Е.Н. Князев, О.Е. Чеботарева

ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ УЧЕБНАЯ ПРАКТИКА

I КУРС

Введение в биотехнологию,
клеточную и молекулярную биологию

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
«ВЫСШАЯ ШКОЛА ЭКОНОМИКИ»
Факультет биологии и биотехнологии

Е.Н. Князев, О.Е. Чеботарева

ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ УЧЕБНАЯ ПРАКТИКА

I КУРС

Введение в биотехнологию, клеточную и молекулярную биологию

Учебно-методическое пособие
для студентов и преподавателей

Третье издание, пересмотренное

Издательский дом
Высшей школы экономики
Москва 2026

УДК 57.08
ББК 28с
К54

https://elibrary.ru/avoctj

Рецензенты:

член-корр. РАН, д-р хим. наук, зам. директора по науке, главный научный сотрудник лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ РАН *И.В. Смирнов*;

канд. биол. наук, зав. лабораторией молекулярной патофизиологии НИИ молекулярной и клеточной медицины РУДН, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Медицинского института РУДН *П.А. Вишнякова*

Авторы:

Князев Е.Н. — канд. мед. наук, зав. лабораторией молекулярной физиологии факультета биологии и биотехнологии НИУ ВШЭ, доцент базовой кафедры Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Чеботарева О.Е. — аспирант, стажер-исследователь лаборатории исследований молекулярных механизмов долголетия факультета биологии и биотехнологии НИУ ВШЭ

К54 **Князев, Е. Н., Чеботарева, О. Е.** Профессиональная учебная практика: I курс. Введение в биотехнологию, клеточную и молекулярную биологию : учебно-методическое пособие для студентов и преподавателей / Е. Н. Князев, О. Е. Чеботарева ; Нац. исслед. ун-т «Высшая школа экономики». — 3-е изд., пересмотр. — М. : Изд. дом Высшей школы экономики, 2026. — 118 с. + 4 с. цв. вкл. — 150 экз. — ISBN 978-5-7598-4509-6 (в обл.). — ISBN 978-5-7598-4490-7 (e-book).

В пособии кратко изложены теоретические и практические аспекты первичных навыков, необходимых для работы в биологической лаборатории, а также приведены протоколы практических занятий в рамках профессиональной учебной практики (ознакомительной) I курса бакалаврской программы «Клеточная и молекулярная биотехнология» факультета биологии и биотехнологии НИУ ВШЭ.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов и преподавателей факультета биологии и биотехнологии НИУ ВШЭ и всех заинтересованных лиц.

УДК 57.08
ББК 28с

Первое и второе издания вышли под названием «Профессиональная учебная практика: I курс. Учебно-методическое пособие для студентов и преподавателей»

Опубликовано Издательским домом Высшей школы экономики
http://id.hse.ru

doi:10.17323/978-5-7598-4509-6

ISBN 978-5-7598-4509-6 (в обл.)
ISBN 978-5-7598-4490-7 (e-book)

© Князев Е.Н., Чеботарева О.Е., 2023
© Князев Е.Н., Чеботарева О.Е., 2026, с изменениями

Содержание

1. Техника пипетирования и взвешивания 5

1.1. Краткая история развития дозаторов 5
1.2. Типы лабораторных дозаторов 6
1.3. Техника пипетирования 9
1.4. Практическая часть занятия по технике пипетирования и взвешивания 20
1.5. Практическая часть занятия по технике пипетирования, разведения и спектрофотометрии 23

2. Приготовление стандартных буферов и работа с pH-метром 27

2.1. Понятие pH 27
2.2. Измерение pH 29
2.3. Практическая часть занятия по приготовлению калибровочных растворов и калибровке pH-метров 35

3. Приготовление буферных систем и определение буферной емкости 46

3.1. Буферные системы 46
3.2. Механизм действия буферных систем 50
3.3. Буферная емкость 51
3.4. Практическая часть занятия по приготовлению буферных систем и определению буферной емкости 53

