



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
«Дальневосточный федеральный университет»  
(ДВФУ)

---

**ШКОЛА БИОМЕДИЦИНЫ  
ДЕПАРТАМЕНТ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ**

Отчет защищен с оценкой

\_\_\_\_\_

«07» августа 2021 г

Руководитель  
образовательной программы  
30.05.01 Медицинская биохимия  
\_\_\_\_\_ Т. В. Момот

**ОТЧЕТ**

**о прохождении практики по получению первичных профессиональных умений и навыков, в том числе первичных умений и навыков научно-исследовательской деятельности (биологическая практика)**

**Лаборатория биомедицинских клеточных технологий Школы биомедицины**

**Дальневосточного федерального университета**

---

Студент группы С7119-30.05.01 \_\_\_\_\_ (В.Р.Денискина)

Руководитель практики

структурного подразделения организации

\_\_\_\_\_ (В.В. Кумейко)

Руководитель практики

от ДВФУ

\_\_\_\_\_ (Н.А. Швед)

Владивосток, 2021



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
«Дальневосточный федеральный университет»  
(ДВФУ)

---

**ШКОЛА БИМЕДИЦИНЫ  
ДЕПАРТАМЕНТ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ**

**ДНЕВНИК**

**по практике по получению первичных профессиональных умений и навыков, в том  
числе первичных умений и навыков научно-исследовательской деятельности  
(биологическая практика)**

обучающегося С7120-30.05.01 группы Денискиной Виталии Романовны  
программа Медицинская биохимия  
Место практики Центр Геномной и регенеративной медицины ШБМ ДВФУ,  
лаборатория биомедицинских клеточных технологий  
Срок практики            с 12.07.2020 по 07.08.2020            недель            4           

Руководитель практики от ДВФУ  
доцент, канд. биол. наук

Никита Александрович Швед

**1. Содержание практики по видам работы и сроки ее выполнения  
(продолжительность практики 4 недели,  
продолжительность рабочей недели 40 ч)**

№	Темы	количество часов
<b>Установочные занятия</b>		
1	Ознакомительная лекция	2
2	Инструктаж по технике безопасности	2
<b>Биологическая практика</b>		
1	Инструктаж по технике безопасности в лаборатории	16
2	Выполнение заданий практики в соответствии с программой и индивидуальным заданием	54
3	Изучение документов и материалов по месту прохождения практики	16
4	Обработка и анализ полученных материалов практики	16
5	Анализ полученных результатов	16
<b>Индивидуальное задание</b>		
1	Характеристика иммуноферментного анализа	1
2	История иммуноферментного анализа	1
3	Принцип работы иммуноферментного анализа	1
4	Использование и применение иммуноферментного анализа	1
5	Преимущества и недостатки иммуноферментного анализа	1
<b>Подготовка отчета о практике</b>		
1	Систематизация материала	10
2	Оформление индивидуального задания	10
3	Написание отчета	10
4	Защита отчета	2

## 2.Календарный график работы обучающегося

№ п\п	Наименование работ	Календарные сроки		Руководитель практики
		начало	окончание	
1	Знакомство с принципами устройства и организации биохимической лаборатории. Прохождение инструктажа по технике безопасности.	12.07.2021	12.07.2021	Швед Н. А.
2	Принцип подготовки лабораторной посуды. Изучение принципов рН-метра и титрования.	13.07.2021	13.07.2021	Швед Н. А.
3	Приготовление буферных растворов. Титрование.	14.07.2021	16.07.2021	Швед Н. А.
4	Изучение культуральных сред. Приготовление среды для культивирования клеток.	19.07.2021	20.07.2021	Швед Н. А.
5	Теоретический разбор принципов работы с лабораторными животными. Этические комитеты, способы эвтанази.	21.07.2021	21.07.2021	Швед Н. А.
6	Эвтаназия лабораторной крысы. Взятие и фиксация аутопсийного материала. Дегидратация с помощью батареи спиртов. Вымачивание аутопсийного материала в смеси спиртов, далее – в смеси спирта и парафина. Взятие белков плазмы крови и мышц. Центрифугирование.	22.07.2021	22.07.2021	Швед Н. А.

7	Уплотнение материала в парафине. Приготовление парафиновых блоков.	23.07.2021	23.07.2021	Швед Н. А.
8	Теоретический разбор электрофореза белков в полиакриламидном геле по Лэммли.	26.07.2021	26.07.2021	Швед Н. А.
9	Приготовление разделяющего и концентрирующего гелей без добавления полимеризующих веществ.	27.07.2021	27.07.2021	Швед Н. А.
10	Электрофорез белков плазмы крови и мышц. Окраска, отмывка и анализ результата электрофореза по Лэммли.	28.07.2021	29.07.2021	Швед Н. А.
11	Приготовление парафиновых срезов.	30.07.2021	30.07.2021	Швед Н. А.
12	Гидратация парафиновых срезов в батареи спиртов, окрашивание срезов.	02.08.2021	03.08.2021	Швед Н. А.
13	Анализ гистологического препарата методом флуоресцентной электронной микроскопии. Получение микрофотографий препаратов.	04.08.2021	04.08.2021	Швед Н. А.
14	Работа над индивидуальным заданием. Анализ научной литературы, соответствующей тематике работы.	05.08.2021	05.08.2021	Швед Н. А.
15	Оформление отчета по практической работе. Подготовка к защите отчета.	06.08.2021	06.08.2021	Швед Н. А.

16	Сдача и защита отчетов по практике.	07.08.2021	07.08.2021	Швед Н. А.
----	-------------------------------------	------------	------------	------------

## 2. Дневник работы обучающегося

День первый	
Дата	12.07.2020
День недели	Понедельник
Содержание работы (описание процесса)	Ознакомление с принципами организации лаборатории биомедицинских клеточных технологии ШБМ ДВФУ, прохождение инструктажа по технике безопасности. Определение хода работы и основных задач, которые должны быть выполнены в ходе практики: написать и защитить отчет по учебно-ознакомительной практике; выполнить индивидуальное задание; заполнить дневник практики.
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День второй	
Дата	13.07.2020
День недели	Вторник
Содержание работы (описание процесса)	Изучение способов определения рН раствора, строения и принципа работы рН-метра. Калибровка рН-метра тремя растворами с рН 4, 7, 10.
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	



День третий	
Дата	14.07.2020
День недели	Среда
Содержание работы (описание процесса)	Приготовление растворов: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 190 мл C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 70% (из 95%);</li> <li>• 190 мл C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 90% (из 95%);</li> <li>• 190 мл C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 60% (из 95%);</li> <li>• 100 мл C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH:C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH (1:3);</li> <li>• 100 мл C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH:C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH (3:1);</li> </ul>
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День четвертый	
Дата	15.07.2020
День недели	Четверг
Содержание работы (описание процесса)	Расчет массы веществ для приготовления следующего раствора: 100мл 8% PBS-PFA (8г порошкообразного PFA разводим в 40 мл дистиллированной воды. Приливаем 50 мкл 10% NaOH, затем ставим на водяную баню ( $t=95^{\circ}$ ) до полного растворения порошка. Затем доводим объем раствора до 50 мл и приливаем к нему 50 мл готового двукратного буфера PBS;
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День пятый	
Дата	16.07.20
День недели	Пятница
Содержание работы (описание процесса)	Приготовление растворов: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 мл 0,1М ЭДТА (буфер пара – NaOH, pH = 7,2);</li> <li>• 100 мл 0,5М Трисс (буфер пара – HCl, pH=6,7) и еще 100 мл 0,5М Трисс при pH=8,9;</li> <li>• 1 л Running Buffer (раствор трисс-глицин) (буфер пара – трисс, pH=8,4);</li> </ul>
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День шестой	
Дата	19.07.2020
День недели	Понедельник
Содержание работы (описание процесса)	<p>Ознакомление с методами культивирования клеточных культур, а также с составом среды для культивирования стволовых клеток</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– добавка В27 (бычий сывороточный альбумин, витамины, микро- и макроэлементы);</li> <li>– фунгизон (раствор, который препятствует распространению грибковой инфекции);</li> <li>– смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина</li> </ul>
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День седьмой	
Дата	20.07.2020
День недели	Вторник
Содержание работы (описание процесса)	<p>Приготовление специальной среды для культивирования стволовых клеток (двукратный раствор DMEM – F-12):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• в 800 мл деионизированной воды разводим: 10г сухого реактива DMEM, 12.07г сухого реактива F-12, 4.9г NaHCO<sub>3</sub>, 3.5г глюкозы.</li> <li>• Титруем полученный раствор до pH=7 (титр-HCl)</li> <li>• Доводим объем до 1л</li> <li>• фильтруем (стерилизуем) полученный раствор в вакуумном аппарате.</li> </ul>
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День восьмой	
Дата	21.07.2020
День недели	Среда
Содержание работы (описание процесса)	Принцип работы с лабораторными животными. Этические комитеты. Эвтаназия.
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День девятый	
Дата	22.07.2020
День недели	Четверг
Содержание работы (описание процесса)	<p>Проведение эвтаназии лабораторной мыши с помощью диэтилового эфира. Препарирование умерщвленной лабораторной мыши, взятие биопсийного материала для дальнейшего изучения гистологического препарата (мозжечок), а также образцов крови и мышц для изучения метода разделения белков – электрофореза.</p> <p>фиксация мозжечка в 4% растворе PBS-PFA. Промывка биопсийного материала раствором двукратного PBS 3 раза по 30 минут;</p> <p>Дегидратация будущего гистологического препарата в растворах C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH разных концентраций: 50% - 30 минут, 60% - 30 минут, 70% - 30 минут, 80% - 30 минут, 90% - 30 минут, 95% - 30 минут;</p> <p>Вымачивание в растворах этанол:изопропанол: 3:1 (30 минут), 1:3 (30 минут);</p> <p>Вымачивание в растворе изпоропанола в парафине всю ночь.</p>
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День десятый	
Дата	23.07.2020
День недели	Пятница
Содержание работы (описание процесса)	<p>Уплотнение материала в парафине:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• помещение аутопсийного материала в расплавленный парафин 1 на 2 часа при температуре 60°C</li> <li>• перемещение препарата в расплавленный парафин 2 на 2 часа при температуре 60°C</li> </ul> <p>Приготовление парафиновых блоков:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Заливание парафина в форму</li> <li>• Помещение препарата в форму</li> <li>• Изъятие парафина с препаратом внутри из формы, помещение на пластмассовый блок.</li> </ul>
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	



