

**Новосибирский государственный аграрный университет
Агрономический факультет**

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЕ
РАСТЕНИЙ**

**Методические указания
к выполнению лабораторно-практических занятий,
самостоятельной и курсовой работы**

Новосибирск, 2015

УДК 632.937:595.7

Методы исследований в биологической защите растений: Методические указания к выполнению лабораторно-практических занятий, самостоятельной и курсовой работы /Сост. М.В. Штерншис - Новосибирск, 2015. – 35 с.

Составитель М.В.Штерншис, д-р биол. наук, проф.

Методические указания предназначены для студентов-магистрантов 1-го курса агрономического факультета по программе «Биологическая защита растений».

Утверждены ученым советом агрономического факультета (протокол № 8 от 30.09.2015г.)

Рецензент: В.В. Мартемьянов, канд. биол. наук

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая защита растений – современная наукоемкая отрасль, требующая использования разнообразных методов исследований. Наряду с традиционными, все большее распространение находят методы, основанные на принципах биотехнологии и молекулярной биологии. Поэтому основное внимание уделено не только описанию методов, но и принципам, на которых они разработаны. Знание методов исследований – это свидетельство высокой профессиональной культуры магистра сельского хозяйства.

Цель изучения дисциплины – формирование знаний и умений по основам методов исследований в биологической защите растений, их применению при разработке и использовании биологических средств защиты растений.

Основные знания и умения

– **знать:** основы молекулярно-биологических, физико-химических методов исследования объектов биологической защиты растений, методов клеточной биологии, принципы молекулярной диагностики объектов;

- **уметь:** анализировать качество и количество агентов биозащиты по содержанию в них основных биологических макромолекул, оценивать пригодность методов молекулярной и клеточной диагностики для растений, насекомых и микроорганизмов, рационально использовать методы оценки качества и эффективности биологических средств защиты растений.

ЗАНЯТИЕ 1

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ КАК КОМПОНЕНТОВ БИОАГЕНТОВ РЕГУЛЯЦИИ ЧИСЛЕННОСТИ ВРЕДНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Важнейшие вещества клетки – белки. Белки – полипептиды, состоящие из аминокислот в различных количествах и сочетаниях, что обуславливает большое разнообразие их структур и функций.

Цель: Познакомиться с основными белками живых организмов, закрепить теоретический материал.

Учебные материалы и оборудование: Учебное пособие «Биотехнология в защите растений», препараты белков, учебный фильм

План занятия:

1. Изучить теоретическую часть
2. Ответить на контрольные вопросы.

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ (теоретическая часть)

Белки характеризуются первичной, вторичной, третичной и четвертичной структурой. Первичная структура определяет, в какой последовательности аминокислоты расположены в цепи, а вторичная, третичная, четвертичная характеризуется пространственным расположением цепей и всех атомов. Все белки состоят из аминокислот.

Первичная структура белка характеризуется последовательностью аминокислот в полипептидной цепи, *вторичная, третичная и четвертичная* - пространственным расположением этих цепей. Например, **вторичная структура белка** - это упорядоченное строение полипептидных цепей, обусловленное водородными связями между группами C=O и N-H разных аминокислот. Вторичная структура может быть регулярной α -спиралью и нерегулярной β -складчатой структурой.

Основные функции белков

1. Структурная функция.

Белки входят в состав всех клеточных органелл: мембранных (плазмалемма, ядерная оболочка, эндоплазматическая или ретикулярная сеть, комплекс Гольджи, лизосомы, пероксисомы, вакуоль, митохондрии, пластиды) и немембранных (хромосомы, рибосомы, клеточный центр (центриоли), реснички и жгутики, микрофиламенты).

2. Каталитическая функция.

Все ферменты - белки. Эта функция в 1982 году перестала считаться уникальной. Выяснилось, что некоторые РНК тоже обладают каталитической активностью. Их называют РНКзимами.

3. Защитная функция.

К таким белкам относятся антитела, лизоцим, дефензины.


4. Регуляторная функция.

На клеточном уровне это белки-репрессоры и белки – активаторы транскрипции. На организменном уровне: некоторые гормоны являются белками. Например, инсулин - гормон поджелудочной железы.

5. Транспортная функция.

Системы пермеаз - это мембранные белки, которые переносят полярные соединения через мембрану как по, так и против градиента концентрации.

◆ Контрольные вопросы:

- 
1. Из чего состоит белок?
 2. В чем отличие первичной структуры белка от вторичной и третичной?
 3. Назовите функции белка.

Занятие 2.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Учебные материалы и оборудование: Учебное пособие «Биотехнология в защите растений», препарат лиофилизированной ДНК, фото ДНК, нити, линейки и калькуляторы для определения размеров молекулы по фотографии с электронного микроскопа.

План занятия:

1. Изучить теоретическую часть, при необходимости обращаясь к учебному пособию.
2. Пользуясь нитью, линейкой и калькулятором, определить размеры молекулы ДНК по фотографиям с электронного микроскопа.

3. Ответить на контрольные вопросы.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ (теоретическая)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая и РНК – рибонуклеиновая. Состоят из нуклеотидов, а каждый нуклеотид из азотистого основания, пентозы (сахара) и остатка фосфорной кислоты.

Нуклеотиды соединяются друг с другом в полимерную цепочку с помощью фосфодиэфирных связей. Азотистые основания не принимают участия в соединении нуклеотидов одной цепи. Существует два класса азотистых оснований. Пурины: аденин (А) и гуанин (Г) - содержат два гетероцикла. Пиримидины: тимин (Т), цитозин (Ц) и урацил (У) - содержат один гетероцикл.

ПРИНЦИПЫ СТРОЕНИЯ ДНК

1.Нерегулярность.