4. Приготовление агарозных гелей и проведение ДНК-электрофореза 83

4.1. Электрофорез ДНК в агарозном геле 83
4.2. Выбор правильного процента мономера для формирования геля для электрофореза ДНК 85
4.3. Физические основы электрофореза ДНК 88
4.4. Методика электрофореза в агарозном геле 89
4.5. Практическая часть занятия по приготовлению агарозных гелей и проведению ДНК-электрофореза 93

5. Подсчет концентрации клеток в суспензии и определение их жизнеспособности с помощью счетной камеры Горяева или Нойбауэра 107

5.1. Камеры для подсчета количества клеток 107

5.2. Камера Горяева и работа с ней 108

5.3. Практическая часть занятия по работе со счетной камерой Горяева или Нойбауэра 112

1. ТЕХНИКА ПИПЕТИРОВАНИЯ И ВЗВЕШИВАНИЯ

1.1. Краткая история развития дозаторов

В XIX в. Луи Пастер изобрел стеклянные пипетки, которые сейчас носят его имя, для переноса жидкостей с минимизацией контаминации. Пастеровские пипетки изготавливались путем нагревания тонкой стеклянной трубки по ее центру, после чего две половины резко растягивались в противоположные стороны, отчего нагретая центральная часть вытягивалась и истончалась. После остывания трубка разламывалась по центру, в результате получались две пипетки с тонким капилляром на конце. Для изолирования внутренней полости трубки с широкого конца в нее вставляли кусочек ваты или аналогичного воздухопроницаемого материала. Изначально жидкость в пастеровскую пипетку втягивали ртом, однако для большей безопасности к широкой ее части стали прикреплять резиновую грушу или иное устройство, позволявшее безопасно засасывать жидкость в пипетку. Современные пастеровские пипетки изготавливаются из стекла или пластика, при необходимости имеют нанесенную шкалу, позволяющую отбирать известные объемы жидкости. Для пастеровских пипеток придуманы дозаторы, которые дают возможность набирать и вытеснять жидкость из пипетки вращением кольца или нажатием на кнопку одним пальцем.

В XX в. были изобретены компактные поршневые пипетки, которые помещались в одну руку и позволяли одним пальцем нажимать на кнопку поршня, вытесняя из пипетки определенный объем воздуха, а при помещении пипетки в жидкость и отпускании поршня соответствующий объем жидкости затягивался в пипетку. Первые такие дозаторы имели фиксированный объем, т.е. набирали всегда один и тот же объем жидкости, заложенный при изготовлении. Впоследствии были изобретены дозаторы с изменяемым объемом. Современные лабораторные дозаторы позволяют с большой точностью и аккуратностью набирать объемы вплоть до микролитров. Схема такого дозатора представлена на рис. 1 (см. вклейку).

1.2. Типы лабораторных дозаторов

Современные автоматические лабораторные дозаторы делятся на два основных типа — пипетки с принципами воздушного (air-displacement pipettes) и позитивного (positive-displacement pipette) вытеснения. В первом случае нажатие на поршень вытесняет из пипетки определенный объем воздуха, а при отпускании в наконечник пипетки засасывается соответствующий объем жидкости. Во втором случае поршень встроен прямо в сменный наконечник пипетки и непосредственно контактирует с набираемой жидкостью, т.е. набор и вытеснение жидкости из наконечника происходит не за счет воздуха, а благодаря движению поршня прямо внутри наконечника без прослойки воздуха. Характеристики этих типов пипеток представлены в табл. 1.

