


МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

Институт Естественных наук
Кафедра «Биологии»

Утверждено на заседании кафедры
«Биологии»
«_16_» _марта_ 2020г., протокол №_8_

Заведующий кафедрой

_____ Е.М. Волкова

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине (модулю)
«ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ»

основной профессиональной образовательной программы
высшего образования – программы бакалавриата

по направлению подготовки
06.03.01 Биология

с направленностью (профилем)
Биоэкология

Формы обучения: очная, заочная

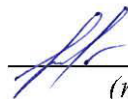
Идентификационный номер образовательной программы: 060301-01-20

Тула 2020 год

Разработчик методических указаний

Ягольник Е.А., доцент, к.б.н.

(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)



(подпись)

Введение

Дисциплина «Основы технологии биологических процессов» имеет своей целью дать студенту представление о биологических процессах, имеющих практическую значимость во всех областях жизнедеятельности человека, в основе которых лежат использование биообъектов. Биологические промышленные процессы могут осуществляться микроорганизмами, водорослями, простейшими, культурами клеток и тканей животных, растений, ферментами, мембранами и клеточными организмами в свободном или иммобилизованном состоянии. Основы технологии биологических процессов опираются на микробиологию, биохимию, молекулярную биологию, биоорганическую химию, биофизику и др.

В настоящем учебном пособии представлены лабораторные работы по дисциплине «Основы технологии биологических процессов» для студентов направления подготовки 06.03.01 Биология.

Цель лабораторного практикума - углубление теоретических положений лекционного курса по дисциплине «Основы технологии биологических процессов» и освоение методики биотехнологического эксперимента. Пособие включает лабораторные работы по всем разделам курса. В конце работ приводятся вопросы для закрепления теоретического и экспериментального материала. Приведенные работы рассчитаны на 5 часов.

В каждой из предлагаемых работ приведены список материалов и оборудования, описание хода работы, рекомендации по оформлению результатов. Лабораторные работы содержат справочный материал, позволяющий студенту лучше уяснить содержание лабораторной работы. Работы выполняются парами (2 человека). Выполнению работы предшествует ознакомление с теоретическими положениями и ходом работы, формулирование цели и задач исследования.

Пользуясь пособием, студенты оформляют результаты эксперимента в соответствии с учебной картой занятия. Работы предусматривают самостоятельную формулировку выводов с обоснованием полученных результатов.

Анализ записей и усвоение изучаемого материала контролируется преподавателем на каждом занятии.

Требования к содержанию и оформлению лабораторных работ

1. Лабораторные работы оформляются в тетради каждым студентом индивидуально. Лабораторная тетрадь подписывается студентом до начала выполнения первой лабораторной работы.

2. Каждая лабораторная работа должна содержать следующие структурные элементы:

- 2.1. Наименование лабораторной работы.
- 2.2. Цель занятия.
- 2.3. Перечень необходимых материалов и оборудования.
- 2.4. Теоретические сведения.
- 2.5. Результаты и обсуждение.
- 2.6. Ответы на контрольные вопросы
- 2.7. Выводы.

3. Лабораторная работа, оформленная в соответствии с данными требованиями, представляется в конце **каждого занятия** на подпись преподавателю.

Лабораторная работа №1
МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО
МАТЕРИАЛА, ПОСУДЫ, ИНСТРУМЕНТОВ И ПИТАТЕЛЬНЫХ
СРЕД

Цель работы. Стерилизация помещений, растительного материала, посуды, инструментов и питательных сред.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Семена, клубни, побеги и стебли растений.

Стаканы химические на 500-700 мл, колба с дистиллированной водой на 1 л, чашки Петри, предметные стекла, скальпель, пинцет, игла, марлевые мешочки, стерилизаторы, пробирки, чашки с питательными средами, фильтры Зейца или «Миллипор» для холодной стерилизации.

Автоклав, сушильный шкаф.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы

Ламинар-бокс. Протирают внутреннюю рабочую поверхность ламинара 70%-ным спиртом. Затем размещают в ламинаре спиртовую горелку, спички, стакан с 96%-ным спиртом, стерильную посуду и инструменты, колбу со стерильной водой. При проведении работ по вычленению меристем в ламинар ставят бинокулярную лупу. Ламинар-бокс облучают бакткрицидными ультрафиолетовыми лампами в течение 10-12 ч.

Посуда. Стерилизация проводится в сушильном шкафу или в автоклаве. Перед стерилизацией посуду надо вымыть и высушить. Для мытья посуды используют детергенты, а также раствор двуххромовокислого калия в серной кислоте (хромпик). Перед стерилизацией пробирки, колбы предварительно закрывают ватными пробками, заворачивают в оберточную бумагу. Затем посуду помещают в сушильный шкаф и нагревают при температуре +175°C в течение 2 ч (после того как установится нужная температура). При таком нагревании погибают не только бактерии, но и их споры. Температуру в сушильном шкафу вы-

ше 175°C допускать не следует, так как при этом ватные пробирки буреют, а бумага, которой закрывают ватную пробку сверху, становится ломкой.

Еще более строгой стерилизации можно добиться под давлением в автоклаве, так как влажный жар эффективнее убивает микроорганизмы и их споры, чем сухой. Автоклавированию подвергают стаканы с крышками, чашки Петри, пипетки, колбы с дистиллированной водой. Посуду заворачивают в фольгу или оберточную бумагу и автоклавируют при 2 атм. В течение 25-30 минут. Верхнюю часть градуированных пипеток закрывают ватной прокладкой, пипетки заворачивают в бумагу по 10 штук.