Существует регулярный сахарофосфатный остов, к которому присоединены азотистые основания. Их чередование нерегулярно.

2. Антипараллельность.

ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, ориентированных антипараллельно. 3'-конец расположен напротив 5'-конца другой.

3.Комплементарность (дополнительность).

Каждому азотистому основанию одной цепи соответствует строго определенное азотистое основание другой цепи. Пурин и пиримидин в паре образуют водородные связи. В паре А-Т две водородные связи, в паре Г-Ц – три.

ФУНКЦИИ ДНК

1. ДНК является носителем генетической информации. Функция обеспечивается фактом существования **генетического кода.**

2. Воспроизведение и передача генетической информации в поколениях клеток и организмов.

Функция обеспечивается процессом **репликации.**

3. Реализация генетической информации в виде белков, а также любых других соединений, образующихся с помощью белков-ферментов. Функция обеспечивается процессами **транскрипции и трансляции.**

Открытие генетического кода как системы записи информации о последовательности расположения аминокислот в белках с помощью последовательности расположения нуклеотидов в ДНК – ключевое явление молекулярной биологии. Код был предложен Георгием Гамовым на основе теоретических расчетов в 1954г., а в 1961г. Сеймур Бензер и Френсис Крик экспериментально доказали триплетность кода.

СВОЙСТВА ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА

1. Триплетность

Каждая аминокислота кодируется последовательностью из 3-х нуклеотидов. *Триплет или кодон* - последовательность из трех нуклеотидов, кодирующая одну аминокислоту. На рисунке указано, какие аминокислоты соответствуют разным кодонам. Аминокислоты, указанные в последнем круге, кодируются тройкой нуклеотидов из первого, второго и третьего кругов.

ОТЛИЧИЯ МЕЖДУ ДНК И РНК

	ДНК	РНК
Сахар	Дезоксирибоза	Рибоза
Азотистые основания	А, Т, Г, Ц	А, У, Г, Ц
Количество цепей в молекуле	99.99% двойная спираль 0.01% одноцепочечная.	99.99% одноцепочечная 0.01% двухцепочечная
Форма молекулы	Все одноцепочечные-кольцевые. Большинство двухцепочечных - линейные, часть-кольцевые.	Линейные молекулы

ФУНКЦИИ РНК, ОПРЕДЕЛЯЕМЫЕ ЕЕ ВИДАМИ:

1. **Геномная РНК** служит носителем генетической информации вирусов.
2. **Рибосомная РНК** несет структурную функцию, входя в состав рибосом.
3. **Информационная РНК** участвует в процессе транскрипции.
4. **Транспортная РНК** связана с трансляцией

Согласно п.1, *не только ДНК, но и РНК может служить носителем генетической информации. В ряде случаев для выполнения этой функции требуется **обратная транскриптаза** – фермент, обеспечивающий копирование информации с РНК на ДНК*

Ферментативный синтез м-РНК на матрице ДНК называется транскрипцией. **Транскрипция** - это первая стадия считывания генетической информации, на которой

нуклеотидная последовательность ДНК копируется в виде нуклеотидной последовательности РНК. Транскрипция осуществляется ферментами РНК-полимеразами, синтезирующими РНК на ДНК-матрице.

Ферментативный синтез белка на матрице мРНК называется **трансляцией**. В этом процессе главная функция транспортной РНК - связывание аминокислот в клетке для транспортировки внутрь рибосом, чтобы обеспечить их включение в синтезируемую белковую цепь в соответствии с программой, записанной в мРНК. Каким образом каждая молекула тРНК узнает свою специфическую аминокислоту? Это узнавание осуществляется через посредство фермента (20 ферментов на каждую аминокислоту) и обозначают его словом **рекогниция**. Для каждой аминокислоты есть своя тРНК, доставляющая ее по месту назначения.

Следует отметить, что часто кодоном называют последовательность трех нуклеотидов мРНК, соответствующую триплету ДНК, а *антикодоном* – соответствующую последовательность на тРНК.

2. ВЫПОЛНЕНИЕ ЗАДАНИЯ

Молекулы биополимеров нельзя увидеть в световом микроскопе вследствие их малых размеров, но это позволяет сделать разрешающая сила электронного микроскопа. С помощью электронной микроскопии можно исследовать тонкую структуру молекул биополимеров и ее изменения, происходящие под влиянием различных агентов или выполнения каких-то функций белками и нуклеиновыми кислотами

Для визуализации нуклеиновых кислот применяют метод Клейншмидта. Согласно этому методу, сначала на поверхности солевого раствора образуют слой белка, а затем на этот слой наносят раствор нуклеиновой кислоты. Нити нуклеиновой кислоты застревают в монослое белка. После этого быстро прикасаются сеточкой с подложкой поверхности и сеточка нацепляет на себя молекулы. Чтобы повысить контраст и оттенить молекулы нуклеиновой

кислоты по всей длине, их оттеняют металлом, вращая сетку. Препараты нуклеиновых кислот, приготовленные по методу белковой пленки, просматривают при увеличениях от 5 000 до 20 000. По фотографиям определяют длину нити биополимера.

Молекулярная масса ДНК прямо пропорциональна длине нити. Поэтому молекулярную массу ДНК можно определить, используя электронную микроскопию. Для **вычисления молекулярной массы ДНК** по фотографии с электронного микроскопа повторите контуры ДНК с помощью нити. Затем измерьте длину этой нити. Расчет основан на соответствии между длиной нити ДНК и ее молекулярной массой. Каждый микрометр равен $1,2 \times 10^6$ дальтон (1 дальтон составляет $1/12$ массы атома C^{12} , т.е. $1,661 \times 10^{-24}$ г). Произведите расчет по трем молекулам ДНК, принимая во внимание увеличение электронного микроскопа, указанное на фото, а также то, что в 1 см содержится 10^6 мкм. Запишите в тетрадь свои вычисления.

