

Генетичні основи біотехнології

Лабораторне заняття № 1-3

Тема: Інструментарій біотехнологічної лабораторії. Неорганічні та органічні компоненти поживних середовищ. Фітогормональний склад поживних середовищ. Маточні розчини.

Мета: ознайомитися з основними інструментами біотехнологічної лабораторії. Вивчити компоненти поживних середовищ.

Матеріали та обладнання: хімічні склянки, колби, мірні циліндри від 10 мл до 1 л, пробірки, піпетки від 0,01 мл до 10 мл або дозатори, ваги аналітичні, пінцети, рН-метр, ножиці, шпателі, електроплитка, магнітна мішалка, макро- і мікросолі, вітаміни, гормони, маркер.

Питання для самостійної підготовки

1. Як влаштована біотехнологічна лабораторія?
2. Як простерилізувати живильні середовища, посуд, дистильовану воду, інструменти?
3. Як відбувається стерилізація приміщення лабораторії?
4. Що таке маточний розчин?

Теоретичні відомості

Устаткування біотехнологічної лабораторії і правила роботи з ним

Для організації біотехнологічної лабораторії необхідні простори ізольовані приміщення, а також сучасне устаткування і високоякісні реактиви. Для зручності проведення дезінфекції підлоги стіни і стелю в приміщеннях повинні мати водостійке та ультрофіолето-стійке покриття.

Устаткування мийного приміщення: мийки з гарячою і холодною водою; дистильована вода; дистиллятори і бідістилятори; сушильні шафи з режимом роботи для сушки посуду - до 100-130оС, для інструментів - до 170оС; шафи для зберігання чистого посуду і інструментів, ємності для зберігання миючих засобів, витяжні шафи з Ексикатор для хромпіка (H₂SO₄ 98% + K₂CrO₇).

Устаткування приміщення для приготування поживних середовищ: лабораторні столи; холодильники для зберігання маткових розчинів солей, гормонів і вітамінів; аналітичні і торсіонні ваги; іономер; магнітні мішалки; плитки, газові пальники; набір посуду (колби, склянки, мірні циліндри, мензурки, колби і ін.), необхідний набір хімічних реактивів належної ступеня чистоти (ХЧ, Ч, ЧДА).

Устаткування приміщення для стерилізації: автоклави з режимом роботи - тиск 1-2 атмосфери і температура 120оС; стелажі для штативів з живильними середовищами; шафи для зберігання стерильних матеріалів.

Дане приміщення повинно бути обладнане припливно-вентиляцією і мати каналізаційний злив для відводу конденсату з автоклава.

Устаткування приміщення для інокуляції рослинних експлантів на поживні середовища: ламінар-боксы, лабораторні столи, стелажі, бактерицидні лампи, шафи для матеріалів і устаткування.

Устаткування культуральних приміщень: світлове відділення - джерела освітлення зі спектром близьким до спектру денного світла (від 3 до 10 kLx), кондиціонер для регуляції температури (25 ± 2 о С) і вологості повітря (70%), стелажі для штативів з культивуються матеріалом; темнове відділення - з тим же обладнанням, виключаючи джерела освітлення. Для культивування експлантів на живильному середовищі бажано використовувати термостати або хладотермостати, здатні з високою точністю підтримувати задаються режими температури і вологості повітря.

Необхідний набір посуду, інструментів і матеріалів в біотехнологічній лабораторії:

мірні колби, колби Ерленмейера, хімічні склянки, мірні циліндри, чашки Петрі, пробірки, пляшки, піпетки, скляні палички, скляні та мембранні фільтри, ланцети (В тому числі очні, хірургічні, анатомічні), ножиці, пінцети, ножі, леза для гоління, препарировальні голки, шпателі, папір (Обгортковий, пергаментний, фільтрувальна), фольга алюмінієва, вата, марля, шпагат.