Инструменты. Предварительную стерилизацию инструментов скальпелей, пинцетов, игл и т.д. проводят нагреванием сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 12 ч при 140°C. Кипячением удобно стерилизовать шприцы. Металлические предметы нельзя стерилизовать автоклавированием, так как под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в процессе посадки инструменты стерилизуют дополнительно, помещая в фарфоровый стакан с 96%-ным этиловым спиртом и обжигая в пламени спиртовки. Обжигать можно ланцеты, пинцеты, микробиологические петли. После стерилизации обжиганием каждый инструмент помещают между листами предварительно простерилизованной плотной бумаги, сложенными в пачку или в специальный штатив. **Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции.** Затем его следует снова простерилизовать спиртом и обжечь. Очень тонкие инструменты (иглы, кусочки лезвий) могут терять свои свойства при обжигании, поэтому их стерилизуют, погружая в спирт.

Материалы. Вату, марлю, ватные пробки, фильтровальную бумагу, халаты, косынки, которые могут использоваться при посадке тканей, стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атм. В течение 25-30 мин.

Растительный материал. Для стерилизации семян, верхушечных меристем, кусочков ткани, выделенных из различных частей растения, применяют различные стерилизующие растворы: водные растворы сулемы, или двуххлори-

стой ртути (0,1%), брома (1%), пергидроля (20-30%), хлорамина (3-6%), диацид, гипохлорита натрия (10%).

Диацид готовят следующим образом: растворяют отдельно 330 мг этанолмеркурхлорида и 660 мг цетилпиридинилхлорида в горячей воде (около 300 мл), смешивают полученные растворы, доводят объем жидкости дистиллированной водой до 1 л и добавляют несколько капель детергента Твин-80. Диацид хранят в холодильнике в плотно закрытой колбе в темноте.

Прежде чем приступить к стерилизации растительной ткани, ее предварительно очищают. Корнеплоды, клубни, толстые стебли растений тщательно моют щеткой с мылом в теплой проточной воде, снимают кожуру (у корней и клубнеплодов), кору (у побегов), промывают дистиллированной водой и опускают на несколько секунд в абсолютный спирт. При этом кроме действия спирта отмечается усиление эффекта основного стерилизующего раствора. После стерилизации растительные объекты следует тщательно отмыть от стерилизующих веществ, многократно последовательно ополаскивая дистиллированной водой.

Диацид рекомендуется использовать при стерилизации семян кукурузы, пшеницы, ржи; пергидроль для фасоли, люпина, подсолнечника (с очищенной кожурой), томатов, редиса и др. Время стерилизации семян диацидом 15-20 мин, пергидролем 10 мин. Некоторые семена (хлопчатник, горох) хорошо стерилизуются концентрированной серной кислотой в течении 3 мин, с последующей пятикратной промывкой автоклавированной дистиллированной водой. Время стерилизации меристем и кусочков тканей из разных частей растения примерно вдвое меньше. Обычно используют диацид, который затем отмывают водой, воду меняют 5-6 раз.

Иногда семена некоторых растений: помидор, яблони, тыквы, бобов и табака, не обрабатывают антисептиком. Ко времени созревания семена оказываются заключенными в мясистые, деревянистые или костянквидные покровы. Здоровые с неповрежденной поверхностью плоды этих культур тщательно промывают мыльной водой, затем несколько раз спиртом. После этого в строго

асептических условиях их разламывают. Стерильным инструментом из разлома выбирают семена и помещают их в стерильную посуду.

Питательные среды. Колбы и пробирки с питательными средами закрывают ватными пробками, заворачивают горлышко в целлофан или оберточную бумагу и автоклавируют при температуре 120°C и давлении 1 атм. В течение 20 мин.

Холодная стерилизация. Органические жидкости, которые не выносят нагревания, освобождают от бактерий при пропускании через стерильные мелкопористые бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

Требования к отчету по лабораторной работе.

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы

1. Что такое стерильность?
2. Какими способами стерилизуют посуду, инструменты?
3. Какими способами стерилизуют растительные объекты?

Лабораторная работа № 2

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Цель работы. Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей на примере среды Мурасиге-Скуга

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Хим-реактивы (табл.1). Колбы или стаканы химические на 1л, банки с притертыми пробками для хранения маточных растворов на 1л и 100мл, баночки на 20-50мл, мерные пипетки на 10 и 1мл, весы технические, весы торзионные, электроплитка.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Приготовить питательную среду Мурасиге и Скуга (табл.1, 2) для культивирования растительных органов и тканей.

Прежде всего необходимо приготовить маточные растворы макро-, микросолей и витаминов. Для среды Мурасиге и Скуга обычно готовят маточные растворы следующего состава: 1) NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ вливают последним без нагревания, что предотвращает выпадение осадка); 2) раствор CaCl_2 ; 3) раствор хелата железа (раствор FeSO_4 и ЭДТА- Na_2 , необходимый для образования хелата железа, следует нагреть до кипения); 4) раствор микроэлементов.

Количество солей, необходимое для приготовления маточных растворов, а также количество маточного раствора, которое надо взять для приготовления питательной среды, приведены в табл. 2.2.

Полученные растворы сливают в склянки с притертой пробкой, снабжают этикеткой и хранят в холодильнике. Хелат железа хранят в темной склянке.

Концентрированные растворы витаминов (каждого в отдельности) хранят во флакончиках. Для приготовления растворов берут десятикратную по отношению к добавляемой дозе навеску витамина и растворяют в 10 мл воды. В 1 мл этого раствора содержится порция витамина, необходимая для приготовления 1 л раствора по прописи Мурасиге-Скуга.

Теперь, используя маточные растворы, надо приготовить питательные среды для культивирования органов и тканей растений. В химический стакан или колбу емкостью 1 л помещают навеску сахарозы 30 г, доливают до половины дистиллированную воду, нагревают, после растворения сахарозы добавляют необходимые количества маточных растворов макросолей, микросолей (см. табл. 2.2.), витаминов и доводят объем до 1 л дистиллированной водой.

Растворы фитогормонов готовят следующим образом.

Ауксины (2,4-Д,-НУК, ИУК, индолил-масляная кислота – ИМК): 100 мг вещества растворяют в 0,5-2 мл спирта, подогревают, добавляют дистиллированную воду до 100 мл (концентрация 1 мг/мл).