Основные термины:

Белки - это нерегулярные полимеры, мономерами которых являются α -L-аминокислоты.

Ген- это участок ДНК, кодирующий одну полипептидную цепь или одну молекулу тРНК или рРНК.

Генетический код – порядок чередования аминокислот в белке, записанный в молекуле ДНК.

Геном - вся совокупность молекул ДНК клетки (в случае ряда вирусов говорят о геномной РНК).

Нуклеиновые кислоты - нерегулярные полимеры, мономеры которых - нуклеотиды.

♦ Контрольные вопросы:

1. Из чего складывается структура нуклеиновых кислот?
2. Какие связи удерживают две половины спирали ДНК?
3. Что такое комплементарность?

4. В чем отличие РНК от ДНК по структуре?
5. Назовите функции ДНК и РНК.
6. Чем отличается транскрипция от трансляции?
7. В чем суть генетического кода?
8. Назовите основные свойства генетического кода.

ЗАНЯТИЕ 3

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК, ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

Методы получения и сохранения культур клеток и тканей приобретают все большее значение в исследованиях по биологической защите растений. Для защиты растений от вредных организмов из клеточных технологий используют микрклональное размножение растений. Это направление необходимо для получения растений, свободных от фитопатогенов. Методы клеточной инженерии позволяют получать растения, устойчивые не только к болезням, но и к вредителям. Получение культуры клеток насекомых важно для размножения бакуловирусов – основы вирусных энтомопатогенных препаратов для защиты растений.

Цель: Ознакомление с методами получения культур клеток и тканей, используемых в защите растений.

Основные термины:

Изолированный протопласт - клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного или механического способа.

Меристема - кусочек меристемной ткани с первой парой листовых зачатков.

Соматическая (парасексуальная) гибридизация - система, вовлекающая в генетическую рекомбинацию хромосомы и гены ядра и органелл вне сексуального цикла (слияние протопластов).

Тотипотентность - способность ядра одной клетки передавать информацию о формировании всех типов клеток, характерных для взрослого организма.

Учебные материалы и оборудование: постеры, слайды по методам получения культур клеток, учебный фильм.

План занятия:

1. Познакомиться с технологией получения культур клеток насекомых. Описать поэтапно схему.
2. Описать методы получения безвирусного семенного материала на примере оздоровления картофеля.
3. Ответить на контрольные вопросы.

❖ **Контрольные вопросы:**

1. В чем суть метода оздоровления растений?
2. Что такое картофельное дерево?
3. Преимущества и недостатки культур клеток насекомых

ЗАНЯТИЕ 4 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Для определения белков, нуклеиновых кислот и других макромолекул, а также оценки количества микроорганизмов широко используются **спектральные методы** анализа (спектрофотометрический и фотометрический). Они основаны на измерении поглощения светового потока, проходящего через раствор какого-либо вещества. Оба метода часто называют колориметрическими (colour), хотя правильнее называть их методы спектрального анализа. Спектрофотометрический метод основан на

измерении света определенной длины волны, а фотометрический - в определенном диапазоне длин волн, причем в видимой области спектра (цветной). Цвет раствора, который воспринимается глазом, считается дополнительным к цвету поглощенной части спектра. Например, раствор, который поглощает желто-зеленую часть спектра ($\lambda = 560\text{--}570\text{ нм}$), для наблюдателя воспринимается как фиолетовый. Если поглощается сине-зеленый цвет ($490\text{--}500\text{ нм}$), то цвет раствора красный, и, наоборот, при поглощении красного цвета ($625\text{--}750\text{ нм}$) цвет раствора сине-зеленый.

Интенсивность поглощения света выражают величиной оптической плотности D , равной логарифму отношения интенсивности падающего света к интенсивности света, прошедшего через раствор. Само отношение называют пропусканием раствора.

Все измерения концентрации анализируемых веществ основаны на законе Ламберта - Бера:

$$D = \varepsilon \times l \times c, \text{ где}$$

ε - коэффициент поглощения (экстинкция);

l - толщина поглощающего слоя (кюветы);

c - концентрация.

В фотоэлектроколориметрах (ФЭК) приемником световой энергии служит фотоэлемент, преобразующий световую энергию в электрическую. Источник света - лампа накаливания. Спектрофотометр (СФ) в отличие от ФЭК снабжен еще и монохроматором, служащим для получения из непрерывного спектра узкого интервала длин волн. В СФ два источника света: лампа накаливания для измерений в видимой части спектра и водородная (дейтериевая) лампа для измерений в ультрафиолетовой области. Соответственно кюветы и стеклянные, и кварцевые.

Существует простой метод спектрофотометрического определения содержания нуклеиновых кислот, предложенный А.С.Спириным. Метод основан на том, что фосфорные остатки нуклеиновых кислот поглощают свет при длинах волн 270 и 290 нм. Выведена простая формула для количества нуклеинового фосфора в микрограммах.

$$C = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19}$$

Учитывая, что содержание фосфора в РНК составляет 9,5%, а в ДНК - 9,9%:

$$\text{для РНК } C = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19} \times 10,5;$$

$$\text{для ДНК } C = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19} \times 10,1.$$

Рекомендуется проводить дополнительный замер при D_{260} . Если D_{260} и D_{270} отличаются более, чем на 15%, то это указывает на примеси не нуклеиновой природы, тогда формула не отражает истинного значения.