Таблица 1. Характеристики двух типов лабораторных дозаторов

Пипетки с принципом воздушного вытеснения	Пипетки с принципом позитивного вытеснения
Рекомендованы для водных растворов и общих лабораторных работ	Рекомендованы для неводных растворов, вязких, плотных, пенящихся, летучих, радиоактивных, едких, контаминированных, горячих, холодных жидкостей
Прослойка воздуха (мертвый объем) между поршнем пипетки и образцом жидкости	Прямой контакт поршня с образцом без прослойки воздуха
Поршень интегрирован в нижнюю часть пипетки и является ее постоянной частью	Поршень не интегрирован в пипетку, а является частью сменного наконечника

Иногда с помощью пипетки с принципом воздушного вытеснения приходится набирать летучие жидкости, например хлороформ или 96–100%-й спирт при выделении РНК. В этом случае при первом нажатии на поршень пипетки из наконечника происходит вытеснение определенного объема воздуха, а затем в наконечник набирается жидкость, которая начинает испаряться и создает повышенное давление внутри наконечника над поверхностью жидкости. Это приводит к тому, что жидкость начинает без нажатия на поршень вытекать из наконечника. Однако если повторно нажать

на поршень наконечника, вытеснив всю жидкость, то внутри наконечника останется воздух, насыщенный парами летучей жидкости, поэтому при повторном наборе жидкость уже не будет вытекать из наконечника. В связи с этим при работе с летучими жидкостями пипетками с принципом воздушного вытеснения первую порцию жидкости набирают и тут же сливают, а затем приступают к дозированию необходимого объема, при этом следует использовать сменные наконечники со встроенным фильтром, чтобы максимально изолировать воздух внутри корпуса пипетки от паров над жидкостью.

При вынужденной необходимости набора очень вязких жидкостей пипеткой с принципом воздушного вытеснения, например 100%-го глицерола, забор жидкости после отпускания поршня может происходить медленно, с временной задержкой, поэтому поршень нужно отпускать медленно и может потребоваться наконечник с расширенным отверстием (иногда наконечник срезают вручную на конце). Также следует помнить: для пипетки с принципом воздушного вытеснения производителем учитывается, что при наборе водного раствора воздух внутри пипетки становится разреженным и поршень должен перемещать объем воздуха на несколько процентов больше, чем объем жидкости. Однако при наборе жидкости с плотностью и вязкостью выше, чем у воды, разрежение будет сильнее и набираемый объем будет меньше необходимого (это можно решить, откалибровав пипетку с воздушным вытеснением под конкретный вязкий раствор, но гораздо проще использовать пипетки с позитивным смещением).

Еще одна проблема при работе с вязкими жидкостями с помощью пипетки с воздушным смещением заключается в том, что при нажатии на поршень пипетки после набора в наконечник вязкой жидкости при слишком быстром вытеснении воздуха происходит преимущественное вытекание жидкости вдоль центральной оси наконечника, а жидкость возле стенок наконечника задерживается, и когда в центре наконечника образуется канал, через который внутреннее воздушное пространство пипетки сообщается с внешним, то пипетка уже не позволит вытеснить оставшийся объем вязкой жидкости. В связи с этим при вынужденном использовании

пипетки с принципом воздушного вытеснения с вязкими жидкостями после набора жидкости ее дозирование производят очень медленным нажатием, чтобы вытеснять жидкость равномерно и вдоль стенок, а если вязкая жидкость при этом смешивается с каким-либо водным раствором, то стараются дополнительно несколько раз промыть наконечник изнутри от остатков вязкой жидкости многократным набором и спусканием водного раствора.

Помимо дозаторов с одним каналом существуют многоканальные пипетки, которые позволяют набирать одинаковый объем жидкости одновременно в несколько наконечников сразу. Такие пипетки могут иметь фиксированное расстояние между наконечниками, как правило приспособленное под стандартизованные 96-луночные планшеты, имеющие 8 рядов по 12 лунок, и в этом случае пипетки имеют 8 или 12 каналов. Также существуют модификации пипеток, которые позволяют самому менять расстояние между наконечниками, чтобы переносить жидкость в штативы различной конфигурации.

