинають в ультрафіолеті;

9) зберігають препарат ДНК у етанолі при температурі 4 °С.

Хід роботи

Для проведення занять отримують клітинну масу донорного штаму *Bacillus subtilis* 23. Бактерії вирощують на глюкозо-сольовому середовищі (або середовищі Спіцайзена) з доданням бульйону Хоттингера (10%).

5 мл середовища в пробірці 22×200 мм висівають культурою донорного штаму, узятої зі свіжого розсіву на чашці або пробірці з агаризованим бульйоном Хоттингера. Бажано, щоб концентрація бактерій в інокуляті становила приблизно 10^5 клітин/мл. Пробірку вміщують на качалку при температурі 37 °С на 18 год. Після цього порції по 1 мл отриманого посівного матеріалу переносяться в колби на 0,75 л з 50 мл прогрітого середовища. Загальну кількість висіваної культури, готують з розрахунку 20 мл на одного студента. Культури вирощують на качалці при температурі 37 °С у протягом 10 – 12 годин.

Бактерії з усіх колб збирають центрифугуванням на холоді (– 4 °С) при частоті обертання 6000 об/хв протягом 10 хв (або при частоті обертання 3000

об/хв протягом 20 – 30 хв). Осад ресуспендують у 50 – 100 мл холодного ССР і повторно центрифугують. Потім отриманий осад промивають таким само чином у холодному ССР.

Процедуру центрифугування й промивання бактеріальних клітин проводять без дотримання стерильності.

Промиту біомасу (у вигляді осаду) донорного штаму готують безпосередньо до першого заняття.

Якщо буде потреба, біомасу можна отримувати завчасно й зберігати до початку заняття в замороженому стані.

1. Для виділення ДНК (не стерильно) промиту біомасу донорного штаму, зібрану з 20 мл культури, суспендують в 1 мл БР I у пробірці місткістю 10 – 20 мл із притертою пробкою (рис. 4). Для проведення експерименту потрібна невелика кількість ДНК; досить виділити препарат із клітин, зібраних з 20 мл культури, тому що з невеликої кількості біомаси (зібраної з об'єму культури меншого, ніж 5 мл) важко отримати добре сформований осад ("медузу") ДНК. Можна виділити препарат з біомаси, зібраної з 100 мл культури, збільшивши об'єм всіх використовуваних розчинів у п'ять разів порівняно з кількостями, наведеними у прописі. Виділеної при цьому ДНК із надлишком вистачить на проведення багатьох експериментів.

2. До суспензії додають 1 мл БР I, що містить лізоцим у концентрації 2 мг/мл. Суміш інкубують при температурі 37 °С протягом 30 – 60 хв, періодично перемішуючи.

3. Після закінчення інкубації в суміш вносять 0,5 мл 5 % розчину ДДС й витримують при температурі 37 °С 10 хв. При цьому відбувається бурхливий лізис біомаси, супроводжуваний різким збільшенням в'язкості. Лізат ретельно розмішують скляною паличкою, після чого до нього додають 2,5 мл БР II.

4. Далі проводять депротеїнізацію ДНК: до лізату додають рівний об'єм (5 мл) суміші хлороформ – октиловий спирт, ХОС (9:1) або суміші хлороформ – ізоаміловий спирт, ХІС (24:1). Суміш інтенсивно струшують 30 хв, потім переносять у центрифужну пробірку й центрифугують при частоті обертання 10000 об/хв 15 хв. Після центрифугування верхній водний шар відбирають пастерівською піпеткою (або звичайною піпеткою з розширеним кінцем) і переносять у хімічну склянку місткістю 50 – 100 мл. Зручно користуватися піпеткою, з'єднаною гумовою трубкою зі шприцом, закріпленим у затискачі фізичного штатива. Відбирання слід робити обережно, не захоплюючи денатурований білок на межі поділу фаз.

5. До зібраної водної фази доливають два об'єми холодного (0 °С) 96 % етанолу. Утворений осад ДНК намотують на тонку скляну паличку, притискають до стінки склянки, віджимаючи від спирту, промивають у двох порціях 70 % етанолу для видалення слідів детергенту. Потім знову віджимають від спирту й переносять осад у пробірку із притертою пробкою, що містить 1,8 мл суміші хлороформ–ССР (1:10). Пробірку поміщають на ніч у холодильник для розчинення ДНК.