Колориметрические методы определения ДНК, РНК и белка. Для количественного определения концентрации нуклеиновых кислот и белков разработано много цветных реакций. К числу наиболее распространенных из них относятся дифениламиновая реакция на ДНК, орциновый тест на РНК и определение белков по методу Лоури.

Определение концентрации ДНК основано на том, что при нагревании при 100°C смеси раствора ДНК и дифениламинового реактива развивается устойчивая синяя окраска. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации ДНК, а регистрируют эту величину фотометром, ФЭК или СФ.

Определение концентрации РНК основано на том, что при нагревании раствора, содержащего рибозу, орцин, HCl и FeCl_3 развивается интенсивная зеленая окраска. Однако окраску дает и 2-дезоксирибоза, поэтому ДНК отделяют от РНК.

Для определения концентрации белка широкое распространение получил метод Лоури. В основе двухстадийной реакции Лоури лежит восстановление реактива Фолина комплексом, образующимся при взаимодействии белка с ионами меди. Интенсивность синей окраски, образующейся в результате этой реакции, пропорциональна концентрации белка в пробе. Реактив Фолина содержит ионы меди и фенол. Степень окраски регистрируется при длине волны 750 нм, если концентрация белка в пределах 5 - 25 мкг/мл.

ЗАНЯТИЕ 5

ОСНОВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЗОНАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения биологических агентов используют методы молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот и пептидного картирования белков. В свою очередь эти методы основаны на применении хроматографии, электрофореза, ультрацентрифугирования, которые относятся к зональным методам исследований.

Цель: Познакомиться с основными зональными методами для оценки возможностей идентификации биологических объектов.

Основные термины:

Хроматография

Электрофорез

Ультрацентрифугирование

Учебные материалы и оборудование: Схемы, плакаты, центрифуга, прибор для электрофореза, автоматическая пипетка, пластины и колонки для хроматографии, магнитная мешалка.

План занятия:

1. Изучить теоретическую часть, познакомиться с хроматограммами аминокислот и пептидными картами белков.
2. Познакомиться с оборудованием, необходимым для использования зональных методов.
3. Ответить на контрольные вопросы.

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ (теоретическая часть).

Для разделения и идентификации белков и нуклеиновых кислот используют так называемые *зональные методы*. Общий принцип – создается система, в которой компоненты смеси перемещаются с разными скоростями. Если в систему внести смесь, то по мере продвижения в системе компоненты смеси, движущиеся с разными скоростями, будут формировать отдельные *зоны*, которые, в конце разносят в разные приемники, получая отдельные фракции. Поскольку скорость перемещения каждого компонента определяется только ему присущими константами, то эти методы имеют и аналитическое значение в плане идентификации компонента и определения его количества.

Хроматография – важнейший зональный метод. Для анализа биополимеров используется жидкостная хроматография. В данном случае зона разделяемых веществ с помощью потока элюирующей жидкости перемещается относительно неподвижной фазы, обладающей разным сродством к компонентам смеси. Чем больше вещество задерживается на неподвижной фазе, тем медленнее выходит соответствующая зона. Различают хроматографию адсорбционную, ионообменную и распределительную. В *адсорбционной* для нормального течения хроматографического процесса необходимо, чтобы взаимодействие между адсорбентом (окись аммония, силикагель, крахмал, целлюлоза, цеолиты) и адсорбируемым веществом было обратимым. В *ионообменной* хроматографии сорбент обменивает анионы или катионы с ионами в растворе. *Распределительная* хроматография включает бумажную и тонкослойную (на силикагеле). Основана на распределении веществ между двумя несмешивающимися жидкими фазами.

Гель-хроматография использует принципы гель-фильтрации. Зоны, отвечающие молекулам большего размера, перемещаются здесь с более высокими скоростями.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) основана на применении высокого давления, позволяющего проводить элюцию (вымывание зон) за несколько минут, используя малые размеры частиц неподвижной зоны.

Хроматография в системе жидкость - твердое тело была вначале разработана для разделения окрашенных веществ, откуда и происходит название (по-гречески chroma - цвет). Русский ботаник М.С. Цвет впервые использовал метод хроматографии для разделения окрашенных растительных компонентов в 1903-1906 гг. По методу Цвета оборудование для хроматографии было очень несложным. Основная часть - колонка, которая придает адсорбенту вид столбика. В нижней части колонки пористое стекло. Обычно отношение диаметра столбика к высоте колеблется от 1:5 до 1:20, в среднем 1:10. Сама колонка должна быть длиннее, чтобы сверху помещался слой разделяемой смеси и растворителя. Компоненты адсорбировались твердой фазой неодинаково, один останавливался наверху, другой продвигался вниз. Затем пропускали через колонку растворитель, который вымывал (элюировал) сначала то, что в нижней части колонки, затем - в верхней.

Следующий широко распространенный зональный метод исследования белков и нуклеиновых кислот - **электрофорез**. Он отличается от хроматографии тем, что разделение веществ происходит не только за счет разной их адсорбции, но и дополнительно за счет приложения электрического поля. Разные компоненты смеси с разной скоростью движутся в электрическом поле. Главным образом, используется электрофорез в гелях (*гель-электрофорез*). Наиболее распространены полиакриламидные (ПААГ) и агарозные гели.

Фракционирование белков и нуклеиновых кислот с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Сейчас в основном используют электрофорез в пластинах ПААГ. Верхняя часть геля находится в верхнем электродном сосуде, а нижняя - в нижнем. Электрофорез нативных белков

ведут в буферных растворах с высоким рН (8,3). Однако если это основные белки, то рН буфера 4,3. Если нужно анализировать материал после денатурации или диссоциации, то обычно в буфер вводят додецилсульфат натрия. Большинство белков удовлетворительно мигрируют в ПААГ концентрации 7,5%.