Лабораторные дозаторы также различаются по диапазону объемов жидкости, которые они могут дозировать с заданной производителем точностью. Номинальный объем пипетки указывает на максимальный объем жидкости, который можно набрать с помощью такой пипетки. Как правило, пипетки с принципом воздушного вытеснения производятся с номинальным объемом 2; 2,5; 10; 20; 100; 200 и 1000 мкл, а также 5 и 10 мл, встречаются пипетки с номинальным объемом 300 мкл, чаще в многоканальном исполнении. Наконечники для пипеток с воздушным вытеснением могут снабжаться встроенным фильтром для изолирования воздушного пространства пипетки от воздушной прослойки над набираемым образцом. Для объемов больше 10 мл чаще всего используются автоматические дозаторы для пастеровских пипеток, которые также работают за счет движения воздуха. Один и тот же объем жидкости можно набрать пипетками с разным диапазоном объемов. В общем случае, если имеется несколько дозаторов с разным номинальным объемом, при уверенности в качестве производства и точности текущей калибровки дозатора производители пипеток рекомендуют выбирать дозатор с номинальным объемом, максимально близким

к объему жидкости, который необходимо перенести с помощью дозатора.

Для пипеток с принципом позитивного вытеснения чаще характерны номинальные объемы 10, 25, 50, 100, 250 и 1000 мкл. Как правило, пипетки с принципом позитивного вытеснения имеют встроенную функцию степпера, т.е. после набора необходимого объема жидкости в наконечник они могут последовательно дозировать определенную долю этого объема жидкости при каждом нажатии на кнопку, управляющую поршнем. Реже встречаются степперы с принципом воздушного вытеснения.

Точность набора жидкости может зависеть от набираемого объема, техники, скорости набора и дозирования жидкости, она может отличаться между экспериментаторами и даже для одного экспериментатора в течение дня и в разные дни. Для минимизации этих различий могут использоваться электронные пипетки, которые позволяют добиться большего уровня стандартизации за счет автоматизированного механизма, набирающего и дозирующего жидкость. Именно так работают и уже упоминавшиеся дозаторы с функцией степпера.

1.3. Техника пипетирования

1.3.1. Соблюдение эргономики при работе с дозаторами

Многие факторы могут влиять на точность дозирования, поэтому необходимо обеспечить соблюдение эргономики при регулярной работе с дозаторами в лаборатории. Несоблюдение эргономики может приводить к неточному дозированию и вреду для здоровья, например развитию так называемых травм повторяющихся нагрузок, таких как туннельный синдром, тендинит, бурсит и т.п. Поэтому необходимо выполнять следующие требования.

Сохраняйте правильную позу:

1) сохраняйте торс и шею на одной линии;

2) старайтесь сохранять расстояние между глазами и пипеткой примерно по длине вашего предплечья, чтобы не переразгибать руки;

3) не сгибайте и не выворачивайте руку в лучезапястном суставе при работе с пипеткой;

4) держите пипетку расслабленным хватом, не сжимайте кисть чрезмерно;

5) держите спину прямо, при необходимости поднять что-то тяжелое приседайте и поднимайте ногами вместо наклона и поднятия за счет разгибания спины;

6) старайтесь выполнять работу с пипетками в сидячем нежели стоячем положении, избегайте длительного стояния без перерыва;

7) садитесь близко к краю стола и обеспечьте достаточное пространство для ваших коленей под столом;

8) подберите высоту сидения относительно стола так, чтобы вам не приходилось тянуться руками вверх или, наоборот, сгибаться над столом;

9) при возможности фиксируйте локти на опоре;

10) при наличии спинки у сидения опирайтесь на нее.

Подберите правильное оборудование:

1) используйте пипетки для того типа жидкостей, с которыми работаете;

2) по возможности используйте те дозаторы, которые вам удобнее держать;

3) по возможности используйте соответствующие друг другу дозаторы и наконечники, чтобы гарантировать точность и исключить необходимость приложения излишней силы при использовании наконечников;

4) по возможности при большом запланированном объеме повторяющихся монотонных движений с использованием пипетки используйте электронные моторизованные пипетки;

5) по возможности используйте низкие штативы, сосуды и мусорные контейнеры, чтобы при работе не приходилось поднимать руки высоко.

