

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КРЕМЕНЧУЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ МИХАЙЛА ОСТРОГРАДСЬКОГО



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ЩОДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
З НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
«ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ ТА КОРЕКЦІЯ ГЕНОФОНДУ ПОПУЛЯЦІЙ»
ДЛЯ СТУДЕНТІВ ДЕННОЇ ФОРМИ НАВЧАННЯ
ЗІ СПЕЦІАЛЬНОСТІ 101 – «ЕКОЛОГІЯ»
ОСВІТНЬО-ПРОФЕСІЙНОЇ ПРОГРАМИ «ЕКОЛОГІЧНА
БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА БІОЕНЕРГЕТИКА»

КРЕМЕНЧУК 2018

Методичні вказівки щодо виконання лабораторних робіт з навчальної дисципліни «ДНК-технології та корекція генофонду популяцій» для студентів денної форми навчання зі спеціальності 101 – «Екологія» освітньо-професійної програми «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Укладачі: к. т. н., доц. А. В. Пасенко
ст. викладач О. О. Никифорова

Рецензент: к. б. н., доц. О. І. Антонова

Кафедра біотехнологій та біоінженерії

Затверджено методичною радою Кременчуцького національного університету імені Михайла Остроградського

Протокол №__ від_____ 2018 р.

Голова методичної ради

проф. В. В.Костін

ЗМІСТ

ВСТУП.....	Помилка! Закладку не визначено.
ПЕРЕЛІК ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ.....	7
Лабораторна робота № 1.....	7
Тема. Забір, транспортування і зберігання біологічного матеріалу.....	7
Лабораторна робота № 2.....	13
Тема. Екстракція ДНК з біологічного матеріалу	13
Лабораторна робота № 3.....	Помилка! Закладку не визначено.
Тема. Ампліфікація ДНК.....	Помилка! Закладку не визначено.
Лабораторна робота № 4.....	23
Тема. Репарація ДНК	23
Лабораторна робота № 5.....	29
Тема. Рестрикційний аналіз ДНК.....	29
Лабораторна робота № 6.....	37
Тема. Методи аналізу на основі ДНК-маркерів.	37
КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ ЗНАНЬ СТУДЕНТІВ	44
ЛІТЕРАТУРА	46

ВСТУП

Предметом вивчення навчальної дисципліни «ДНК-технології та корекція генофонду популяцій» є молекулярні явища і процеси, які дозволяють на генетичному рівні ідентифікувати, модифікувати організми, діагностувати їх генетичні зміни та цілеспрямовано трансформувати геном з метою профілактики та лікування хвороб.

Метою викладання навчальної дисципліни «ДНК-технології та корекція генофонду популяцій» є ознайомлення студентів спеціальності 101 «Біотехнологія» освітньо-професійної програми «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» з принципами та методологією ДНК-технологій, що використовують для вирішення прикладних завдань у виробництвах екологічної біотехнології, медичній екології та інших галузях господарства.

Основними завданнями вивчення дисципліни «ДНК-технології та корекція генофонду популяцій» є:

- отримання знань щодо основних сучасних ДНК-технологій;
- формування основних уявлень про основи ДНК-технологій, принципи та підходи щодо ідентифікування, модифікування, діагностування, спрямованого трансформування геному;
- формування базових знань з методології отримання рекомбінантних ДНК, клонування фрагментів ДНК, створення нових організмів, гібридизації, трансгенозу, ідентифікації генів, молекулярної діагностики, генно-терапевтичних підходів щодо лікування захворювань;
- формування знань та уявлень щодо застосування ДНК-технологій (наукові дослідження, промисловість, сільське господарство, медицина, ветеринарія, спорт, екологія, криміналістика та ін.) та вирішення нагальних прикладних завдань сучасності;
- ознайомлення зі складовими біотехнологій ДНК-технологій: біоагентами, біооб'єктами, біопроцесами, біологічним інструментарієм, субстратами, продуктами й обладнанням;

- формування у студентів теоретичної бази професійної підготовки щодо вільного орієнтування у вирішенні практичних задач в біотехнології із застосуванням ДНК-технологій;

- формування у студентів наукового практичного світогляду, аналітичного мислення, які сприятимуть вирішенню глобальних проблем сьогодення: екологічних, енергетичних, продовольчих, біобезпеки та охорони здоров'я людини шляхом впровадження новітніх ДНК-технологій.

Згідно з вимогами освітньо-професійної програми студенти повинні:

знати:

- теоретичні основи ДНК-технологій;
- основні біохімічні принципи, що покладені в основу ДНК-технологій;
- методологію одержання рекомбінантних ДНК, клонування фрагментів ДНК, гібридизації, ідентифікування, модифікування, трансгенезу, діагностування, спрямованого трансформування геному;
- прикладні аспекти ДНК-технологій;
- основні напрями та перспективи сучасної біотехнології ДНК-технологій.