Полиакриламидный гель образуется из акриламида непосредственно перед анализом. Для этого акриламид растворяют в воде с некоторыми добавками (для создания рН) и оставляют под лампой дневного света для полимеризации, предварительно разлив раствор в формы. Акриламид очень легко образует гели в концентрации от 2% до 20%. Гель с низкой концентрацией (рыхлый) используется для анализа макромолекул с высокой молекулярной массой \approx 1-2 миллиона дальтон. Если же гель плотный (отверстия молекулярного сита малы), то он используется для анализа небольших молекул с молекулярной массой около 1000 дальтон. Электрофорез обычно идет несколько часов. Чтобы следить за его ходом, в пробу добавляют краситель, и окрашенная полоска идет впереди всех макромолекул.

По окончании процесса извлеченный гель переносят в окрашивающий раствор. После окраски проявляются зоны, соответствующие отдельным фракциям или макромолекулам.

Разделение в центробежном поле в ультрацентрифугах. Смесь наносят в виде зоны поверх носителя в центрифужной пробирке. В ходе центрифугирования вещества, различающиеся константами седиментации, будут формировать отдельные зоны. По окончании процедуры либо прокалывают дно пробирки и раскапывают зоны по разным приемникам – пробиркам, либо через опущенную до дна трубочку отбирают разные зоны, собирая серию фракций. Чаще всего разделяемую смесь наносят на помещенный в центрифужную пробирку раствор сахарозы с непрерывным **градиентом плотности**.

Используя специальный прибор, готовят градиенты плотности сахарозы. Формирующийся градиент вводят в центрифужную пробирку так, чтобы верхняя граница

образца, нанесенного на градиент, отстояла от края пробирки на 5 мм.

Пробирки с градиентом концентрации сахарозы помещают в бакет-роторы (подвесные), которые устанавливаются при центрифугировании горизонтально. На градиент наслаивают анализируемый раствор нуклеиновой кислоты. Центрифугируют несколько часов при 40 000 об/мин, что позволяет разным фракциям занять свою зону соответствующую их плотности. Анализируют ДНК также с помощью равновесного ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия.

Поскольку передвижение макромолекулы при электрофорезе в полиакриламидном геле или при ультрацентрифугировании в градиенте концентрации зависит от ее размеров, то этими методами можно определить молекулярную массу как белков, так и нуклеиновых кислот.. Молекулярную массу неизвестного биополимера определяют путем сравнения его подвижности с подвижностью макромолекулы известной молекулярной массы. Для белков выполняется линейная зависимость электрофоретической подвижности от **логарифма** молекулярной массы. При этом часто пользуются не абсолютной, а относительной электрофоретической подвижностью, R_f , выражаемой как отношение длины пути, пройденной анализируемым биополимером, к длине пути, пройденной красителем, или стандартным белком. Соответственно строят график зависимости R_f от логарифма молекулярной массы.

Количественное определение веществ в каждой фракции, собранной после хроматографии, электрофореза или ультрацентрифугирования проводят спектральными методами. Каждую пробирку просматривают на спектрофотометре при нужной длине волны.

◆ **Контрольные вопросы:**

1. Что относится к зональным методам анализа биополимеров?
2. Какие виды хроматографии используются в исследованиях?
3. В чем состоит сущность электрофореза?
4. Каковы принципы определения молекулярной массы биополимеров?

ЗАНЯТИЕ 6

ИММУНОДИАГНОСТИКА

Учебные материалы и оборудование: наборы реактивов для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) по выявлению вирусов и бактерий, учебный фильм.

План занятия:

1. Познакомиться с технологией проведения иммуноферментного анализа (ИФА).
Описать поэтапно ход анализа, нарисовать схему. Ответить на контрольные вопросы.

Иммуноферментный анализ – метод обнаружения антигена с помощью антитела, меченного ферментом. В качестве антигена могут быть фито- или энтомопатогенные микроорганизмы.

Метод основан на специфическом связывании антитела с антигеном, при этом один из компонентов конъюгирован с ферментом. В качестве фермента чаще всего используют пероксидазу. В результате реакции фермента с соответствующим хромогенным субстратом образуется окрашенный продукт, количество которого определяют спектрофотометрически.

Основные принципы твердофазного ИФА:

1. На первом этапе адсорбируют антигены на твердой фазе (полистирольная плата с лунками). При этом не связавшиеся с твердой фазой антигены легко удаляются отмытием.

2. В лунках инкубируют исследуемый образец с антителом. При этом на поверхности твердой фазы формируются иммунные комплексы. Несвязавшиеся компоненты удаляют отмытием.

3. При добавлении конъюгата антитело-фермент или антиген-фермент и связывании его с иммобилизованным иммунным комплексом активный центр фермента остается доступным для последующего взаимодействия с субстратом. Инкубация субстрата в лунках с иммобилизованным конъюгатом приводит к развитию цветной реакции. Эту реакцию оценивают количественно по оптической плотности, основываясь на том, что количество фермента равно количеству первоначально взятого антигена (анализируемой бактерии или вируса).

◆ **Контрольные вопросы:**

1. *Что такое иммунодиагностика?*
2. *Перечислите этапы проведения иммуноферментного анализа.*
3. *Как еще называют метод ИФА и почему?*

ЗАНЯТИЕ 7

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

На современном этапе наиболее точным методом идентификации объектов биологической защиты растений является метод анализа нуклеиновых кислот под названием полимеразная цепная реакция (ПЦР).