Цитокинины (кинетин, зеатин, БАП): растворяют в небольшом объеме 0,5 н. HCl, подогревают, добавляют соответствующий объем дистиллированной воды.

Абсцизовая кислота (АБК): навеску растворяют в 70%-ном этаноле, доводя до нужного объема.

Гиббереллиновая кислота (ГК): навеску растворяют в воде.

При введении фитогормонов в среду перед автоклавированием следует обязательно довести pH среды до 5,5-5,6. Однако следует учитывать, что после автоклавирования изменяется первоначальный состав термолабильных компонентов среды. Так, тиамин распадается на пиримидин и тиазол, а кинетин и ИУК теряют часть своей активности. В связи с этим витамины и особенно термолабильные фитогормоны стерилизуют фильтрованием, пропуская через фильтр Зейца или «Миллипор» с диаметром пор 0,4 мкм (НУК, ИУК, зеатин, БАП). В этом случае для регуляции pH среды используют стерильные растворы щелочи.

Агар-агар предварительно замачивают в воде для набухания. Затем его нагревают на электроплитке при помешивании до полного растворения. После этого раствор агара надо слить с раствором солей, витаминов и сахарозы и довести объем среды до 1 л. Колбы со средой закрывают ватной пробкой, бумагой или фольгой и стерилизуют в автоклаве.

Питательные среды разливают в пробирки (1/3 объема), которые закрывают ватными пробками или фольгой, стерилизуют в автоклаве.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Каков состав питательных сред для изолированных клеток и тканей?
2. Какие вещества используют в качестве ауксинов в питательных средах?
3. Что такое маточные растворы и как их готовят?

Приложение.

Таблица 1. Среда Мурасиге и Скуга, pH 5,6-5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
NH_4NO_3	1650	$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
KNO_3	1900	$\text{Na}_2\text{-ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	Тиамин - HCl	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	370	Пиридоксин - HCl	0,5
KH_2PO_4	170	Никотиновая кислота	0,5
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	Мезо-инозит	100
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	Глицерин	2,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	ИУК	2,0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	Кинетин	0,2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	Сахароза	30.000
KI	0,83		

Таблица 2. Состав маточных растворов по Мурасиге и Скугу

Компоненты питательной среды
Примечание
Макросоли, г/л маточного раствора
KNO_3 38
CaCl_2 (безводный) 8,8
NH_4NO_3 33
или $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13,8
MgSO_4 (безводный) 3,6
или $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7,4
KH_2PO_4 3,4
На 1 л среды брать по 50мл маточного раствора
Микросоли, мг/100 мл маточного раствора
H_3PO_4 620
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2230
ZnSO_4 860
KI 83
$\text{Na}_2\text{MoCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,5
На 1 л среды брать по 1 мл маточного раствора
Fe-хелат, мг/100 мл маточного раствора
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 557
ЭДТА- Na_2 (трилон Б) 745
На 1 л среды брать по 5 мл маточного раствора

Лабораторная работа №3

ВЫРАЩИВАНИЕ СТЕРИЛЬНЫХ ПРОРОСТКОВ

Цель работы. Выращивание стерильных проростков гороха, сои с целью получения асептических растений и получения эксплантов *in vitro*

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Семена (горох, соя). Диацид, 96%-ный спирт, стерильные химические стаканы, стерильная вода.

Стерильные чашки Петри, пробирки, пинцет, стерильные марлевые мешочки.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Отобрать здоровые ровные семена гороха или сои, тщательно промыть их в мыльном растворе, затем водопроводной и дистиллированной водой. Промытые семена в марлевых мешочках погрузить на 2-5 мин в 96%-ный спирт, промыть в стерильной воде и поместить в раствор диацида на 20 мин. Затем пятикратно ополоснуть семена в стерильной воде.

Работу проводят в ламинар-боксе. С помощью стерильного пинцета разложить по 5-10 семян в стерильные чашки Петри или пробирки с питательной средой. Чашки Петри с семенами помещают в термокомнату при температуре +25°C. Асептические проростки можно использовать для получения эксплантов через 8-15 дней.

Для проращивания семян можно использовать среды Уайта (табл.1), Мурасиге и Скуга (МС) (лаб.раб 2) или Гамборга (В-5) (табл. 2), но без добавок фитогормонов.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тези-

сов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками

Контрольные вопросы.

1. С какой целью выращивают стерильные проростки?
2. Каковы возможные пути использования стерильных проростков?
3. Какие среды используют для выращивания стерильных проростков?

Приложение.

Таблица 1. Среда Уайта, рН 5,6-5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	200	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,02
MgSO_4	360	ZnSO_4	1,5
Na_2SO_4	200	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0025
KNO_3	80	KI	0,75
KCl	65	Пиридоксин-HCl	0,1
NaH_2PO_4	16,5	Тиамин-HCl	0,1
H_3BO_3	1,5	Никотиновая кислота	0,5
MnSO_4	4,5	Глицин	3,0
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$	2,5	Сахароза	20.000

Таблица 2. Среда Гамборга (В-5), рН 5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150	ЭДТА- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
KNO_3	2500	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134	KI	0,75

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150	Тиамин- HCl	10,0
H_3BO_3	3,0	Пиридоксин- HCl	1,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,60	Никотиновая кислота	1,0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	Мезо - инозит	100
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	2,4-Д	2,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0	Сахароза	20.000

Лабораторная работа № 4
ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ КАРТОФЕЛЯ

Цель работы. Выделение апикальных меристем картофеля, их культивирование с целью получения безвирусных растений картофеля.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Клубни картофеля. Пробирки со стерильной питательной средой (табл.1).