Обеспечьте комфортное рабочее место:

1) обеспечьте достаточное освещение комнаты и рабочего места;

2) по возможности работайте в тихом окружении, без стресса;

3) организуйте свое рабочее место так, чтобы вы легко могли достать до часто используемых расходников и оборудования;

4) делайте перерыв от повторяющихся движений примерно каждые 20 мин, постарайтесь адаптировать протокол под эти перерывы;

5) старайтесь менять рабочие задачи, чередовать их, чтобы уменьшить монотонно повторяющиеся действия.

Далее рассмотрена непосредственно техника работы с дозаторами.

1.3.2. Выставление объема и присоединение наконечника

На корпусе или кнопке поршня современной лабораторной пипетки указан диапазон объемов, который она может дозировать. На корпусе пипетки также расположено окошко с цифрами, где указывается текущий объем, на который настроена пипетка. Изменение объема осуществляется в зависимости от конструкции вращением кнопки поршня или специального кольца на корпусе пипетки. У пипетки есть определенный запас хода за пределами указанного на ней диапазона, однако при попытке с силой прокрутить регулятор объема за пределы этого запаса настройка пипетки будет сбита и ее придется отдавать на обслуживание и калибровку. Также регулятор объема пипетки может быть оснащен системой блокировки, препятствующей случайному изменению объема, в этом случае следует перед изменением объема снять эту блокировку, а после выбора необходимого объема — снова заблокировать вращение. В электронных пипетках объем чаще всего отображается на дисплее и меняется с помощью кнопок.

Для обеспечения более точного дозирования производители рекомендуют всегда заканчивать выставление объема вращением регулятора объема по часовой стрелке, т.е. в сторону уменьшения. Если нужно уменьшить объем, выставленный на пипетке, то мы просто аккуратно уменьшаем объем вращением регулятора по часовой стрелке, внимательно следя, чтобы не проскочить нужное значение. Если же необходимо увеличить объем, выставленный на пипетке, то мы вращаем регулятор против часовой стрелки, доходим до нужного значения и делаем еще примерно 1/3 оборота регулятора против часовой стрелки, а затем начинаем аккуратно вращать регу-

лятор по часовой стрелке, уменьшая объем до нужного нам значения. Уже упомянутый небольшой запас хода за пределами номинального (максимального) объема пипетки позволит соблюдать такую методику даже при выставлении максимального для пипетки объема.

Также для более точного выставления объема производители рекомендуют держать пипетку горизонтально и смотреть одним глазом ровно на середину числа, указывающего объем, перпендикулярно оси пипетки, чтобы точно сопоставить числа на вращающейся конструкции с указателем на корпусе пипетки и избежать влияния эффекта параллакса.

После выставления объема (и блокировки его регулятора, если таковой имеется в конструкции пипетки) к дозатору присоединяется наконечник. Лучше, если номинальный объем наконечника соответствует номинальному объему дозатора, однако в ряде случае при вынужденной необходимости можно произвести замену (табл. 2).

Некоторые производители изготавливают наконечники и дозаторы по собственному стандарту, однако большинство следуют универсально принятым стандартам, что позволяет сочетать наконечники и дозаторы разных фирм. В случае вынужденной необходимости, при отсутствии наконечников нужного размера в наличии, можно использовать наконечники с номинальным объемом, не соответствующим номинальному объему дозатора. Как указано в табл. 2, некоторые наконечники меньшего размера подходят для дозаторов большего объема, если не превышать номинальный объем наконечника, например, с пипеткой 200 мкл можно использовать наконечники на 20, 30 и 100 мкл. При этом в сравнении с пипеткой на 200 мкл дозаторы на 20 и 100 мкл имеют более вытянутый конец, поэтому их можно использовать с наконечниками на 200 мкл только без фильтра, иначе они продавят фильтр своим длинным концом. Наконец существуют менее распространенные номинальные объемы наконечников — 300 и 1250 мкл, которые подходят к дозаторам с номинальным объемом 200 и 1000 мкл соответственно.

Чтобы присоединить наконечник к дозатору, нужно держать дозатор вертикально, посадочный конус дозатора опускается в наконечник в штативе и с небольшим усилием вжимается в него. Если наконечники какого-то производителя недостаточно хорошо