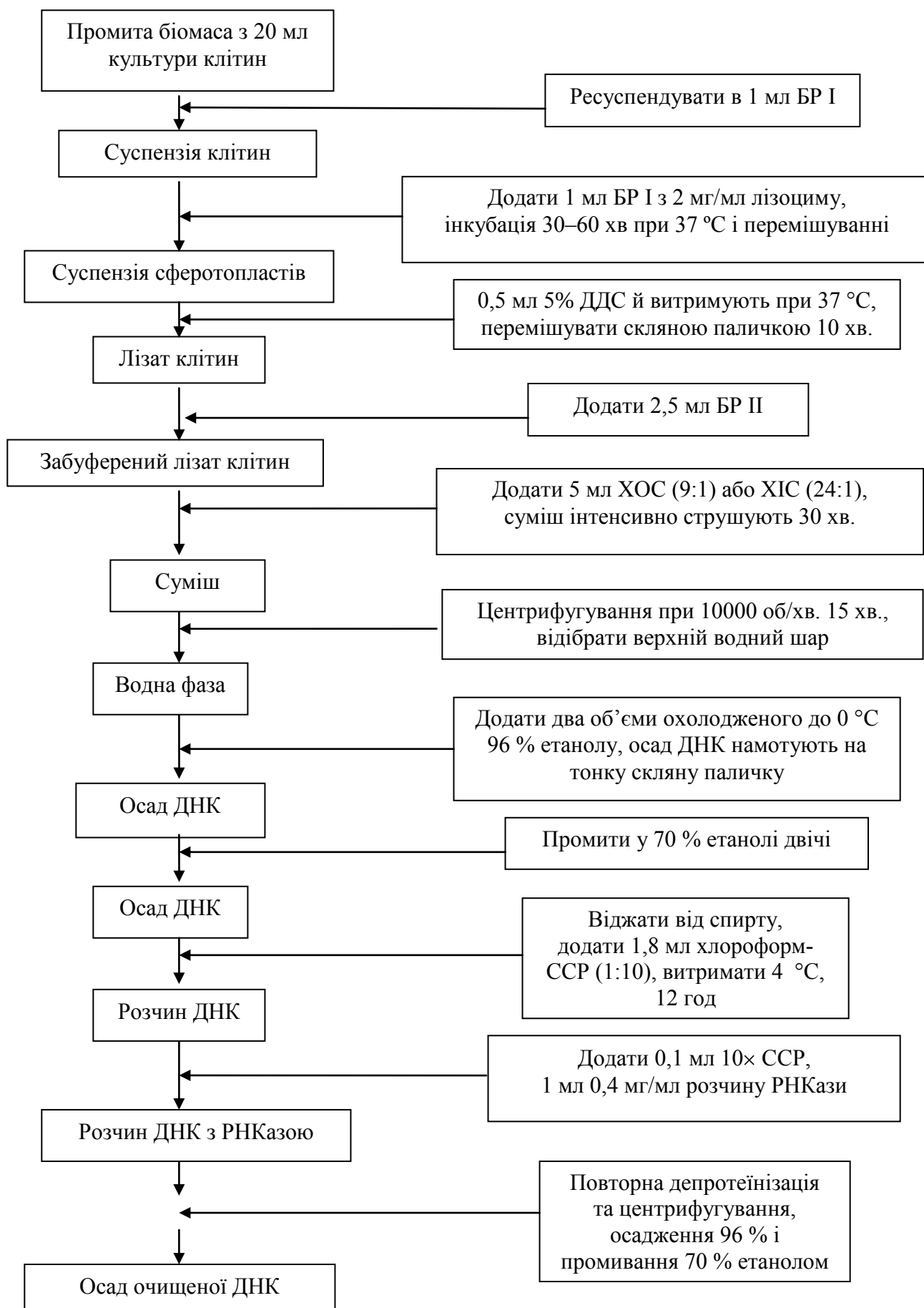


Рис. 4. Виділення ДНК з *Bacillus subtilis* 23

6. Після розчинення ДНК у пробірку додають 0,1 мл десятикратного ССР й 0,1 мл розчину панкреатичної РНК-ази в концентрації 0,4 мг/мл (бактеріальна ДНК дуже повільно розчиняється у ССР). Тому зручніше спочатку розчинити її в розведеному в 10 разів ССР, а потім уже довести концентрацію солей у препараті додаванням десятикратного ССР). Суміш інкубується при температурі 37 °С протягом 30 хв. Після охолодження до неї додають рівний об'єм суміші ХОС (або ХІС) і проводять депротейнізацію препарату, як описано вище. Якщо після поділу фаз проміжний шар містить багато денатурованого білка, після відбирання водної фази до неї слід додати нову порцію суміші ХОС і знову провести депротейнізацію (звичайно при очищенні препаратів ДНК за допомогою хлороформ-спиртової суміші процедуру депротейнізації повторюють не менш чотирьох разів).