Бинокулярная лупа, скальпели, препаровальные иглы, лезвия, зажатые в держателе.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Клубни картофеля хранят в течение недели при температуре 4-8°C, затем проращивают в темноте при температуре 20-22°C. Работы по вычленению меристем проводят в ламинар-боксе. Инструменты, используемые для вычленения (пинцеты, скальпели, иглы), стерилизуют перед каждым вычленением, погружая в спирт с последующим обжиганием. От тщательно вымытых клубней отделяют отростки и стерилизуют в 0,1%-ном растворе диацита в течение 3-5 минут, с последующей трехкратной промывкой стерильной H₂O. Простерилизованные ростки помещают в стерильную чашку Петри и добавляют несколько капель автоклавированной воды для предупреждения их подсыхания. Перед вычленением с верхушки ростка удаляют покровные листочки, последовательно обнажают боковые и верхушечные меристемы с примордиальными листочками. Эту операцию проводят с помощью препаровальной иглы под бинокулярной лупой. Меристему размерами 100-250 мкм без листовых зачатков (примордиев) вычленяют обычной тонкой иглой, зажатой в держатель. Вычленять можно как верхушечную, так и боковые меристемы. Меристему на острие иглы переносят на поверхность питательной среды в пробирку, закрывают ее пробкой над пламенем горелки и ставят в штатив. После заполнения штатив с пробирками закрывают целлофановым колпаком для предупреждения подсыхания сред и ставят в

световую камеру. Через две, три, четыре недели наблюдают за развитием из меристемы побега и зарисовывают этапы этого процесса.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Какие части растения используют для ускоренного размножения?
2. С какой целью из растений вычлениают апикальные меристемы?
3. Какими способами пользуются в работе во избежание подсыхания питательных сред?

Приложение.

Таблица 1. Модифицированная питательная среда Мурасиге и Скуга для культивирования апикальных меристем картофеля, рН 5,7-5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
Минеральные элементы	По Мурасиге-Скугу	Гиббереллиновая кислота	1-10
Сахароза	20000	Никотиновая кислота	2
Глюкоза	20000	Фолиевая кислота	0,5
Гидролизат казеина	1000	Кинетин	0,5
Мезо-инозит	100	Пантеонат Са	10
Тиамин	1	Рибофлавин	0,5
Пиридоксин	1	Биотин	1

Аденин	40	Активированный уголь	10000
Витамин В ₁₂	0,015	Агар-агар	7000

Лабораторная работа № 5

МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ КАРТОФЕЛЯ ЧЕРЕНКОВАНИЕМ ПОБЕГОВ

Цель работы. Черенкование растений в пробирочной культуре с целью получения безвирусных побегов картофеля.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Стерильные скальпели, пинцеты, чашки Петри. Асептические растения картофеля, пробирки с модифицированной стерильной питательной средой Мурасиге-Скуга (табл.1).

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Асептическое растение картофеля вынимают в ламинар-боксе из пробирки, помещают в чашку Петри, разрезают на части, содержащие отрезок стебля с листом и пазушной почкой. Часть стебля над листом должна быть в два-три раза короче, чем часть ниже листа. В процессе работы необходимо соблюдать строгую стерильность. Черенки высадить в пробирки на модифицированную питательную среду Мурасиге-Скуга. Пробирку с черенком ставят в световую камеру. Наблюдают за развитием побега через 7 и 14 дней.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Назовите наиболее распространённый способ размножения картофеля.
2. На чём основывается действие размножения черенкованием?

3. При каком условии в культуре *invitro* у черенков картофеля можно индуцировать появление клубней?

Приложение.

Таблица 1. Модифицированная питательная среда Мурасиге и Скуга для микроразмножения картофеля черенкованием побегов, рН 5,8

Компоненты	Содержание, мг/л
Минеральные элементы	По Мурасиге-Скугу
Гибберелловая кислота	2,0
Кинетин	0,5
Аденин	40,0
Никотиновая кислота	2,0
Пиридоксин	1,0
Тиамин	1,0
Пантеонат кальция	10,0
Активированный уголь	10000
Сахароза	30000
Агар	7000

Лабораторная работа № 6
ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ЗЕМЛЯНИКИ.
МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ЗЕМЛЯНИКИ.

Цель работы. Выделение апикальных меристем земляники, их культивирование на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга с целью получения стерильных почек.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Столоны земляники. Пробирки со стерильной питательной средой (табл.1), 96%-ный спирт, 0,1%-ный водный раствор сулемы или диацита, в колбе на 1 л стерильная вода.

Стерильные чашки Петри, стерильные скальпели, стерильные иглы, бинокулярная лупа, стерильные предметные стекла, спиртовая горелка, спички, марлевые мешочки, стерильные химические стаканы.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Столоны земляники промывают в мыльной воде и ополаскивают чистой водой. Выделяют скальпелем пазушные почки, находящиеся у основания листьев столонов земляники. Эту операцию делают вне ламинар-бокса. Всю дальнейшую работу необходимо проводить в ламинар-боксе. Почки собирают в марлевый мешочек и погружают для стерилизации в раствор диацита на 10 мин. Вынимают мешочек за нитку из раствора диацита и пять раз промывают в стерильной дистиллированной воде. Необязательно иметь для этого пять-шесть стаканов со стерильной водой, так как они занимают много места в ламинаре. Достаточно двух стаканов, на $\frac{1}{4}$ объема наполненных стерильной водой. Последовательно погружают в стаканы мешочек с почками, прополаскивают в воде в течение нескольких минут. Затем воду из второго стакана сливают в первый, а во второй наливают стерильную воду из колбы и прополаскивают в ней мешочек с почками. Так же поступают и в дальнейшем. Стерильные почки переносят из

мешочка в чашку Петри и используют для вычленения меристем. Эту операцию проводят под бинокулярной лупой при десятикратном увеличении. На предметном стекле почку с помощью препаровальной иглы и скальпеля освобождают от многочисленных листовых чешуек; затем, придерживая почку иглой, скальпелем вычленяют меристематический купол с одним-двумя листовыми примордиями.