День одиннадцатый	
Дата	26.07.2020
День недели	Понедельник
Содержание работы (описание процесса)	Изучение метода Электрофореза по Леммли.
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День двенадцатый	
Дата	27.07.2020
День недели	Вторник
Содержание работы (описание процесса)	<p>Приготовление гелей для электрофореза:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. концентрирующий: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,5 М трис-HCl, pH6,7 (1.25 мл)</li> <li>• 30% АА-МБА (0.75 мл)</li> <li>• 0,1 М ЭДТА (0.1 мл)</li> <li>• 50% глицерин (0.5 мл)</li> <li>• 10% ДСН (0.05 мл)</li> <li>• Довести объем водой (до 4.5 мл)</li> </ul> </li> <li>2. Разделяющий: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1,5 М трис-HCl, pH8,9 (5 мл)</li> <li>• 30% АА-МБА (6 мл)</li> <li>• 0,1 М ЭДТА (0.4 мл)</li> <li>• 50% глицерин (2 мл)</li> <li>• 10% ДСН (0.2 мл)</li> <li>• Довести объем водой (5.4 мл)</li> </ul> </li> </ol>
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День тринадцатый	
Дата	28.08.2020
День недели	Среда
Содержание работы (описание процесса)	<p>Сборка установки для электрофореза: скрепляем специальные стекла между собой, чтобы получить герметичную пластину, в которую будем заливать гели: сначала разделяющий гель (в раствор, что мы приготовили в прошлый день, добавили полимеризующее вещество). Для того, чтобы поверхность была ровная, мы приливаем 1 мл 5% раствора бутилового спирта, изменяющего коэффициент поверхностного натяжения. Когда гель застынет, излишек спирта убираем фильтровальной бумагой. Добавляем концентрирующий гель и накрываем гребнем. после застывания геля гребень вынимаем. Пластины с гелем устанавливаем в держатель для геля. Держатель устанавливается в установку для электрофореза.</p> <p>Приготовление белков плазмы крови и мышц к электрофорезу:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• С помощью спектрофотометра с длиной оптической длины 10нм и длиной волны 280нм, доводим образцы до плотности примерно равной 2мг/мл (кровь разводили 1:13.5 мышцы 1:4)</li> <li>• К белковым растворам доливаем SDS с красителем бромфеноловый синий и 5% меркартоэтанол в соотношении 1:1 (100 мкл буфера к 100 мкл пробы)</li> </ul> <p>В пространство между двумя гелями заливаем до краев раствор Running Buffer (общий объем 500мл) смешанный с SDS (общий объем 5мл). Оставшийся раствор вливаем в установку, в которой вставлены наши пластины.</p> <p>В ячейки концентрирующего геля вносим по 10мкл:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• В крайние - стандарт (итого 4 ячейки)</li> <li>• Между стандартами на одной стороне только белки мышц</li> <li>• На другой – белки плазмы крови</li> </ul> <p>Подключаем к прибору для электрофореза и включаем на 22 мА.</p>

	ждем примерно 1.5 часа. Затем достаем наши пластинки, фиксируем в 7% уксусной кислоте и окрашиваем белки красителем Кумасси.
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День четырнадцатый	
Дата	29.08.2020
День недели	Четверг
Содержание работы (описание процесса)	Промывка геля «быстрым» способом (заливаем кипятком и ставим на мешалку на 10 минут. Повторяем до прозрачности геля) и анализ результата электрофореза по Лэммли.
Соответствие графику	
Оценка	

Подпись руководителя практики	
-------------------------------------	--

День шестнадцатый	
Дата	30.08.2020
День недели	Пятница
Содержание работы (описание процесса)	Приготовление гистологических срезов на микротоме с одноразовыми ножами, перенос среза на предметное стекло, сушка на гистологическом столике.
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День семнадцатый	
Дата	2.08.2020
День недели	Понедельник
Содержание работы (описание процесса)	Гидратация парафиновых срезов в батарее спиртов.
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День восемнадцатый	
Дата	3.08.2020
День недели	вторник
Содержание работы (описание процесса)	Окрашивание парафиновых срезов Антителами I (специфичны на актин-бетатубулин) и антителами II, а так же окрашивание ядер красителем DAPI.
Соответствие графику	
Оценка	

Подпись руководителя практики	
-------------------------------------	--

День девятнадцатый	
Дата	4.08.2020
День недели	среда
Содержание работы (описание процесса)	Анализ гистологического препарата методом флуоресцентной микроскопии. Получение микрофотографий препаратов.
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День двадцатый	
Дата	5.08.2020
День недели	четверг
Содержание работы (описание процесса)	Работа с индивидуальным заданием. Анализ научной литературы.
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	



День двадцать первый	
Дата	6.08.2020
День недели	Пятница
Содержание работы (описание процесса)	Оформление отчета по практике. Подготовка к защите отчета. Консультация перед защитой.
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

День защиты отчета	
Дата	7.07.2020
День недели	Суббота
Содержание работы (описание процесса)	Сдача и защита отчетов и дневников перед руководителями практики. Подведены итоги практики по получению первичных профессиональных умений и навыков, в том числе первичных

	умений и навыков научно-исследовательской деятельности (биологической).
Соответствие графику	
Оценка	
Подпись руководителя практики	

### 3. Результаты защиты отчета

---



---



---



---



---

Отчет защищен « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

С оценкой \_\_\_\_\_

Руководитель ОП «Медицинская биохимия» \_\_\_\_\_ Т.В. Момот

**ШКОЛА БИОМЕДИЦИНЫ  
ДЕПАРТАМЕНТ**

**УТВЕРЖДАЮ:**  
Руководитель ОП

\_\_\_\_\_ Г.В. Момот  
" \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

**ИНДИВИДУАЛЬНОЕ ЗАДАНИЕ**

по практике по получению первичных профессиональных умений и навыков, в том числе первичных умений и навыков научно-исследовательской деятельности (Биологическая)

студенту С7120-30.05.01 группы Денискиной Виталии Романовны  
Образовательной программы 30.05.01 Медицинская биохимия

База (место, организация) практики Лаборатория биомедицинских клеточных технологий Школы биомедицины Дальневосточного федерального университета

Сроки практики с с 12 июля 2021 г. по 07 августа 2021 г.

Обобщенная формулировка задания	Электрофорез как метод и идентификации белков.
---------------------------------	--

Календарный план выполнения задания

Наименование задач (мероприятий), составляющих задание	Дата выполнения задачи (мероприятия)
1. принцип работы электрофореза	
2. разновидности электрофореза белков	
3. достоинства и недостатки метода	
4. применение метода	

Руководитель практики \_\_\_\_\_

*подпись*

*Ф.И.О., должность*

## **Принцип работы метода**

Под Электрофорезом понимают движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля. Основной принцип электрофоретического метода исследования заключается в том, что находящиеся в растворе молекулы, имеющие электрический заряд, под действием сил электрического поля смещаются в сторону противоположно заряженного электрода. Скорость миграции вещества в среде с одной и той же силой электрического поля, зависит от размера частиц и их электрического заряда.