7. Далі суміш переносять у центрифужну пробірку, центрифугують при частоті обертання 10000 об/хв 30 – 60 хв, верхню водну фазу відбирають, охолоджують і ДНК осаджують двома об'ємами холодного 96 % етанолу. Осад ДНК промивають двома об'ємами 70 % етанолу й зберігають у 70 % етанолі в холодильнику при температурі 4 °С.

Контрольні запитання

1. Що означає термін “плазмід”?
2. Де в клітині розташовуються плазмідни й епісоми? У чому їхня схожість і відмінність?
3. Які існують методи руйнування клітин?
4. Як отримують ДНК за методом Савули і Кроуфорда?
5. Як зберігають препарат ДНК?

Література: [1, 4, 9, 13].

6. ЛІТЕРАТУРА

Основна:

1. Алиханян С.И., Акифьев А.П., Чернин Л.С. Общая генетика. – М.: Высшая школа, 1985. – 448 с.
2. Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть: У 4 т. – К.: Логос, 2001.
3. Генетика / Под ред. акад. РАМН В.И. Иванова. – М.: ИКЦ “Академкнига”, 2006. – 638 с.
4. Гуттман Б., Гриффитс Э., Сузуки Д., Куллис Т. Генетика – М.: Фаир-Пресс, 2004. — 443с.
5. Дубинин Н.П. Общая генетика. – М.: Наука, 1986. – 559 с.
6. Жимулев И. Ф. Общая и молекулярная генетика. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2006. – 478 с.
7. Инге-Вечтомов. Генетика с основами селекции. – М.: Высш.шк., 1989. – 447 с.
8. Пехов А.П. Биология и общая генетика. – М.: Изд-во Рос. ун-та дружбы народов, 1994. – 439 с.
9. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии. – СПб.: Изд-во СПбГТУ. – 2002. – 522 с.
10. Стрельчук С.І., Демідов С.В., Бердишев Г.Д., Голда Д.М. Генетика з основами селекції. – К. : Фітосоціоцентр, 2000. – 292 с.
11. Ткачук З.Ю., Морозов М.М., Пилипчук О.Я. Основы загальної генетики. – К.: Вища шк., 1995. – 178 с.
12. Тоцький В.М. Генетика: У 2 т. – Одеса: Астропринт, 1998.
13. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. – М.: ИКЦ “Академкнига”, 2004. – 495 с.

Додаткова:

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика: В 3-х т. – М.: Мир, 1987. – 295 с.
2. Браун В. Генетика бактерій. – М.: Наука, 1968. – 446 с.
3. Глазер В.М., Каменева С.В., Миронова Т.Н. Большой практикум по генетике микроорганизмов. – М.: Изд. Моск.ун-та, 1977. – 119 с.
4. Губаревич А.И. Генетика. – Мінськ: Наука и техника, 1984. – 148 с.
5. Костишин С.С., Марченко М.М., Руденко С.С. Нуклеїнові кислоти: біохімія, генетика, екологія. – Чернівці: Рута, 1998. – 224с.
6. Хедрик Ф. Генетика популяцій. – М.: Техносфера, 2003. – 588с.
7. Стент Г., Кэлиндар Р. Молекулярная генетика. – М.: Мир, 1981. – 590 с.

Навчальне видання

ГЕНЕТИКА

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до вивчення дисципліни, виконання
контрольної і лабораторних робіт
для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія»
заочної форми навчання

Укладач: Скроцька Оксана Ігорівна

Комп'ютерна верстка

Підп. до друку. 00.00.09 р. Обл.-вид. арк. Наклад. пр.
Вид. № . Зам. №
РВЦ НУХТ. 01033 Київ-33, вул. Володимирська, 68
[www. book. nuft. edu. ua](http://www.book.nuft.edu.ua)
Свідоцтво про реєстрацію