Вычлененную в ламинар-боксе меристему переносят на скальпеле в пробирку с питательной средой (табл.1). Пробирки закрывают целлофаном и помещают в световую климатическую камеру при температуре +25°C. Через четыре недели отмечают число образовавшихся почек и используют их для выполнения следующей работы.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

- 1.Каким образом высокое содержание кинетина в среде влияет на процесс культивирования земляники?
- 2.Каким способом можно индуцировать корнеобразование при микроразмножении земляники?
- 3.В каких растворах и с какой целью промывают марлевые мешочки с почками?

Приложение.

Таблица 1. Модифицированная питательная среда Мурасиге и Скуга для культивирования апикальных меристем земляники, рН 5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
Минеральные элементы	По Мурасиге-Скугу	Никотиновая кислота	0,5
Хелатжелеза	5,0	6-БАП	0,5
Аскорбиновая кислота	1,0	Глюкоза	20.000
Тиамин	0,5	Агар-агар	7000
		Пиридоксин	0,5

Лабораторная работа №7
ИНДУКЦИЯ КОРНЕОБРАЗОВАНИЯ
ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ
НА ПРИМЕРЕ ЗЕМЛЯНИКИ.

Цель работы. Укоренение почек земляники, полученных при микроклональном размножении, на питательной среде, содержащей ауксины.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Пробирки с конгломератами почек земляники на питательной среде, пробирки со стерильной питательной средой (табл.1). Стерильный пинцет, стерильный скальпель, стерильная чашка Петри, спиртовая горелка, 96%-ный спирт, спички, стакан со стерильной водой.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Используют культуру апикальных меристем земляники в возрасте трех-четырех недель после начала культивирования. В стерильных условиях извлекают из пробирки конгломерат почек земляники. Освобождают основание конгломерата от остатков агаризованной питательной среды, промывают его в стерильной воде и переносят в стерильную чашку Петри. Разъединяют с помощью скальпеля конгломерат на отдельные почки и каждую из них переносят пинцетом в пробирки с питательной средой для укоренения (табл. 2). Обжигают горлышко пробирки и пробку, закрывают пробкой, оборачивают целлофаном и помещают пробирки в световую камеру с освещенностью 10 000 люкс, температурой +26°C и влажностью 60%.

Через месяц после пересадки почек на среду для корнеобразования проростки можно переводить в нестерильные условия. Обычно растения пересаживают в ящики или горшки, наполненные смесью торфа и песка (3:1), первое время накрывают колпаком из полиэтилена.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы

1. Каким способом можно индуцировать корнеобразование при микроразмножении земляники?
2. Что происходит при культивировании апикальных меристем земляники на питательной среде, содержащей цитокинин?
3. При каких условиях проводят корнеобразование проростков при микроклональном размножении земляники?

Приложение.

Таблица 1. Питательная среда для корнеобразования при микроклональном размножении земляники, рН 5,6-5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
Макросоли	По Уайту	Никотиновая кислота	0,5
Микросоли	По Хеллеру	ИУК	0,5
Цитрат железа	3,5	Сахароза	20000
Аскорбиновая кислота	1,0	Агар-агар	7000
Тиамин	0,5	Пиридоксин	0,5

Таблица 2. Среда для укоренения растений картофеля, рН 5,8

Компоненты	Содержание, мг/л
Минеральные элементы	По Мурасиге-Скугу
Тиамин	1,0

Пиридоксин	0,5
Сахароза	5000
ИМК	0,1
Агар	7000

Лабораторная работа №8

КАЛЛУСНАЯ КУЛЬТУРА

Цель работы. Получение каллусной ткани из сердцевины стебля взрослого растения табака в условиях *in vitro*.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Взрослые растения табака. Химический стакан с дистиллированной водой, конические колбы на 100 мл со стерильной питательной средой Мурасиге и Скуга. Вата, 96%-ный спирт, 0,1%-ный раствор сулемы или диацид, стаканы со стерильной водой, стерильные марлевые мешочки, стерильный пробкобур, стерильный скальпель, стерильная чашка Петри.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Из стеблей табака в фазе бутонизации или цветения вырезают участки с хорошо развитой, но еще не одревесневевшей сердцевиной (второе-третье междоузлие). Выбранные участки стебля разрезают на части длиной 5 см и моют в мыльном растворе щеткой, затем отмывают от мыла водопроводной водой и ополаскивают дистиллированной водой. Чистые участки стебля помещают в стакан с дистиллированной водой и переносят в ламинар.

Для стерилизации протирают стебли табака 96%-ным спиртом, и погружают в марлевых мешочках в 0,1%-ный водный раствор сулемы на 10-15 мин или в раствор диацида (1:1000) на 25 мин. После стерилизации стебли промывают в пяти порциях дистиллированной воды, оставляя в каждой на 5 мин. Затем из центральной части стебля вырезают стерильным сверлом для пробок (диаметр 5 мм) столбик сердцевиной ткани и помещают в стерильную чашку Петри. Стерильным скальпелем удаляют участки ткани вблизи прежних срезов (концевые участки). Вырезанная сердцевина не должна содержать элементов флоэмы и камбия. Полученные цилиндрики сердцевины разрезают скальпелем в чашке Петри на кусочки длиной 2-3 мм и помещают на поверхность агаровой среды. Посуду с эксплантами табака помещают в термостат (в темноту) при температуре +25°C для культивирования. Через три недели анализируют ре-

зультаты по образованию каллуса. Таким же образом получают каллус из корнеплодов картофеля и моркови.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. В чём заключается сущность метода выращивания изолированных тканей растений и получения каллуса?
2. Что представляет собой каллус?
3. Из каких органов на искусственных питательных средах могут образоваться каллусы?

Лабораторная работа №9
СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ
В КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ

Цель работы. Регенерация растения люцерны *in vitro* на примере соматического эмбриогенеза на стерильной питательной среде Гамборга (В-5).