## **Разновидности электрофореза белков.**

Существует множество способов классифицировать электрофорез. Мы разберем классификацию по типу носителя жидкой фазы:

### 1. электрофорез в свободных средах (без поддерживающей среды)

Первый разработанный электрофорез. Электрическая цепь между электродами замыкается через буферный раствор, в котором и происходило разделение белков.

### 2. электрофорез на фильтровальной бумаге

Каплю водного раствора, содержащего смесь аминокислот, наносят на полоску фильтровальной бумаги, смоченную буфером с данным значением pH. Далее к этой полоске прикладывают высокое напряжение, создающее сильное электрическое поле

### 3. электрофорез белков на ацетатцеллюлозной мембране

по принципу работы схоже с электрофорезом на фильтровальной бумаге, но имеет ряд отличий. Мембрана ацетатцеллюлозы как носитель для электрофореза имеет преимущества по сравнению с бумагой: однородность, строго определенный размер пор, пониженная адсорбционная способность, что исключает образование размытых полос позади зон. электрофорез в колонках и блоках гранулированной поддерживающей среды

#### 4. электрофорез в гелях

##### 4.1. электрофорез белков в ПААГ (полиакриламидном геле)

Электрофорез в полиакриламидных гелях с использованием натрия додецилсульфата (SDS) – наиболее распространенный способ электрофореза, используемый для оценки подлинности и чистоты белковых продуктов.

##### 4.2. электрофорез белков в крахмальном геле

первый электрофоретический метод, в котором для улучшения разделения веществ была использована среда, обладающая свойствами молекулярного сита

##### 4.3. электрофорез белков в агарозном геле

Агаровый гель ввиду большого количества воды в нем и вследствие этого большой скорости движения ионов используется в иммуноэлектрофорезе для обнаружения антигенов

#### Преимущества и недостатки

метод	преимущества	недостатки
Электрофорез на ацетатцеллюлозной мембране	Недорогой метод.	небольшое количество методов, невозможность проведения иммунофиксации
электрофорез в свободных средах (без поддерживающей	Первый электрофоретический метод, позволивший	Сложно избежать конвекции – перемешивания

среды)	разделять белки	разделяемых зон; для исследования нужна проба в десятки мг белка
электрофорез на фильтровальной бумаге	Сниженная конвекция, разделенные зоны можно зафиксировать и окрасить. Оборудование проще.	Непрозрачность. Загрязнения и неоднородность бумаги мешают разделению. “Хвосты” на электрофореграммах из-за высокой адсорбционной емкости. Фон окрашивается, что затрудняет распознавание белковых зон.
электрофорез белков в ПААГ	Химически инертен, можно кипятить. Можно задать необходимый размер пор и обеспечить свойства молекулярного сита. Высокая прозрачность. Легко готовить. Упругий, прочный.	Непрозрачность в водных растворах (можно добиться прозрачности, погрузив в минеральное масло). Дороже, чем при использовании бумаги. Мало пригоден для препаративного электрофореза.
электрофорез белков в крахмальном геле	Первый носитель со свойствами	Низкая прозрачность, хрупкость, размер пор

	молекулярного сита. Активно препятствует конвекции. Повышает разрешение.	можно менять лишь в небольших пределах. Приготовление качественного геля трудоемко.
электрофорез белков в агарозном геле	Удовлетворительная прозрачность, высокая пластичность (проще резать, удобнее красить и определять ферментативную активность прямо в геле), простота изготовления	Из-за отрицательного заряда на сульфатных и СООН-группах сетки агара возникает электроосмос, приводящий к неравномерному распределению электрического поля, а иногда – гидростатического давления. Возможно химическое взаимодействие веществ с агаром.

### Применение

Метод электрофореза используется в научной практике как метод идентификации и фракционирования смеси белков, фармацевтическом производстве на основе белков, для оценки качества и чистоты продукции, а также в клинических лабораторных исследованиях для определения биохимического состава крови, секвенирования.

### Литература

1. Ларский Электрофорез Г., Методы зонального электрофореза, М., 1971
2. Духин С. С., Дерягин Б. В., Электрофорез, М., 1976.
3. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288 с.
4. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М., МЦНМО, 2002, 248 с.
5. Кутлунина Н. А., Ермошин А. А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений: учебно-методическое пособие. – 2017.
6. Электрофоретическое исследование белков в лабораторной практике / Д.В. Горбачева, – Гомель: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2020. – 42 с.



## СОДЕРЖАНИЕ

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	34
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	35
ВВЕДЕНИЕ.....	36
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	39
1 Общие сведения о Центре геномной и регенеративной медицины и лаборатории биомедицинских клеточных технологий.....	39
2 Техника безопасности в лаборатории и санитарной обработки лабораторной посуды.....	43
3 Приготовление растворов.....	46
4 Культивирование клеток эукариот.....	48
5 Иммуногистохимия. Гистологическая обработка препаратов.....	50
6 Биохимия. Электрофорез белков плазмы крови и мышц.....	54
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	59
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	62
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	64

## ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Водородный показатель (рН) – это величина, характеризующая концентрацию или активность ионов водорода в растворе.

Электрофорез в полиакриламидовом геле – это способ разделения смеси белков на фракции или индивидуальные белки с помощью электрического тока в проводящей среде в зависимости от их размера и заряда.

Декапитация – метод умерщвления лабораторных животных путем их обезглавливания.

Эвтаназия - практика намеренного прекращения жизни, чтобы облегчить боль и страдания

Центрифугирование — это метод, метод или процедура, которая механически или физически разделяет молекулы или частицы с различной плотностью и которые также присутствуют в жидкой среде.

## **ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ШБМ – Школа биомедицины

ДФУ – Дальневосточный федеральный университет

БСА (BSA) – бычий сывороточный альбумин

PBS – фосфатно-солевой буфер

SDS – додецилсульфат натрия

ЭДТА - Этилендиаминтетрауксусная кислота

Трисс - трис(гидроксиметил)аминометан

## ВВЕДЕНИЕ

Практика по получению первичных профессиональных умений и навыков, в том числе первичных умений и навыков научно-исследовательской деятельности (биологическая практика) представляет собой вид учебных занятий, ориентированных на получение начальных навыков и умений в профессиональных научно-исследовательской и медицинской деятельности.

Практические занятия проходили в лаборатории биомедицинских клеточных технологий на базе Центра Геномной и Регенеративной Медицины ШБМ ДВФУ в период с 12.07.2020 г. по 07.08.2020 г.

Практика включает в себя три этапа:

1) Подготовительный (организационный) этап:

- получение документов на практику (дневник, направление, индивидуальное задание) в электронном виде;
- прохождение первичного инструктажа по технике безопасности в лаборатории;
- организация рабочего процесса и знакомство с руководителями практики.

2) Основной этап:

- ознакомление с основными методами работы и оборудованием в биохимической, молекулярно-биологической, оптической и др. видах лабораторий, а также с особенностями техники безопасности в них;
- выбор технических средств и методов работы, работа на экспериментальных установках, подготовка оборудования;
- подготовка объектов и освоение методов исследования;
- приобретение практических навыков приготовления растворов;
- приобретение навыков работы с лабораторными животными и выделения биоматериала;

- овладение методом выделения и фракционирования высокомолекулярных белковых соединений.

- приобретение навыков работы с культурой клеток в ламинарном боксе: размораживание, пересадка, смена среды и заморозка

- освоение методик приготовления гистологических препаратов, а также типов оборудования и способов для их визуализации

### 3) Итоговый этап:

- обработка и систематизация полученного материала;
- оформление индивидуального задания и отчета о прохождении практики;

- защита отчета по практике.

### Цели данной практики:

- закрепление теоретических знаний, полученных при изучении базовых и профессиональных дисциплин по программе специалитета 30.05.01 Медицинская биохимия;

- приобретение базовых навыков работы в научно-исследовательской лаборатории;

- получение навыков работы с научной литературой по тематике исследований и правильного оформления документации в виде отчета и дневника практики.