Склад живильного середовища необхідно підбирати для кожного виду рослин. На мікроклональне розмноження впливають гормони, мінеральні солі, вітаміни і вуглеводи. При розмноженні *in vitro* часто використовують середовища Мурасіге і Скуга, Гамборга, Хеллера і інші. зазвичай використовують середу Мурасіге-Скуга (MS), яка містить багато неорганічного азоту, що стимулює процеси органогенезу і соматичного ембріогенезу. Питання оптимального співвідношення NH_4 - NO_3 залишається відкритим, так як літературні дані досить суперечливі і універсального рецепта для всіх видів рослин немає. Як джерело вуглецевого живлення використовують різні вуглеводи типу сахарози, глюкози, фруктози, галактози. Різні культури вимагають різної концентрації вуглеводів на різних етапах мікроклонального розмноження. Компоненти середовища для вирощування рослинних клітин і тканин можна розділити на 6 основних груп, що зазвичай відображає порядок приготування концентрованих маткових розчинів: макроелементи, мікроелементи, джерела заліза, вітаміни, джерела вуглецю, фітогормони.

Основою для всіх поживних середовищ для культивування рослинних експлантів є суміш мінеральних солей. це сполуки азоту у вигляді нітратів, нітритів, солей амонію; фосфору - в вигляді фосфатів; сірки - у вигляді сульфатів; а також розчинних солей K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} . Залізо використовується у вигляді хелатів $[\text{FeO}_4$ або $\text{Fe}_2\text{O}_4 + \text{ЕДТА}$ (етилендіамінтетраоцтової кислоти) або її натрієва сіль Na ЕДТА (Трилон Б)] - найбільш доступній формі для засвоєння рослинними тканинами. Азот, фосфор, сірка входять до складу органічних сполук: білків, жирів, нуклеїнових кислот. Залізо, цинк, марганець, молібден, кобальт в поєднанні з

порфіринами утворюють макромолекули пігментів фотосинтезу (Хлорофілу), окислювально-відновних ферментів (каталази, пероксидази, поліфенолоксидази). Отже, всі ці сполуки виконують в клітинах і тканинах структурну функцію. У той же час іони Do^+ , Na^+ , Ca^{++} , Cl^- , H^+ необхідні для регуляції рН середовища і підтримки фізіологічних градієнтів клітин (тургору, осмотичного тиску, полярності).

Як джерело вуглецю для біологічних макромолекул, а також при культивуванні гетеротрофних тканин (калусів і суспензій) в поживні середовища додають вуглеводи в концентрації 20-60 г / л. зазвичай це дисахариди (сахароза), моносахариди (гексози: глюкоза і фруктоза, пентози: ксилоза та інші). Полісахариди в поживних середовищах практично не використовуються. Тільки деякі типи тканин (пухлинні), містять гідролітичні ферменти, вирощують на середовищах з крохмалем, рафінозою, целлобіозом.

Для стимуляції біохімічних реакцій в клітці використовують біологічні катализатори - вітаміни групи В (В1, В6, В12), С (Аскорбінову кислоту), РР (нікотинову кислоту), мезоінозит. Тіамін (В1) входить до складу піруватдекарбоксилази, бере участь в перетвореннях вуглеводів. Тіамінпірофосфат входить до складу ферментів окисного декарбоксилювання кетокислот (піровиноградної і кетоглутарової), є коферментом транскетолази. Піридоксин (В6) у вигляді фосфорнокислого ефіру входить до складу ферментів декарбоксилювання і переамінування амінокислот. Нікотинова кислота (РР) у вигляді амідів входить до складу дегідрогеназ НАД і НАДФ, які каталізують донорно-акцепторні ланцюги H^+ (відібрання H^+ від молекул органічних речовин).