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Культура каллусной ткани, полученной из листа люцерны. Колбы на 50 мл со стерильной питательной средой В-5 (табл.2.4). Стерильная чашка Петри, стерильные скальпели.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Соблюдая стерильность, каллус переносят в чашку Петри, разделяют на кусочки размерами 5х5 мм и помещают на новую питательную среду В-5 с добавкой 6-БАП (0,2 мг/л). Эта среда стимулирует развитие в каллусной ткани клеток меристематического и эмбрионального типа, из которых в дальнейшем формируются почки и эмбриониды. Пересаженные каллусы ставят для инкубации в световые камеры (16 ч освещения). Через три недели наблюдают развитие зеленых почек и эмбрионидов. Полученные эмбриониды и почки используют для получения растений-регенерантов. Их переносят с соблюдением строгой стерильности на питательную агаризованную среду В-5 без гормонов и инкубируют в световой камере. В одну колбу на 50 мл с 25 мл среды следует высаживать четыре-шесть почек эмбрионидов. Через три недели отмечают образование побегов из почек и формирование растений-регенерантов. На одном экспланте может появиться до нескольких десятков побегов. Когда побеги достигают высоты 10 мм, их следует разделить и перенести на среду для укоренения: В-5 с добавлением нафтилуксусной кислоты (НУК) концентрацией 0,1 мг/л. Через 5-10 дней отмечают появление корней.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. От чего зависят переход дедифференцированных каллусных клеток к вторичной дифференцировке и образование организованных структур в каллусной ткани?

2. Что происходит с каллусной тканью люцерны при пересадке ее на среду, содержащую 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП)?

3. Что нужно предпринять, если наблюдается нарушение нормального развития растений?

Лабораторная работа №10
СУСПЕНЗИОННАЯ КУЛЬТУРА.
ПОЛУЧЕНИЕ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ
ИЗ КАЛЛУСА

Цель работы. Получение суспензионной культуры из каллуса в жидкой питательной среде в стерильных условиях.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Каллусы. Колбы с жидкой питательной средой. Пинцеты, скальпели, стерильные чашки Петри, спиртовка, спички.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Открывают чашку Петри с каллусом, стерильным пинцетом выкладывают кусочки рыхлого каллуса в стерильную чашку Петри, отбирают светлые участки и опускают их в колбочки со стерильной средой для суспензии. Расчет навески каллуса на объем жидкости делается следующим образом: 3-5 г каллуса на 100 мл жидкости. Объем суспензии составляет 10-20% объема колбы. Например, в колбу объемом 500 мл наливают 50-100 мл суспензии. Закрывают колбу ватно-марлевой пробкой с целлофаном или фольгой и ставят на качалку на три-четыре недели (оптимальная длительность одного пассажа).

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Что представляет собой суспензионная культура?
2. Какие вещества можно синтезировать в культуре клеток?
3. Каковы условия роста суспензии?

Лабораторная работа №11

ПОДСЧЕТ ПЛОТНОСТИ КЛЕТОК В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ

Цель работы. Подсчёт плотности клеток в суспензионной культуре в счётной камере Фукса-Розенталя под микроскопом.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Колбочка с суспензией. 20-% хромовая кислота. Стерильные пипетки с отрезанным кончиком, резиновая груша, пеницилиновые пузырьки, пипетка с оттянутым носиком, камера Фукса-Розенталя (гемоцитометр), камера для подсчета элементов крови, микроскоп, покровные стекла, шприц с толстой иглой.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Отбирают пипеткой со срезанным кончиком несколько миллилитров суспензии, предварительно взболтав суспензию в колбе. Для построения ростовой кривой используют по 20 мл суспензии из трех колбочек. Их сливают в одну емкость и все операции продельывают из смешанной суспензии. К одному объему исследуемой суспензии добавляют два объема хромовой кислоты и ставят при 60°C на 10 мин. Затем пропускают смесь через шприц с большой иглой три раза, при этом клетки хорошо отделяются друг от друга.

Камеру Фукса-Розенталя и покровное стекло тщательно промывают, высушивают. Притирают покровное стекло к камере до появления колец Ньютона. Пипеткой с узким носиком набирают мацерированный раствор и подносят к краю покровного стекла, при этом жидкость заполняет весь объем камеры. Подсчитывают клетки под микроскопом, в четырех больших квадратах по диагонали или по всей камере. При каждом заполнении считают верхнюю и нижнюю сетки. Операцию подсчета выполняют три-четыре раза. Для получения достоверных данных считают до 1000 клеток.

Для построения S-образной кривой показателя снимают через день в процессе культивирования. Плотность суспензии подсчитывают по формуле:

$$x = M \cdot n \cdot 1000 / 3,2,$$

где x – число клеток в 1мл, M – среднее число клеток в камере, n — разведение.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы

- 1.Что служит одним из основных показателей, характеризующих суспензию?
- 2.Каковы фазы ростового цикла суспензии?
- 3.Каким образом ведут подсчёт плотности суспензии?

Лабораторная работа №12

ВЫСЕВ СУСПЕНЗИИ НА ТВЕРДУЮ АГАРИЗОВАННУЮ СРЕДУ (МЕТОД ПЛЕЙТИНГА)

Цель работы. Культивирование клеточной суспензии на твёрдой питательной среде с двойным содержанием агара.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Суспензия, среда для посева суспензии с двойным содержанием агара (1,2-1,4%). Стерильные чашки Петри, стерильный цилиндр.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Суспензию наливают в стерильный цилиндр и дают ей отстояться в течение 5 мин. Отбирают пипеткой 5 мл верхней фракции суспензии (обогащенной одиночными клетками) и смешивают в чистом стерильном цилиндре с 5 мл теплой питательной среды для роста каллуса. Быстро разливают содержимое цилиндра в чашки Петри, дают застыть и закрывают парафином. Через три-пять недель подсчитывают колонии диаметром более 1 мм. Эффективность посева определяется отношением количества образовавшихся колоний к количеству посеянных клеток и выражается в процентах. Обычно плотность посева составляет 105 кл/мл. Она не должна быть очень высокой, чтобы растущие колонии не сливались. Через три недели подсчитывают количество колоний в каждой чашке.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Какие суспензии применяют для проведения клеточной селекции?