### Задачи данной практики:

- ознакомление с техникой безопасности лаборатории, принципами эксплуатации и устройства лабораторного электронного оборудования, принципами работы лабораторных инструментов и технологиями стерилизации лабораторной посуды;

- подготовка объектов и освоение методов исследования;

- знакомство с принципами работы с лабораторными животными, их умерщвления и проведения биопсии;

- участие в проведении лабораторных и биологических исследований по заданной методике

- приготовление и обработка гистологических препаратов из биопсионного материала;
- выбор технических средств и методов работы, работа на экспериментальных установках, подготовка оборудования;
- анализ и обработка полученной в ходе экспериментов информации с использованием современной вычислительной техники и работа с соответствующим программным обеспечением (ПО);
- работа с научной литературой, соответствующей тематике исследования. оформление проделанной работы.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Общие сведения о Центре геномной и регенеративной медицины и лаборатории биомедицинских клеточных технологий.

### 1.1 Характеристика Центра геномной и регенеративной медицины

Центр геномной и регенеративной медицины (далее – Центр) Школы биомедицины (далее – ШБМ) является структурным подразделением Департамента фундаментальной и клинической медицины ШБМ ДВФУ[3], осуществляющим разработку, внедрение и применение технологии геномной и регенеративной медицины для развития высокотехнологичной медицинской помощи населению Российской Федерации и стран азиатско-тихоокеанского региона[6].

На базе Центра осуществляется подготовка кадров для биомедицинских научных исследований и практической деятельности в высокотехнологичных медицинских центрах, в том числе кадров высшей квалификации, осуществляется внедрение и реализация новых сетевых, международных образовательных программ, направленных на подготовку уникальных специалистов для биотехнологической, биофармацевтической и медицинской отрасли, научные исследования, в том числе заказные доклинические исследования на контрактной основе, выполняется разработка и внедрение в медицинскую практику инновационных методов диагностики и лечения социально значимых заболеваний человека в соответствии с технологической платформой «Медицина будущего» на основе основных критических технологий: «Клеточные технологии» и «Геномные, протеомные и постгеномные технологии».

Основными направлениями деятельности Центра являются[4]:

- Образовательное направление. Подготовка кадров, в том числе

кадров высшей квалификации, внедрение и реализация сетевых и международных образовательных программ, внедрение и реализация новых образовательных программ различных уровней подготовки: «Молекулярная биотехнология» (бакалавриат), «Молекулярная биотехнология» (магистратура), «Медицинская биология» (магистратура), «Биомедицинские клеточные технологии» (магистратура), «Медицинская генетика» (ординатура), «Клиническая лабораторная диагностика» (ординатура), «Технологии репродуктивной медицины и экстракорпорального оплодотворения» (ординатура), «Медицинская эмбриология» (магистратура) и других.

- Лечебно-диагностическое и лечебно-вспомогательное направление. Разработка и обеспечение криогенного банка биологических образцов, предназначенного для типирования и хранения клеточных и генетических материалов с целью последующего использования для развития технологий персонализированной медицины. Внедрение и реализация медицинских услуг в области клинической лабораторной диагностики, медицинской генетики, медицинской биохимии, эмбриологии, в том числе посредством выполнения уникальных генетических и клеточных диагностических процедур *in vitro*, не реализуемых в рамках рутинной клинической лабораторной диагностики (диагностика редких генетических болезней, массовое параллельное секвенирование образцов пациентов для составления профиля генетически обусловленных предрасположенностей к заболеваниям; сложная клеточная диагностика на основе уникальных роботизированных платформ и оптических систем для витальной микроскопии).

- Исследовательское и опытно-конструкторское направление. Проведение собственных исследований в области геномной, регенеративной, молекулярной медицины и клеточных технологий, а также исследования и разработки в целевой области, поддерживаемые Федеральными целевыми программами, перспективными инвестиционными проектами. Проведение



высокотехнологичных контрактных исследований по заказам биотехнологических и фармацевтических компаний, а также других образовательных и исследовательских учреждений на уникальном оборудовании, специально спроектированном и размещенном в единую технологическую линию для проведения доклинических испытаний материалов медицинского назначения и новых лекарственных кандидатов.

Центр включает в себя:

- лабораторию «Геномная медицина»;
- лабораторию биомедицинских клеточных технологий;
- лабораторию ДНК-диагностики.

## **1.2 Характеристика лаборатории биомедицинских клеточных технологий**

Лаборатория биомедицинских клеточных технологий является структурным подразделением Центра геномной и регенеративной медицины Департамента медицинской биологии и биотехнологии Школы биомедицины ДВФУ.

Основными задачами лаборатории биомедицинских клеточных технологий являются[5]:

- 1) развитие теоретических и экспериментальных исследований в области биомедицинских клеточных технологий;
- 2) создание научной школы клеточных биологов;
- 3) создание на базе ШБМ центров превосходства ДВФУ по геномной и регенеративной медицине, развитие и укрепление связей с ведущими и международными научными центрами;

4) развитие международного научного сотрудничества в рамках основных направлений деятельности лаборатории, содействие развитию международного сотрудничества ДВФУ;

5) повышение квалификации научно-педагогических работников ДВФУ по направлению деятельности лаборатории;

6) участие в образовательном процессе по укрупненным группам и направлениям подготовки:

– 06.00.00 Биологические науки (06.04.01 Биология, 06.06.01 Биологические науки);

– 30.00.00 Фундаментальная медицина (30.05.01 Медицинская биохимия, 30.05.02 Медицинская биофизика);

7) Предоставление материальной базы для проведения исследований и подготовки кандидатских и докторских диссертаций.

## **2. Техника безопасности в лаборатории и санитарной обработки лабораторной посуды**

### **2.1 Техника безопасности[5]:**

1) Приступать к работе можно только после усвоения всей техники ее выполнения.

2) Необходимо соблюдать данные руководителями практики инструкции.

3) Перед включением электроприбора необходимо проверить его состояние. При появлении дыма или запаха гари во время эксплуатации устройства нужно незамедлительно отключить прибор от электросети и сообщить об этом руководителю практики или сотрудникам лаборатории.

4) Во время проведения работы необходимо находиться в лабораторном халате. Длинные волосы должны быть аккуратно собраны.

5) Необходимо знать, где находятся средства индивидуальной защиты, аптечка, средства для тушения пожара.

6) Работы с использованием вредных веществ (фиксирование материала, розлив формалина, концентрированных кислот, приготовление реактивов, прокаливание, выжигание, измельчение) и летучими жидкостями должны проводиться в вытяжном шкафу.

7) Остатки используемых реактивов необходимо обезвредить и слить в специальные емкости для отходов.

8) При работе в ламинарном боксе за 40 минут до начала работы его необходимо облучить бактерицидными ультрафиолетовыми лампами 20-30 минут.

9) Вносимые внутрь ламинарного бокса предметы обязательно должны быть продезинфицированы 70% раствором этилового спирта, выносить изучаемые объекты и техническое оборудование за пределы ламинарного бокса строго запрещено.

10) Во время работы в ламинарном боксе нельзя проносить руки над открытой стерильной поверхностью.

11) По окончании работы в ламинарном боксе колбы, пробирки и чашки Петри обязательно должны быть подписаны. Поверхность ламинарного бокса нужно обработать 70% раствором этанола, инструменты и материалы упаковывают и стерилизуют.

12) При работе с центрифугой категорически запрещается открывать крышку до полной остановки ротора [8].

13) При работе с центрифугой необходимо обязательно уравновесить ротор во избежание поломки.

14) В случае попадания исследуемого материала или культуры микроорганизма на руки, стол, халат или обувь необходимо сообщить об этом руководителю практики или сотрудникам лаборатории и провести дезинфекцию.

15) В лаборатории категорически запрещается принимать пищу, пить и курить.

16) В лаборатории не должно быть избыточного шума.

17) Необходима маркировка материалов, которые могут предоставлять ту или иную опасность.

18) После окончания работы в лаборатории рабочее место дезинфицируется, использованные материалы и инструменты обезвреживаются, руки тщательно промываются с мылом, помещение должно быть проветрено и, по возможности, стерилизовано с помощью УФ-ламп.

## **2.2 Санитарная обработка использованной лабораторной посуды:**

1) Промывка посуды специальным моющим средством.

2) 10 раз промыть посуду в проточной воде.

3) 3 раза промыть посуду в дистиллированной воде.

- 4) Замочить посуду в 10% растворе гипохлорита натрия от 2-х часов до 3-е суток.
- 5) 10 раз промыть посуду в проточной воде.
- 6) 3 раза промыть посуду в дистиллированной воде.
- 7) Замочить посуду в дистиллированной воде от 15 минут до 2-х часов.
- 8) Просушить посуду на лабораторном столике.
- 9) Просушить посуду в сухожаровом шкафу.