ПЦР разработан на основе **гибризационного метода**. Гибридизация нуклеиновых кислот - высокочувствительный метод, в основе которого лежит специфическое взаимодействие между полинуклеотидными цепями, осуществляющееся путем спаривания комплементарных оснований. Применяются три типа гибридизации: ДНК-РНК, ДНК-ДНК и РНК-РНК. Если осуществляется гибридизация неизвестного участка НК с известным фрагментом (зондом), то последовательность неизвестного участка выявляется по этому зонду.

Чувствительность гибризационного анализа можно повысить, используя способность нуклеиновых кислот к самокопированию. Этот прием называется **амплификацией**. Он и лежит в основе ПЦР.

Цель: моделировать реакции, происходящие во время проведения ПЦР, имитировать разрезание амплифицированной ДНК рестриктазами и моделировать процесс гель-электрофореза.

Учебные материалы и оборудование: цветная бумага для конструирования; ножницы; линейка; цветные карандаши, маркеры разных цветов; модель *Taq* ДНК-полимеразы; изображение ДНК-геля с ячейками на старте; 3 полоски ДНК равной длины и трех разных цветов.

Основные термины

Амплификация — многократное увеличение числа анализируемых молекул нуклеиновых кислот.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — метод анализа нуклеиновых кислот, основанный на их способности к самокопированию.

Праймеры — синтезированные короткие олигонуклеотиды, комплементарные 3'-концам обеих нитей амплифицируемого участка ДНК.

Рестриктаза – фермент, расщепляющий нуклеиновую кислоту в определенных точках на фрагменты.

План занятия: Выполнить последовательно описанные ниже операции, отвечая на контрольные вопросы в ходе выполнения задания.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод, посредством которого очень малое количество ДНК можно многократно копировать для получения больших количеств. Множественные копии ДНК затем анализируют для выявления специфичности, используя гель-электрофорез. Для амплификации требуется не только наличие анализируемой ДНК, но и ДНК-полимеразы, а также специальных «затравок», указывающих, на каком участке должна идти амплификация. Роль «затравок» выполняют специально синтезируемые короткие олигонуклеотиды (**праймеры**), комплементарные 3'-концам обеих нитей ДНК. Только тогда происходит репликация ДНК, причем именно той, для которой выбраны праймеры. Процесс продолжается по типу цепной реакции (см. схему). Так как ДНК-полимераза может при нагревании инактивироваться, выбирают ферменты из термофильных организмов, например, ТАQ-полимеразу. ПЦР открывает возможность детектирования небольшого числа известных полинуклеотидных цепей, например, вируса СПИДа в крови или растительных вирусов. Аналогично ДНК определяют РНК, но предварительно проводят обратную транскрипцию с помощью соответствующего фермента.

Последовательность выполнения задания.

Часть 1 - Моделирование метода ПЦР

1. Сделайте 4 бумажные полоски, изображающие нити ДНК одинаковой длины и 2 небольшие полоски для

праймеров другого цвета. Проверьте, чтобы полоски бумаги были одинаковой длины.

2. Возьмите 2 полоски, изображающие две нити ДНК, и положите их на стол вертикально. На левой нити обозначьте маркером конец 3' одним цветом, а на правой другим. Это исходная ДНК. Ответьте на вопросы 1 и 2.

3. Приготовьте из цветной бумаги разных цветов две очень короткие полоски (2 мм), которые будут представлять праймеры -олигонуклеотиды.

☐ В процессе ПЦР первоначальной стадией является обработка малого количества ДНК или даже единственной молекулы. В небольшую пробирку помещают ДНК, которую хотят копировать, *Taq* ДНК-полимеразу, равные количества четырех нуклеотидов, ионы Mg и K, обеспечивающие работу полимеразы, и олигонуклеотидные праймеры. *Taq* – сокращенное название бактерии *Thermus aquaticus*, обитающей в горячих водных источниках.

☐ Первым шагом должно быть нагревание смеси до 95°. Тогда 2 нити ДНК разделяются (денатурация).

4. Ответьте на вопрос 3.

5. Отодвиньте 2 полоски ДНК друг от друга. Зарисуйте их и запишите: денатурация.

☐ Теперь смесь следует поместить в водяную баню при 65°. При этой охлаждающей температуре праймеры спариваются с комплементарными им участками на ДНК. Это называется **отжигом**. Праймеры присоединяются только к 3' концам каждой нити.

6. Присоедините 2 мм полоски праймеров к соответствующим 3' концам. Запишите под рисунком – отжиг. Ответьте на вопросы 4, 5, 6.

□ В следующей стадии температура смеси поднимается до 72°. Праймеры сигнализируют полимеразе, куда начинать присоединять соответствующие нуклеотиды, комплементарные ДНК в направлении к 5' концу.

7. Вырежьте из бумаги изображение полимеразы в виде квадрата или овала. При скольжении ее вдоль цепи от праймера на левой нити будет реплицироваться комплементарная ей нить. Образуется фрагмент двухтяжевой ДНК. Присоедините параллельно еще одну полоску, изображающую нить ДНК. Запишите: удвоение левой нити.

8. Эта процедура повторяется на правой нити. Очевидно, процесс происходит одновременно. Ответьте на вопрос 8.

9. Этот цикл повторяется. Если ДНК удваивается в количестве каждые 5 мин, сколько потребуется времени для получения 100 идентичных молекул? Ответьте на вопрос 9.

Часть 2. Электрофорез в геле

Обычно бактерии продуцируют эндонуклеазы рестрикции, чтобы защитить себя от вторжения чужой ДНК (вирусов). Когда рестриктаза распознает такую ДНК, она разрезает ее на куски с определенной последовательностью оснований, длиной в 2-6 нуклеотидов. Специфические рестриктазы разрезают только в определенных местах соединения оснований.