2.Какова конечная цель клеточной селекции?

3.В чём заключается метод Плейтинга?

Лабораторная работа №13
ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ:
ПРИГОТОВЛЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ РАСТВОРОВ
И ФЕРМЕНТАЦИЯ ТКАНЕЙ

Цель работы. Выделение протопластов из молодых листьев с использованием ферментных смесей на основе целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Асептические растения. Стерильные среды (табл.1), ферменты. Чашки Петри диаметром 10 см, колбы на 50 мл, пастеровские пипетки, колбочки со стеклянными воронками и нейлоновыми фильтрами с диаметром пор 60 мкм, мерные пипетки на 1 и 10 мл, центрифужные пробирки на 10 мл, шприц с насадкой для фильтров «Миллипор» и фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, пинцеты, скальпели, настольная центрифуга, инвертированный микроскоп.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. За сутки до опыта готовят ферментный раствор для выделения протопластов из мезофилла листа. Ферментная смесь содержит 0,5%-ную целлюлозу, 0,5%-ную мацеразу, 0,2%-ную дреселлазу, которую растворяют в растворе сахарозы (0,5 моль/л) и CaCl_2 (50 ммоль/л), pH 5,5-5,6. Приготовленный раствор центрифугируют для осаждения нерастворимых частиц в течение 10-15 мин при 1,5-2 g. После доведения pH до 5,5-5,6 раствор при помощи шприца с насадкой фильтруют через фильтр «Миллипор» в чашки Петри по 7-10 мл в каждую.

Молодые листья табака от растений, выращенных в асептических условиях, переносят в стерильные чашки Петри и нарезают узкими полосками или елочкой. Затем листья сразу помещают на поверхность ферментного раствора. Чашки переносят в термостат при 28-30°C на 15-18 ч. Для 1 г ткани достаточно 10 мл ферментного раствора. Контроль за ферментацией осуществляют с использованием инвертированного микроскопа. Аналогичным образом можно провести ферментацию из растений любых видов, но при этом следует изменить состав раствора. Так, для выделения протопластов из мезофилла картофе-

ля применяют смесь, состоящую из 1%-ного целлюлазина, 0,5%-ной мацеразы и 0,1%-ной дреселлазы. После ферментации содержимое чашки фильтруют через нейлоновый фильтр в пустую стерильную колбу. Затем пипеткой суспензию, содержащую протопласты, переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 3 мин при 1g. Протопласты всплывают на поверхность. Их отбирают пастеровской пипеткой и переносят в центрифужную пробирку, заполненную до половины средой W-5 (табл.2.10). Протопласты центрифугируют в этой среде 2 мин при 700 g, для того чтобы отмыть от остатков ферментной смеси. Отмывку проводят дважды. При центрифугировании в питательной среде W-5 протопласты осаждаются. Это последний этап в процессе их выделения. В некоторых случаях рекомендуют центрифугирование смеси в градиенте сахарозы, тогда протопласты формируют кольцо на поверхности среды. Отбирают их также пастеровской пипеткой.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Какие вещества используют для разрушения клеточной оболочки?
2. От чего зависит длительность ферментации?
3. Объясните технику выделения протопластов из мезофилла листа табака.

Приложение.

Таблица 1. Среды для культивирования протопластов табака и картофеля, pH 5,7

Компоненты, мг/л	W-5	K-3	W-S-S	SH-1	SH-2	RMOP
NaCl	9000					

NH ₄ NO ₃		250	1280			1650
KNO ₃		2500		1900	1900	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18400	900	600	440	440	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O		250	300	370	370	370
KH ₂ PO ₄			170	170	170	170
KCl	800		300			
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O		150				
(NH ₄) ₂ SO ₄		134				
NH ₄ Cl				267	267	
Fe-хелат		250	250	250	250	250
H ₃ BO ₃		3	6	6	6	6
MnCl ₂ ·4H ₂ O			24	24	24	24
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		2	10	10	10	10
CuSO ₄ ·5H ₂ O		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
CoSO ₄ ·7H ₂ O		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Ki		0,75	0,83	0,83	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
MnSO ₄ ·7H ₂ O		14				
Мезоинозит		100	100	100	100	100
Глицин				2	2	
Никотиновая кислота		1	1	5	5	
Фолиевая кислота				0,5	0,5	
Биотин				0,05	0,05	
Аденинсульфат				40	80	
Гидролизат казеина			500	300	100	
B ₁		10	10	0,5	0,5	10
B ₆		1	1	0,5	0,5	1

НУК		0,2	2	0,1		
ИУК					0,1	0,1
2,4-Д		1	0,2			
БАП		0,2	0,5	0,5		1
Зеатин					0,5	
Сахароза		10000		2500	2500	10000
Глюкоза	1000		7200			
Ксилоза			250			
Маннитол		72800		54600	34600	

Лабораторная работа №14
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МЕЗОФИЛЛА ЛИСТА

Цель работы. Выделение протопластов из мезофилла листа, их культивирование на стерильных питательных средах.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Суспензия отмытых протопластов. Стерильные среды (табл.2.10). Чашки Петри диаметром 6 см, пастеровские пипетки, мерные пипетки на 1 и 10 мл, инвертированный микроскоп, камера Горяева или Фукса-Розенталя.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. В стерильных условиях пастеровской пипеткой отбирают сверху среду W-5. Осадок протопластов ресуспендируют в 0,5 мл среды K-3 (табл. 2.10). В чашку Петри наливают с помощью мерной пипетки 6-10 мл среды K-3 и туда переносят пипеткой суспензию протопластов. Перед высевом протопластов на среду K-3 для культивирования следует определить их плотность с помощью камеры Фукса-Розенталя. Оптимальная плотность посева составляет 10³ клеток в 1 мл.