### 3. Приготовление растворов

Во время приготовления необходимых для дальнейшей работы растворов использовался специальный прибор – рН-метр. Данный метод заключается в сравнении потенциала индикаторного стеклянного или хингидронного электрода, погруженного в испытуемый раствор, с потенциалом вспомогательного хлорсеребряного электрода в стандартном буферном растворе с известным значением рН [9]

#### 1. Использованное оборудование и материалы:

- Магнитные мешалки;
- Дозаторы;
- рН-метр Sartorius PB-11;
- вода деионизированная;
- раствор NaOH;
- раствор HCl;
- двукратный PBS (фосфатно-солевой буфер);
- 95% спирт C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH;
- Изопропанол.

#### 2. Ход работы (фактическая информация совпадает с унифицированной):

- 1) Проведение калибровки стандартными буферными растворами по 3 точкам при комнатной температуре. Для каждого стандартного буферного раствора с рН 7, рН > 7 и рН < 7:
  - a. включение рН-метра и погружение концов стеклянных электродов в стандартный буферный раствор;
  - b. перемешивание стандартного буферного раствора;
  - c. осуществление проверки прибора по стандартному буферному раствору в режиме стандартизации рН-метра;
  - d. после калибровки по одному стандартному буферному раствору необходимо проведение процедуры промывки электродов от

раствора KCl 3M несколькими смывами деионизированной воды с pH 6,5 в течение 3-х минут.

Изучение видов лабораторной посуды, ознакомление с теорией буферных растворов. Расчет массы веществ для приготовления следующего раствора:

2) приготовление PBS-PFA:

8г порошкообразного PFA разводим в 40 мл дистиллированной воды. Приливаем 50 мкл 10% NaOH, затем ставим на водяную баню ( $t=95^{\circ}$ ) до полного растворения порошка. Затем доводим объем раствора до 50 мл и приливаем к нему 50 мл готового двукратного буфера PBS;

3) Приготовление растворов:

- 100 мл 0,1M ЭДТА (буфер пара – NaOH, pH = 7,2); 2,92 г ЭДТА или 3,72 г динатриевой соли ЭДТА (трилон Б) перемешивают на магнитной мешалке с 80 мл H<sub>2</sub>O и титруют концентрированным раствором NaOH до значения pH близкого к нейтральному, но не выше pH7,5 по универсальной индикаторной бумаге (при этом раствор полностью просветляется), затем доводят объем дистиллированной водой до 100 мл.
- 100 мл 0,5M Трисс (буфер пара – HCl, pH=6,7); 6,06 г триса растворяют в 80 мл воды и титруют при перемешивании на магнитной мешалке от 3 до 6M раствором HCl до pH6,7, затем доводят дистиллированной водой до 50мл при перемешивании на мешалке.
- 1 л Running Buffer (раствор трисс-глицин) (буфер пара – трисс, pH=8,4); 192мМ трисс-глициновый буфер pH 8,4 28,8 г глицина растворяют в 900 мл дистиллированной воды, титруют сухим триссом до pH 8,4 и доводят дистиллированной водой до 1л. Перед использованием буфер разбавляют дистиллированной водой в два раза и на каждые 100мл конечного раствора прибавляют 1 мл 10% ДСН.

Приготовление растворов:

- 190 мл  $C_2H_5OH$  70% (из 95%);  
К 140 мл 95% этанола приливают 40 мл дистиллированной воды, для получения 70% спирта.
- 190 мл  $C_2H_5OH$  90% (из 95%);
- К 180 мл 95% этанола приливают 10 мл дистиллированной воды, для получения 90% спирта.
- 190 мл  $C_2H_5OH$  60% (из 95%);
- К 120 мл 95% этанола приливают 70 мл дистиллированной воды, для получения 60% спирта.
- 100 мл  $C_2H_5OH:C_3H_7OH$  (1:3);  
К 75 мл  $C_3H_7OH$  приливают 25 мл  $C_2H_5OH$ .
- 100 мл  $C_2H_5OH:C_3H_7OH$  (3:1);  
К 75 мл  $C_2H_5OH$  приливают 25 мл  $C_3H_7OH$ .

#### 4. Культивирование клеток эукариот

Метод культивирования эукариотических клеток был разработан специально для изучения свойств живых клеток, свободных от системных влияний, возникающих *in vivo*.

В данной работе мы лишь создали среду для культивирования клеток:

##### 1. Приготовление культуральной среды

В нашем опыте использовалась питательная среда DMEM – F-12, приготовление которой соответствовало общему принципу приготовления. Она соответствовала следующим требованиям:



– наличие оптимального водородного показателя (рН), которая влияет на проницаемость мембран клеток и, соответственно, на усваиваемость различных питательных веществ (оптимальна слабощелочная среда);

– иметь в легко усвояемом виде питательные вещества и различные факторы роста (витамины, аминокислоты);

– максимальная стерильность, так как посторонние микроорганизмы могут изменять характеристики среды и препятствовать росту исследуемых клеток и определению их свойств;

– наличие определенным окислительно-восстановительным потенциалом, который показывает насыщенность среды кислородом и характерный для различных микроорганизмов;

– унифицированность среды, содержать постоянное количество отдельных компонентов среды.

## 2. Состав культуральной среды, которая использовалась на практике:

– Готовая порошкообразная среда DMEM.

– Готовая порошкообразная среда F-12.

– Глюкоза

–  $\text{NaHCO}_3$

### 4.1.3 Ход работы приготовления питательной среды (фактическая информация совпадает с унифицированной) [10]:

1. Отбор и взвешивание навесок компонентов будущей питательной среды на аналитических весах.

2. Растворение в деионизированной воде всех компонентов будущей питательной среды.

3. Титрование с Учётом кислотности среды при помощи рН-метра, так как при стерилизации рН снижается на 0,2 пункта.

4. Фильтрация через влажный бумажный фильтр (для плотных и жидких сред) или через ватно-марлевый фильтр (для агаровых сред);

5. Стерилизация питательной среды в вакуумной установке.

6. Контроль стерильности среды посевом специальных клеточных культур на образцы приготовленной питательной среды. По росту клеток анализируют о питательных свойствах среды.

## **5. Иммуногистохимия. Приготовление гистологического препарата**

Иммуногистохимия — исследование, во время которого в образцах ткани с помощью антител выявляют определенные молекулы [7]

### 1.1 Используемое оборудование и материалы:

- биологический материал – кусочек мозжечка лабораторной мыши;
- ножницы и пинцет;
- 4%-ный раствор формалина – фиксирующий раствор;
- PBS (фосфатно-солевой буфер), растворы этилового спирта концентрации 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%; растворы этанол: изопропанол (3:1, 1:3); изопропиловый спирт; растворы изопропанол: парафин (1:1); парафин I; парафин II; ксилол; вода; водный раствор аммиака; красители гематоксилин и эозин;
- микротом с одноразовыми ножами;
- гистологическая ванна и гистологический столик;
- предметное и покровное стекло;
- монтирующая среда (прозрачная синтетическая смола);
- микроскоп.

### 1.3 Ход работы (унифицированная информация о методе) [1]:

1) взятие и фиксация биологического материала; главное требование – максимальное сокращение сроков взятия материала, минимальное травмирование тканей и создание оптимальных условий для фиксации:

- а) применение для умерщвления лабораторных животных наркоза,

декапитации, электрического тока и т.д.;

б) быстрое вскрытие животного, извлечение необходимых органов и тканей, из которых острым инструментом вырезают небольшие кусочки (5-10 мм<sup>3</sup>), помещение их в фиксатор;

в) объем фиксатора должен превышать объем фиксируемого объекта в 20-40 раз; применяемый фиксатор может простым (спирт, формалин, ацетон) и сложным, состоящим из 2-х и более компонентов (жидкость Карнуа: абсолютный спирт, хлороформ, ледяная уксусная кислота);

2) промывание, обезвоживание и заливка биологического материала:

а) промывание кусочка ткани под проточной водой в течение 12-24 часов для освобождения от излишков фиксатора; для объектов, фиксированных в спирте или жидкости Карнуа, этот этап пропускают;

б) обезвоживание и уплотнение в батарее спиртов возрастающей крепости (50 % => 60 % => 70 % => 90 % => 96 % => 100 %);

в) просветление кусочка посредством помещения в смесь абсолютного спирта и орто-ксилола (1:1), затем в две-три порции чистого орто-ксилола;

г) после просветления пропитывание материала в парафине, используя термостат: сначала в смеси орто-ксилола и парафина (1:1) при температуре 37 градусов, а затем в 2-3 порциях чистого парафина, расплавленного при температуре 56 градусов;

д) наклеивание пропитанного парафином кусочка на деревянный блок;

3) приготовление гистологических срезов с помощью ротационного микротомы; наклеивание полученных гистологических срезов на предметное стекло, предварительно смазанное смесью белка и глицерина (1:1) и сушка на воздухе либо в термостате при 37 градусах;

4) окрашивание и заключение срезов:

1) Сухие и частично дегидратированные препараты насытить водой в серии спиртов понижающихся концентраций.