Рестриктаза **HaeIII** распознает последовательность 5'...ГГЦЦ...3' и в двухтыжевой

ДНК разрезает 5'...ГГ`ЦЦ...3'

3'...ЦЦ`ГГ...5'

AluI разрезает 5'...АГ`ЦТ...3'
5'...ГАТ`АТЦ...3'

EcoRV разрезает

3'...TC`GA...5'

3'...ЦТА`ТАГ...5'

NruI разрезает 5'..ТЦГ`ЦГА...3"

3'...АГЦ`ГЦТ...5'

☐ Если *EcoRV* смешать с ДНК, она узнает все последовательности из шести определенных оснований, где бы они не находились по всей длине молекулы, и разрежет их на каждом участке. Ответьте на вопрос 10.

☐ В гель-электрофорезе ДНК, разрезанная рестриктазами, помещается в ячейку агарозного геля. Гель помещается в камеру и покрывается буферным раствором. Как только все ячейки заполняют образцами ДНК с красителем, через гель пропускают ток. Фосфорные группы заряжены отрицательно и движутся к положительному электроду. Самые маленькие молекулы быстрее всего перемещаются к катоду. Одни фрагменты идут впереди, другие остаются позади.

☐ Фрагменты разной длины распределяются в геле на разных расстояниях от начала. Их можно видеть, так как они адсорбировали добавленный краситель. Ответьте на вопрос 11.

- Если стандартная ДНК, разрезанная известными рестриктазами, одновременно с неизвестной ДНК движется в геле, то можно сравнить с ней фрагменты неизвестной длины по расстоянию, пройденному в геле.

Последовательность действий.

1. Полоску ДНК цвета 1 примем за стандарт. Обозначьте ее длину как 100 единиц, причем 20 см = 100 единицам. 1 см=5 единицам =5 кб (1000 пар оснований). Представьте, что рестриктаза **AluI** разрезает ее (начиная слева) между парами оснований в следующих местах: 5 kb, 15 kb, 44 kb, 66 kb, 86 kb. Разрежьте стандартную ДНК в соответствующих местах.
2. Фрагменты стандартной ДНК продвигаются на расстояния 12.8 см, 12.5 см, 11.1 см., 9.5 см., 9.0 см., and 7.8 см. Поместите эти фрагменты на лист белой бумаги, имитирующий пластинку геля на соответствующих расстояниях от начальной ячейки 1. Можно приклеить скотчем или пометить карандашом их положение.
3. Та же самая рестриктаза разрезает анализируемый образец ДНК цвета 2. Ее фрагменты перемещаются на 7.0 см, 12.5 см, 9.4 см и 6.8 см. Поместите разрезанные полоски на «пластинку геля», начиная от ячейки 2. Фиксируйте их. Ответьте на вопрос 12.
4. Представьте, что ДНК цвета 3 мутировала в точке, отстоящей на расстоянии 4 кб, что изменило последовательность АЦЦТ на АГЦТ. Ответьте на вопрос 13 .
5. Разрежьте эту ДНК (слева направо, по сравнению с ДНК цвета 2 изменится первый разрез: вместо 5 будет 4 кб). Два новых фрагмента движутся на расстояние 12,8 и

8,5 см. Поместите их на гель, начиная от ячейки 3, и укрепите. Если они одной длины, положите друг на друга (как в реальном геле). Ответьте на вопрос 14.

□ Более точный способ измерить длину фрагмента в реальном геле – графический. На графике откладывают логарифмы расстояния, пройденные фрагментами по сравнению со стандартными. Каждый раз надо строить свой график, так как миграция фрагмента зависит от многих переменных – качества геля, напряжения, буфера и т.д.

◆ **Контрольные вопросы:**

1. Почему два конца ДНК обозначают как 3' и 5' ?
2. Как эти концы соотносятся при связывании двух нитей?
3. Как водородные связи откликаются на сильное нагревание?
4. Зачем нужно понизить температуру в этой стадии?
5. Если на левой полоске ДНК нуклеотиды 3' - 5' читаются как АТЦЦГАТТЦ, какие олигонуклеотиды нужны для правильного считывания праймером в направлении 5'-3'?
6. Праймер, присоединенный к 3'концу правой полоски, читает 5' -ГАЦЦТАГТТ-3'. Каков порядок оснований 3' - 5' на правой полоске.
7. Какой химический смысл использования *Taq* ДНК полимеразы вместо энзима из организма человека, функционирующего при 37°C?
8. Сколько молекул двухтяжевой ДНК получится после трех стадий ПЦР одного цикла?

9. Обратитесь к стадии 9 последовательности лабораторной работы.

10. а) Какой фермент мог бы разрезать последовательность ДНК 5'...АЦТГЦТАГЦТТЦЦГАТАГЦТГЦ...3'?

б) Сколько разрезов может сделать фермент, который вы выбрали? с) Покажите разрезы стрелкой и подчеркните фрагменты после разреза.

11. Что вы можете сказать о размере каждого фрагмента, соотнеся его с сантиметрами пройденного пути.

12. Используя стандарт как точку отсчета, запишите вашу оценку числа единиц=оснований в фрагменте ДНК цвета 2.

ЗАНЯТИЕ 8

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА БИОПРЕПАРАТОВ И ЭНТОМОФАГОВ

Биологические средства защиты растений (биопрепараты и энтомофаги) должны отвечать определенным требованиям, т.е. быть стандартизованы. Стандартизацию и оценку качества биопрепаратов проводят по количеству действующего начала (споры, включения, клетки, метаболиты) в единице массы или объема и по биологической активности.