Культивирование протопластов проводят на рассеянном свете или в термостате при температуре 26-28⁰С. Каждый день нужно проверять качество протопластов и контролировать их деление с помощью инвертированного микроскопа.

Через 10-20 дней культивирования протопласты образуют колонии клеток. К этому времени их можно различить глазом как светлые агрегаты. На 20-й день добавляют свежую среду. Для этого готовят несколько чашек диаметром 6-10 см со свежей средой K-3, куда пипеткой с широким концом вносят культуру протопластов.

Через три недели колонии переносят на твердую среду для регенерации из них растений. Чашки с культурой помещают на досветку. Для регенерации табака используют среду RMOP (табл.2.10). Для картофеля при культивирова-

нии протопластов используют среду W-S-S, а регенерацию осуществляют последовательно на средах SH-1 и SH-3 (табл.2.10).

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

- 1.Когда растительные протопласты можно считать микроколонией?
- 2.Какова оптимальная плотность посева протопластов?
- 3.Какие питательные среды используют для культивирования протопластов?

Лабораторная работа №15
ИНДИВИДУАЛЬНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
ПРОТОПЛАСТОВ В МИКРОКАПЛЯХ

Цель работы. Культивирование протопластов растений в микрокаплях питательной среды.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Те же, что и для ведения культуры протопластов. Ламинарный бокс (установка обеспыливания УО-БГ или аналогичный; инвертированный микроскоп; манипулятор Фонбрюнна; прибор для вытягивания капилляров ПВК-1; микрокузница МЭ-4; микроаппликатор; стеклянные трубки; тефлоновый шланг; держатели капилляров из комплекта КМ-2; парафиновое или вазелиновое масло.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. При подготовке опытов особое внимание следует обратить на чистоту посуды и реактивов. Чтобы не засорить микропипетку, все среды желательно профильтровать и тем самым удалить мелкие частички. Для соблюдения стерильности работы нужно проводить в ламинарном боксе, куда помещается вся установка. Сначала выполняют подготовительные операции.

Выделение протопластов проводится по стандартным методикам.

Изготовление микропипеток: на микрокузнице МЭ-4 тонкостенные капилляры диаметром 1,5 мм вытягивают до диаметра около 100 мкм на приборе ПВК-1. Кончик микропипетки изгибают.

Приготовление масла: парафиновое или вазелиновое масло заливают в делительной воронке деионизированной водой в соотношении 1:1. Воронку встряхивают до получения тонкой эмульсии и оставляют в вертикальном положении для отстаивания. Воду, собравшуюся внизу, сливают. Процедуру выполняют пять раз. Затем масло центрифугируют для удаления мельчайших капелек воды (120 мин при 20 тыс. об/мин на роторе SW-27). Масло отбирают, стерилизуют 2 ч при 120°C. После охлаждения в масло стерильно добавляют 0,1-0,2 объема среды для культивирования протопластов. Сосуд с маслом и средой

встряхивают для получения суспензии. После отстаивания можно добавить 1-2% стерильного активированного угля. Приготовленное таким образом масло можно хранить в холодильнике при 40С в течение месяца.

Подготовка камеры для индивидуального культивирования: чашку Петри перед опытом заполняют приготовленным маслом на 3-4 мм высоты. В чашку вносят каплю среды для культивирования и каплю суспензии протопластов. Объем капель не должен превышать 100 мкл, чтобы они не выступали над поверхностью масла. Камеру закрепляют в препаратодителе инвертированного микроскопа.

Затем переходят к основным операциям. Стерильная пипетка устанавливается в держатель из комплекта КМ-2, закрепленный на головке манипулятора Фонбрюнна. Держатель и примыкающую часть микропипетки протирают 70%-ным этиловым спиртом. Микропипетку вводят в поле зрения микроскопа. Затем заполняют микропипетку маслом из камеры, а попавший при этом в шланги воздух стравливают через краник.

После этого в микропипетку набирают 10-20 мкл среды из капли под маслом и при помощи микроаппликатора или шприца на 20 мкл на дно камеры вносят микрокапли. Объем микрокапель определяют по формуле для объема полусферы

$$V = \frac{2}{3} \pi R^3$$

где R – радиус микрокапли, а V – ее объем. Так, для капли объемом 10 нл диаметр равен 342 мкм. Чтобы придать микрокаплям форму полусферы, лишнюю среду отсасывают микропипеткой.

Рассаживание протопластов по каплям выполняют следующим образом. Передвигая масляную камеру при помощи препаратодителя, приподнятую микропипетку вводят в каплю с суспензией протопластов. Микропипетку размещают над выбранным протопластом, обдувают его средой и засасывают, используя микроаппликатор или шприц на 20 мкл. Для ускорения работы можно

набирать в микропипетку до 10 протопластов. После этого микропипетку поднимают и выводят из капли с суспензией.

При помощи препароводителя в поле зрения микроскопа вводят микрокаплю, размещают над ней микропипетку с протопластом и опускают ее до соприкосновения с мениском. С помощью микроаппликатора протопласт выпускают в микрокаплю и отбирают из нее избыток среды. Все вышеописанные операции выполняются при 100-кратном увеличении.

Примерно раз в неделю микроколониям нужно менять среду. Для этого микропипетку заполняют маслом, как описано выше; в камеру вносят каплю свежей среды (если ее состав отличается от используемой вначале). Часть старой среды из микрокапель забирают в микропипетку и сливают в каплю со старой средой или в каплю с суспензией. Затем микропипетку заполняют свежей средой и доливают микрокапли.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. В чём заключается индивидуальное культивирование клеток?
2. Какова выживаемость протопластов при культивировании в микрокаплях?
3. Как происходит рассаживание протопластов по каплям?