Для управління процесами формоутворення в культурі тканин необхідні біологічні регулятори росту і розвитку - фітогормони. Ці речовини впливають на диференціацію і дедиференціації клітин і тканин, ініціюють гистогенез, індукують поділ і розтягнення клітин, беруть участь в процесах старіння і дозрівання, або стимулюють, або інгібують ріст і розвиток клітинних культур, обумовлюють формування статі. У біотехнологічних дослідженнях частіше використовують гормони, що стимулюють ріст і розвиток: ауксини, цитокініни, гібереліни. Ауксини: ІУК - індолил-3-оцтова кислота, ІМК - індолил-3- масляна кислота, НУК - нафтілукусусная кислота, 2,4-Д - 2,4- діхлорфеноксі-оцтова кислота. Цитокініни: кинетин - 6-фурфуріламінопурін, зеатин, NN-діфенілмочевина, 6-БАП - 6-бензіламінопурін.

Гібереліни: гіберелінова кислота. Як біологічних добавок для індукції первинного каллуса можна використовувати рослинні екстракти (10-15% від загального обсягу середовища): кокосове молоко (рідкий ендосперм кокосового горіха), витяжки з незрілих зернівок кукурудзи (краще в період молочної стиглості), які містять цитокініни - кинетин і зеатин (6-ти заміщені амінопурина) і NN-діфенілсечовина. У культурі *in vitro* застосовують рідкі і щільні (тверді) середовища. Рідкі середовища використовуються для культивування суспензій, каллусов, ізольованих органів і тканин, рослин-регенерантів. При цьому для підтримки експлантів в пробірці з середовищем

поміщають спеціальні містки-підтримки з фільтрувального паперу або синтетичних пористих матеріалів.

Тверді середовища готують на основі агар-агар - полісахариду, що входить до складу морських водоростей, який утворює з водою гель при рН 5,6-6,0. Іноді в якості ущільнювача і заміника агар-агар використовують поліакриламідні гелі (біогелі) P10 і P200. Для штучних поживних середовищ розчини макро- і мікросолей готують заздалегідь і використовують багаторазово. Це маточні (Концентровані) розчини. Їх зберігають у спеціальних умовах: макро- і мікросолі в холодильнику в судинах з притертими пробками при 0 ... + 4 ° С; вітаміни, фітогормони, ферменти, рослинні екстракти - при 20оС в невеликих по 5-10 мл судинах з пробками (пеніцилової флакони). Маточні розчини макросолей зазвичай перевершують робочі по концентрації в 10-40 разів, мікросолей - в 100-1000 разів, вітамінів - в 1000 раз.

Розчини фітогормонів бажано готувати безпосередньо перед роботою із середовищами. Для приготування маточного розчину макро- і мікросолей кожену сіль розчиняють в окремому стаканчику при нагріванні, потім зливають і доводять до потрібного обсягу. В охолоджену суміш мікросолей останнім додають розчин солей молібдену, а в макросолі - розчин солей магнію (Для запобігання випаданню осаду). Маточні розчини хлористого кальцію і хелати заліза (сірчанокисле залізо + ЕДТА, або Na ЕДТА - трилон Б) готують і зберігають окремо від інших солей. Концентровані розчини вітамінів готують наступним чином: 10-кратні навішування розчиняють в 10 мл дистильованої води кожен окремо. Фітогормони - це речовини, які погано розчиняються у воді. Тому попередньо 100 мг речовини розчиняють в невеликих кількостях (0,5-2,0 мл) спирту (ауксини, гібереліни), 0,5-1 н HCl або КОН (цитокініни), потім підігрівають до повного розчинення (крім абсцизової кислоти і кинетина) і доводять до 100 мл об'єму (1 мл містить 1 мг речовини).

Виконання роботи

Завдання 1. Ознайомитися з теоретичним описом основних приладів та обладнання, що використовується в лабораторії.

Завдання 2. Записати склад основних груп компонентів, з яких складається поживне середовище, у вигляді таблиці.

Завдання 3. Розглянути основні групи фітогормонів та їх роль у рості і розвитку рослин.

Завдання 4. Приготувати маточні розчини неорганічних елементів поживних середовищ.

Контрольні заходи

Поточний контроль здійснюється після виконання кожної лабораторної роботи у вигляді захисту протоколу лабораторного заняття з максимальною

оцінкою 5 балів. Протокол має містити: титульну сторінку, мету роботи, основну частину (об'єкт, методика, розрахунки), висновки.