2) Поместить стекла на 1–5 мин в 2х PBS.

- 3) Нанести на препарат 500 мкл блокирующего раствора, поставить во влажную камеру и инкубировать 30–60 мин при 4°C.
- 4) Стряхнуть блокирующий раствор и нанести 200 мкл раствора I антител. инкубировать во влажной камере 60-120 мин.
- 5) Отмывать в 3 сменах 2х PBS;
- 6) Нанести на препарат 200 мкл раствора II антител, поставить в темную влажную камеру и инкубировать 40–60 мин.
- 7) Отмывать в 3 сменах 2х PBS;
- 8) Нанести на препарат краситель DAPI
- 9) Отмывать в 5 сменах 2х PBS;
- 10) Заключить препарат в фотозащитную среду и исследовать под микроскопом

#### 1.4 Ход работы (фактическая информация о методе)

##### 1) взятие и фиксация биологического материала:

а) предварительная эвтаназия лабораторной мыши диэтиловым эфиром в эксикаторе; вскрытие с помощью ножниц и изъятие необходимого материала (кусочек мозжечка) с помощью пинцета; помещение объекта в фиксирующую среду (4%-ный формалин) на час;

##### 2) промывание, обезвоживание и заливка биологического материала;

а) промывка объекта последовательной сменой фосфатно-солевых буферов (PBS) три раза по тридцать минут; проводка объекта через батарею спиртов с возрастающей концентрацией (50 % => 60 % => 70 % => 80 % => 90% => 95 %) по 30 минут на каждый спирт;

б) замена спирта в ткани на изопропанол последовательной сменой смесей этанол : изопропанол (3:1), этанол : изопропанол (1:3) по 30 минут на каждую смесь; помещение объекта в чистый изопропанол на ночь; последовательная замена изопропанола на парафин в термостате при 65

градусах с помощью растворов изопропанол : парафин (1:1) на полтора часа, парафина I и парафина II по 2 часа на каждый;

в) заливка будущего гистологического препарата в парафиновые блоки на ночь;

3) приготовление гистологических срезов:

а) приклеивание парафинового блока к пластмассовой конструкции, прямо перед этим залитой избытком парафина;

б) закрепление парафинового блока на микротом и его нарезка;

в) помещение полученного парафинового среза в гистологическую ванну, содержащую воду с температурой 37 градусов для последующего расправления препарата;

г) помещение среза на предметное стекло при помощи пинцета, сушка на гистологическом столике;

4) окрашивание срезов:

б) после сушки на гистологическом столике последовательное депарафинирование при помощи следующих соединений: ксилол I (10 минут), этанол I 90 % (5 минут), этанол 80 % (5 минут), этанол 70 % (5 минут), этанол 60 % (5 минут), этанол 50 % (5 минут), раствор PBS (5 минут);

в) окрашивание в антителах:

окантовка препарата гидрофобным маркером;

блокировка неспецифических взаимосвязей 3% обезжиренным раствором сухого молока во влажной среде в +4°C;

Окрашивание антителами I в течение 2-х часов, затем отмывание в растворе PBS 3 раза по 5 минут

окрашивание антителами II в течение 1 часа.

Отмывание в растворе PBS 5 раз по 5 минут

Окрашивание ядер красителем DAPI

Отмывание в растворе PBS 5 раз по 5 минут

г) наклеивание фотозащитного стекла

## Вывод

В результате проведенной работы было проведена декапитация усыпленной диэтиловым эфиром лабораторной мыши и ее вскрытые с аутопсией мозжечка.

В процессе проведения работы по приготовлению гистологического препарата был получен продольный срез ткани мозжечка толщиной 6 микрометров и окрашен антителами специфичными на актин и бетатубулин.

Так, синим цветом на микроснимке окрашены ядра, зеленым – микротрубочки, красным - микрофиламенты

## **6. Работа с белками плазмы крови и мышц лабораторной мыши. Электрофорез в полиакриламидовом геле.**

### 1 Электрофорез

Электрофорез — это электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидных или белковых растворов) в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля.

Электрофорез в гелях является «Золотым стандартом» в электрофорезе. В этом методе в качестве опорной среды используют крахмальный, агар-агаровый или полиакриламидный гели. Характерной особенностью этой разновидности зонального электрофореза является его высокая разрешающая способность, поскольку гели функционируют как молекулярные сита: крупные молекулы проходят сквозь него тем медленнее, чем меньше размер пор в геле

### 2 оборудование и материалы:

#### Оборудование

##### 1. Камера для вертикального электрофореза

2. Комплект оборудования для формирования геля.
3. Центрифуга (10000g).
4. Химические колбы, стаканы, пластиковые пробирки на 5 и 50 мл, автоматические пипетки-дозаторы регулируемого объема

#### Реактивы

1. 0,5 М трис-НСl, рН6,7 (1.25 мл)
  2. 30% АА-МБА (0.75 мл)
  3. 0,1 М ЭДТА (0.1 мл)
  4. 50% глицерин (0.5 мл)
  5. 10% ДСН (0.05 мл)
  6. 1,5 М трис-НСl, рН8,9 (5 мл)
  7. краситель Кумасси
  8. ТЕМЕД
  9. 1% ПСА
  10. Раствор трисс-глицина
  11. SDS
  12. МЭ
  13. Раствор для солюбилизации образцов
  14. Фиксирующий раствор
3. Ход работы (унифицированная информация о методе):
1. изъятие биологического материала и его гомогенизация вручную посредством продавливания клеток через зазор;
  2. забор гомогенизированного материала дозатором и внесение его в пробирку, добавление в пробирку буферного раствора в объеме в два-три раза больше объема ткани;
  3. экстракция белка при помощи центрифуги нием при 10000-20000 оборотах в минуту в течение 5-ти минут;

4. забор всей надосадочной жидкости (супернатанта) из пробирки и помещение ее в новую пробирку, слив полученного осадка в лабораторные отходы;
  5. электрофорез белков по Лэммли в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия (ДСН);
  6. приготовление двух гелей: концентрирующего и разделяющего;
  7. приготовление и добавление в камеру для электрофореза 10%-ного раствора додецилсульфата натрия, а также буфера для концентрирующего геля с рН 6,8 и буфера для разделяющего геля с рН 8,8;
  8. фиксация результатов электрофореза ледяной 100%-ной уксусной кислотой;
  9. окрашивание разделенных белков красителем Кумасси синий в течение 15-ти минут;
  10. промывание результатов электрофореза 7%-ной уксусной кислотой по 15 минут на каждое промывание до устойчивого проявления окрашенных полос белков.
- 4.Ход работы (фактическая информация о методе):
1. Взятие материала у предварительно умерщвленной лабораторной крысы (см. пункт Иммуногистохимия)
  2. Доводим концентрацию до 2мг/мл:
    - а. 50мкл концентрированного белкового раствора помещаем в пластиковую пробирку для микропроб



- b. Анализируем концентрацию с помощью спектрофотометра
- c. Разбавляем раствором PBS до конечной концентрации 2 мг/мл (кровь 1:14, мышцы 1:6)
- d. Центрифугируем при 300g 5 минут и собираем надосадочную жидкость

### 3. Собираем конструкцию

Сборка установки для электрофореза: скрепляем специальные стекла между собой, чтобы получить герметичную пластину, в которую будем заливать гели.

### 4. Приготовление разделяющего геля

- a) Готовим 20 мл раствора для формирования разделяющего геля:

- 1,5 М трис-HCl, pH8,9 (5 мл)
- 30% АА-МБА (6 мл)
- 0,1 М ЭДТА (0,4 мл)
- 50% глицерин (2 мл)
- 10% ДСН (0,2 мл)
- Довести объем водой (до 19 мл)
- ТЕМЕД (10 мкл)
- 1% ПСА (1 мл)

- b) Заливаем в гелевую ячейку, прибавляя гель с правой стороны

- c) По каплям(но быстро) с левой стороны прибавляем бутанол(100 мкл) для формирования ровной верхней границы геля.

- d) Оставляем гель в покое для прохождения полимеризации.