Для определения количества действующего начала (*титра препарата*) используют разные методы в зависимости от природы действующего агента. Так, количество жизнеспособных спор или клеток определяют посевом препарата на питательную среду (ПС) с дальнейшим подсчетом выросших колоний. Титр вирусных препаратов (и других организмов, не размножающихся на ПС) посчитывают в камере Горяева под световым микроскопом.

Количество токсинов, антибиотиков, других БАВ определяют хроматографическими и спектральными методами.

Биологическую активность как главный показатель качества биопрепарата измеряют реакцией тест-объекта на действие биопестицида. Тест-объектами являются насекомые (для энтомопатогенных препаратов) или фитопатогены (для препаратов против болезней растений).

Цель: Проанализировать различные методы определения биологической активности и титра биопрепаратов.

Основные термины:

Биологическая активность препарата – ответная реакция тест-объекта на действие биопрепарата, выраженная в единицах активности.

Биологическая активность энтомо- или акарифага - способность энтомофага обнаруживать и заражать (уничтожать) насекомое-фитофаг.

Стандартизация – доведение всех качественных и количественных показателей биопрепарата до уровня стандарта (по количеству действующего начала, по биологической активности и др.).

Титр – количество жизнеспособных спор (клеток) в единице массы или объема (1 мл или 1 г) препарата, один из показателей качества биопрепарата.

План занятия:

1. Описать методы определения титра биопрепаратов путем посева на питательные среды (ПС), в камере Горяева или под электронным микроскопом. Проанализировать достоинства и недостатки всех методов определения титра действующего начала.
2. Описать методы определения биологической активности биопрепаратов и энтомофагов.

◆ **Контрольные вопросы:**

1. *Что такое стандартизация и какие показатели характеризуют качество биопрепаратов и энтомофагов?*
2. *Каким методом целесообразно определять титр препаратов на основе спор грибов и почему?*
3. *Назовите преимущества и недостатки метода определения титра биопрепаратов с помощью камеры Горяева.*
4. *Когда следует использовать методы хроматографии и спектрофотометрии для оценки количества действующего начала?*

ЗАНЯТИЕ 9

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Для оценки влияния биологических средств защиты растений на целевые объекты рассчитывают показатели биологической и хозяйственной эффективности.

Биологическую эффективность биопрепаратов против вредителей определяют на основе учетов гибели насекомых до и после применения биопрепаратов или выпуска энтомофагов. Эффективность биопрепаратов против болезней растений оценивают по показателям распространенности и развития болезни.

Способность энтомофага подавлять вредителя, против которого он предназначен, определяют либо по степени снижения хозяйственного ущерба, либо по разнице в плотности популяции вредного вида в местах, где энтомофага не использовали и где он был применен (биологическая эффективность). При пассивной

биологической защите используют критерий эффективности хищника или паразита.

◆ **Контрольные вопросы:**

1. Чем отличается биологическая эффективность от хозяйственной?
2. По какой формуле определяют биологическую эффективность энтомо- или акарифага?
3. Какие показатели используют для определения эффективности биологических средств защиты от болезней?

КУРСОВАЯ РАБОТА ПО ДИСЦИПЛИНЕ

В рамках курсовой работы представляется аналитический обзор литературы и раскрывается тема работы с иллюстрациями и библиографическим списком.

Структура курсовой работы:

1. Титульный лист
2. Реферат
3. Оглавление
4. Введение
5. Аналитический обзор литературы
6. Основная часть
7. Заключение
8. Библиографический список

Общий объем работы – 20-25 страниц.

Оформление должно соответствовать ГОСТу (Метод. указания / Оформление курсовых, дипломных работ и проектов).

Введение

Раскрывается актуальность темы. Объем – 1-1,5 с.

Аналитический обзор литературы

Подробно и систематизировано излагается состояние вопроса, которому посвящена работа: указать проблемы

биологической защиты растений, значение методов исследований в зависимости от темы. Объем – 8-10 с.

Основная часть. Подразделяется на несколько подразделов, рассматривающих роль выбранных методов исследований в биологической защите растений вообще, и, в частности, для биозащиты определенного объекта (фитофага или фитопатогена как основного примера). Объем 8-10 с.

Библиографический список

Ссылки на литературу в тексте приводятся цифрами в квадратных скобках по мере их упоминания или в круглых скобках, где указывается фамилия автора и год. Список составляется в соответствии с требованиями ГОСТ по алфавиту. Обязательно приведение 2-3 зарубежных источников, общее число ссылок не менее 30.

Темы курсовых работ:

1. Использование метода ПЦР в биологической защите растений.
2. Роль спектральных методов в исследованиях по биозащите.
3. Современные методы исследований энтомопатогенных микроорганизмов.
4. Новейшие методы диагностики возбудителей болезней растений.
5. Стандартизация энтомофагов.
6. Определение титра и биологической активности биопрепаратов.
7. Использование методов клеточной биологии в биологической защите растений.
8. Методы получения ГМ-растений с введением генов биологических агентов.
9. Методы учета эффективности энтомофагов.
10. Современные методы массового размножения энтомофагов.
11. Методы наработки биопрепаратов для защиты растений.
12. Критерии качества энтомофагов.

Рекомендуемая литература

1. Штерншис М.В. Биотехнология в защите растений [Электронный ресурс] / М.В. Штерншис, О.Г. Томилова, И.В. Андреева, Т.В. Шпатова. - Новосибирск, 2015. – отдел электронных ресурсов НГАУ.
2. Сельскохозяйственная биотехнология и биоинженерия. Учебник под ред. В.С.Шевелухи.- изд.4-е, переработ. и дополн. М.: ЛЕНАНД, 2015.- 704 с.
3. Введение в биотехнологию: учеб. пособие/А.И.Нетрусов. М.: Академия, 2015. - 288 с.