- e) После полимеризации бутанол быстро смываем

- f) Воду удалить перевернув камеру, небольшой остаток оставить, чтобы не сох верхний край геля
- g) Перед заливкой концентрирующего геля, скорость полимеризации которого должна быть выше и процесс должен проходить за 10 минут, избыток воды лучше удалить полоской фильтровальной бумаги, перевернув камеру на боковой торец (на 90°)

5. Приготовление концентрирующего геля):

- a) Готовим 10 мл:
  - 0,5 М трис-HCl, pH6,7 (2,5 мл)
  - 30% АА-МБА (1,5 мл)
  - 0,1 М ЭДТА (0,2 мл)
  - 50% глицерин (1 мл)
  - 10% ДСН (0,1 мл)
  - Довести объем водой (до 9 мл)
  - ТЕДЕМ (10 мкл)
  - 1% ПСА (1 мл)
- b) Добавляем концентрирующий гель и накрываем гребнем. после застывания геля гребень вынимаем.
- c) Пластины с гелем устанавливаем в держатель для геля.
- d) Держатель устанавливаем в установку для электрофореза.

6. В пространство между двумя гелями заливаем до краев раствор Running Buffer (общий объем 500мл) смешанный с SDS (общий объем 5мл). Оставшийся раствор вливаем в установку, в которой вставлены наши пластины.

7. В ячейки концентрирующего геля вносим по 10мкл:

- В крайние - стандарт (итого 4 ячейки)
- Между стандартами на одной стороне только белки мышц (итого 8 ячеек)
- На другой – белки плазмы крови (итого 8 ячеек)

8. Запускаем электрофорез при 22мА на 1.5 часа
9. Фиксируем результаты электрофореза в 7% уксусной кислоте и окрашиваем белки красителем кумасси.
10. Отмываем гели до проявления пятен электрофореза: заливаем кипяток и ставим на мешалку на 10 минут. Повторяем.

## 6. ВЫВОД

В ходе проведения опыта была получена лестница разделения смеси белков, которая была сравнена со стандартной лестницей молекулярных масс белков. Это позволило ориентировочно судить о том, какие белки присутствуют в плазме крови (далее приведены белки и их молекулярная масса):

- глобулин – 193 кДа;
- альбумины – от 62 до 75 кДа;

белки мышц:

- тропомиозин – 63 кДа
- тропонин – 37 кДа
- актин (развалился) – от 46 до 37 кДа
- меромиозин тяжелый – 216 кДа
- меромиозин легкий – 98 кДа

Полученный результат был оцифрован посредством системы документирования и анализа результатов электрофореза ChemiDoc Touch (Приложение В, Рисунок В.2).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе практики по получению первичных профессиональных умений и навыков, в том числе первичных умений и навыков научно-исследовательской деятельности (Биологическая) исследованы и изучены следующие методы:

- рН-метрия растворов;
- взятие и фиксация аутопсийного материала;
- приготовление питательной среды;
- центрифугирование;
- электрофорез белков в полиакриламидном геле;
- приготовление гистологических препаратов.

В ходе учебно-ознакомительной практики были выполнены следующие задачи:

1. Подготовка объектов и освоение методов исследования, применяемых в биохимической лаборатории. Были теоретически освоены следующие методы:

- подготовка реагентов для приготовления буферных растворов;
- калибровка и использование рН-метра;
- приготовление пектиновых гелей разной степени этерификации;
- взятие и фиксация аутопсийного материала;
- стерилизация использованных лабораторных инструментов и растворов;
- приготовление культуральной среды;
- теоретическое освоение электрофореза белков в полиакриламидном геле;
- приготовление гистологических срезов.

2. Получение аутопсийного материала для дальнейших лабораторных исследований.

3. Участие в проведении лабораторных исследований по заданным методам.

4. Анализ полученных результатов исследований при помощи современной вычислительной техники и специализированного ПО.

Представленные данные по проанализированным источникам международной научной литературы по теме исследования являются достаточной основой для понимания основных методов, используемых в проведении исследования в биохимической лаборатории.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Сайфитдинова А. Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов //СПб.: Соло. – 2008.
2. Положение о Центре Геномной и регенеративной медицины Школы Биомедицины. – Владивосток: ФГАОУ ВО «ДВФУ», 2017. – 22 с.
3. Положение о лаборатории биомедицинских клеточных технологий Школы Биомедицины. – Владивосток: ФГАОУ ВО «ДВФУ», 2017. – 17 с.
4. Шлейкин, А.Г. Биохимия. Лабораторный практикум: Часть 1. Методические основы и правила работы в лаборатории биохимии: Учеб. пособие / А.Г. Шлейкин, Н.Н. Скворцова, А.Н. Бландов. – СПб.: Университет ИТМО; ИХиБТ, 2015. – 70 с.
5. **Кумейко, В.В.** Положение о лаборатории биомедицинских клеточных технологий Школы биомедицины / В.В. Кумейко. – Владивосток: Издательство Дальневосточного университета, 2017. – 17 с.
6. **Каганский, А.М.** Положение о Центре геномной и регенеративной медицины Школы биомедицины / А.М. Каганский. – Владивосток: Издательство Дальневосточного университета, 2017. – 22 с.
7. Коржевский Д. и др. (ред.). Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии. – Litres, 2017.
8. ГОСТ ИЕС 61010-2-020-2013 Безопасность электрических контрольно-измерительных приборов и лабораторного

оборудования. Часть 2-020. Частные требования к лабораторным центрифугам. – М.: Стандартинформ, 2014. – 38 с.

9. **Петров А. Ю., Зырянов В. А., Олехова Т.В.** рН-метрия.

Учебно-методическое пособие по фармацевтической химии. – Екатеринбург. УГМА, 2011 – 52 с.

10. **Асташкина, А. П.** Приготовление питательных сред и

культивирование микроорганизмов: методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения / сост. А.П. Асташкина; Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2015. – 19 с.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение А

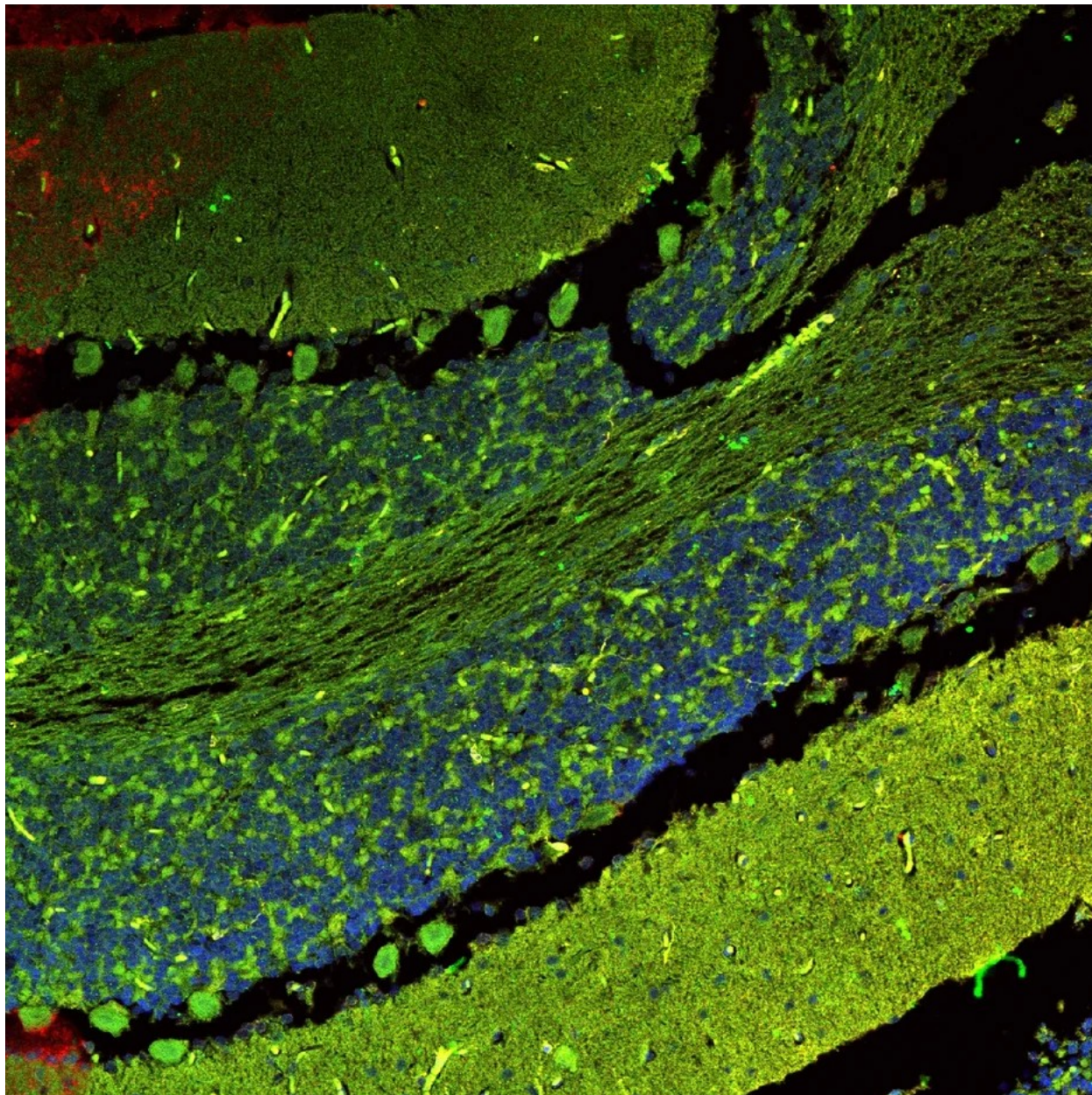


Рисунок А.1 – микрофотография мозжечка в III tubulin длина волны 488 на actin568





Рисунок Б.3 – Система анализа и документирования результатов 1- и 2-D электрофореза  
ChemiDoc Touch

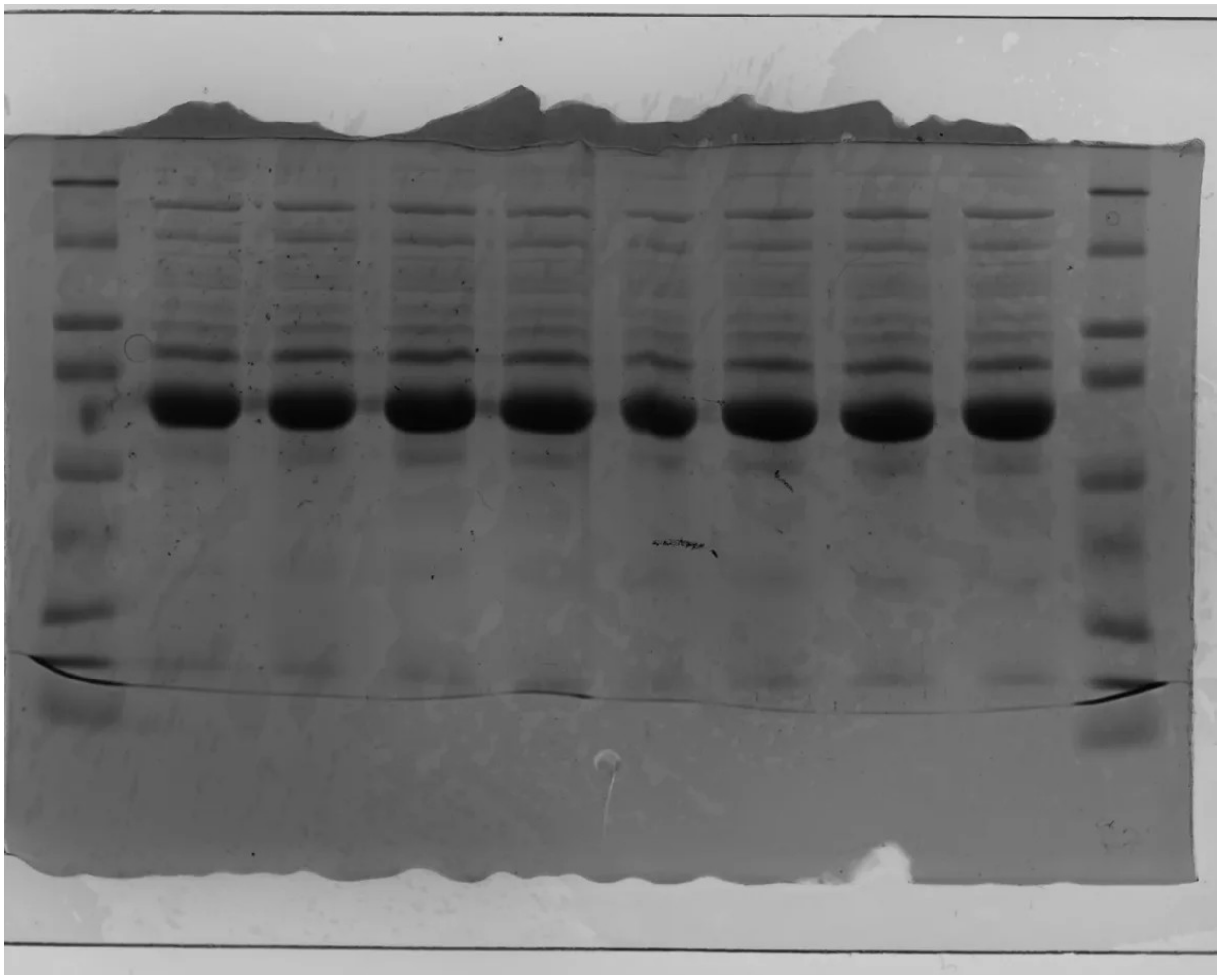


Рисунок Б.4 – Результат электрофореза белков плазмы крови

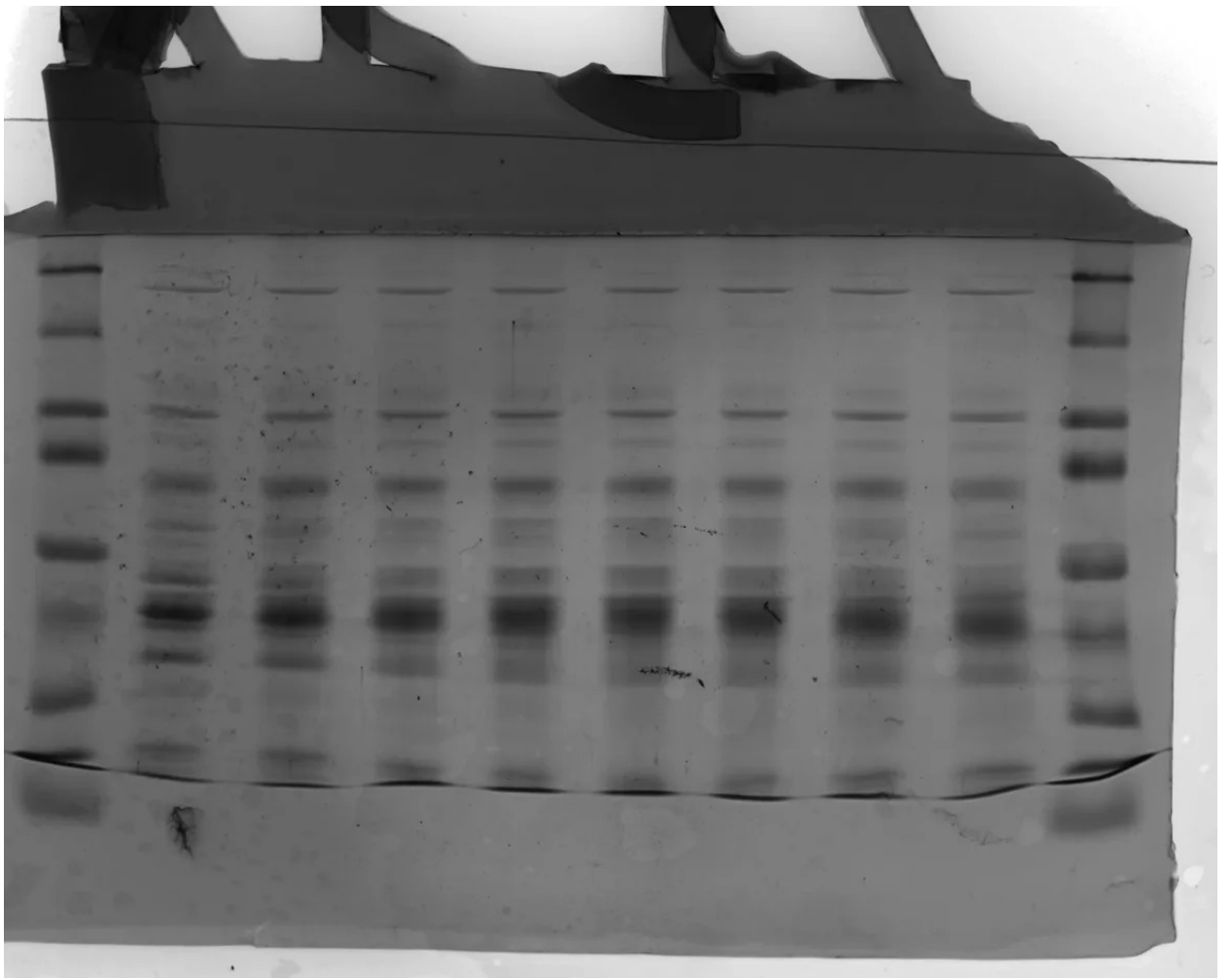


Рисунок Б.5 – Результат электрофореза белков мышц