вміти:

- використовувати теоретичні знання при реалізації ДНК-технологій;
- застосовувати методологічну базу генетики, молекулярної біології, біологічної хімії, мікробіології при вирішенні прикладних завдань медичної, екологічної, сільськогосподарської, ветеринарної, спортивної та правової галузей з використанням ДНК-технологій;
- застосовувати біотехнологічні прийоми одержання рекомбінантних ДНК, клонування фрагментів ДНК, модифікування, ДНК-маркування, генетичного ідентифікування, трансгенезу, створення нових організмів;
- проводити молекулярно-генетичні дослідження організмів, біоматеріалів, генетичне діагностування та генну терапію соціально вагомих спадкових захворювань людини;
- корегувати геном популяцій тварин, рослин;
- модифікувати геном організмів з господарсько-цінними ознаками;

- проводити ДНК-аналіз та прогнозувати генетично обумовлену фізіологічну, анатомічну конституцію організмів, їх очікувані спортивні можливості та фізичні якості;

- застосовувати ДНК-технології в експертно-криміналістичній практиці для ідентифікація особин: ДНК-дактилоскопія, судова ботаніка, судова зоологія;

- створювати електронні бази ДНК-кодів доступних видів організмів для виявлення та збереження біорізноманіття біоти екосистем;

- культивувати клітини різних організмів, розробляти склад живильних середовищ, обирати оптимальні умови, інструментарій та обладнання для реалізації ДНК-технологій;

- проводити аналіз і прогнозувати наслідки реалізації ДНК-технологій у різних галузях господарства;

- моделювати та впроваджувати ДНК-технології у різні сфери соціального, побутового та виробничого секторів для вирішення актуальних прикладних завдань людства.

Звіт до лабораторної роботи повинен включати в себе такі елементи: тема, мета роботи; обладнання; початкові елементи, якими має володіти студент; короткі та лаконічні відповіді на контрольні питання; зарисовки у лабораторному альбомі відповідно до поставлених у роботі завдань.

ПЕРЕЛІК ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Лабораторна робота № 1

Тема: Забір, транспортування і зберігання біологічного матеріалу

Мета: вивчити методики забору, транспортування та зберігання біологічного матеріалу, визначити умови, яких необхідно дотримуватися при відборі проб та послідовність дій при роботі з ними.

Навчальні елементи:

Короткі теоретичні відомості

Вихідний етап всіх молекулярно-біологічних досліджень – це отримання зразків ДНК і РНК. Джерелом геномної ДНК можуть бути будь-які клітини, що містять ядро. В практиці молекулярної біології найчастіше використовують епітеліальні або букальні клітини щоки, лейкоцити і епітеліальні клітини волосяної цибулини (при необхідності довготривалого транспортування біоматеріалу). Можливість проведення молекулярно-біологічного аналізу з невеликою кількістю легко доступного біоматеріалу є методичною перевагою методів даної групи. Виділена ДНК однаково придатна для проведення різноманітних досліджень і може довго зберігатися в замороженому виді.

1. Зішкріб букального епітелію (букальний зішкріб)

Після гігієни порожнини рота проводять ретельне протирання одноразовим стерильним зонд-тампоном (тупфером або свабом) внутрішніх щічних поверхонь. Процедура зішкрібу триває 2–3 хв. При цьому слід уникати контакту зонда з зубами, оскільки на них присутня мікрофлора.

Після відбору проби вісь зонда відділяють від тампону, залишаючи його зі зразком в пронумерованій стерильній мікропробірці. Подібна технологія дозволяє здійснювати транспортування, зберігання і центрифугування проби в первинній мікропробірці, що значно спрощує процедуру пробопідготовки, а також забезпечує економію місця при транспортуванні проби.

Також використовують стерильні мікропробірки зі специфічним транспортним середовищем, яке містить компоненти, що пригнічують ріст

мікроорганізмів обсягом 300 мкл. У цьому випадку активним взобовуванням клітини переводять з поверхні зонда в транспортну рідину.

Проби до екстракції ДНК зберігають при 20 °С.

Букальний зішкріб – найбільш гігієнічний спосіб забору букальних клітин, проте їх виходить значно менше, ніж при змивах за допомогою фізіологічного розчину.

Останньою розробкою для здійснення букального зішкрібу є спеціальний пристрій «EasiCollect™». При виконанні зішкрібу, букальні клітини захоплюються губчастим аплікатором і потім переносяться на індикаторну карту FTA. Карта FTA просочена спеціальним буфером, який лізує клітини і руйнує білки при контакті. ДНК, навпаки, захищається від руйнування мікробами і впливом факторів зовнішнього середовища. Індикаторні FTA карти пофарбовані рожевим барвником, який стає білим при контакті з біологічним зразком (слиною). Таким чином, зазначається місце знаходження зразку. Для використання індикаторних FTA карт достатньо нанести біологічний зразок на карту і просушити її при кімнатній температурі. ДНК, пов'язана з FTA папером, придатна для подальшого аналізу.

2. Змив букального епітелію (букальний змив)

Після гігієни порожнини рота проводять інтенсивне, з використанням язика, полоскання рота 8–10 мл ізотонічним розчином хлориду Na (фізіологічним розчином) з додаванням 2 мМ антикоагулянта ЕДТА. Процедура триває 1 хв. Після полоскання рота, розчин акуратно (без утворення бульбашок) через колектор зливається назад в пронумеровану стерильну пробірку.

Проби з біологічним матеріалом зберігають при 20°С до екстракції ДНК. Слід зазначити, що ДНК з такого біоматеріалу необхідно виділяти як можна швидше в зв'язку з наявністю в ньому багатої мікрофлори, яка призводить до деградації ДНК. Істотні недоліки такого способу забору клітин – це висока вірогідність контамінації (змішування) біопроб, а також незручності, що виникають при зливанні суміші фізіологічного розчину і слинної рідини назад у колектор.

3. Забір венозної крові (венопункція)

Венозна кров, з якої отримують лейкоцити (у зрілих еритроцитах ядра не містяться), є пріоритетним біоматеріалом для подальшого проведення молекулярно-біологічного аналізу. У нормі вона не містить мікрофлори і з неї отримують достатню кількість лейкоцитів.

Капілярна кров, хоча і містить невелику кількість лейкоцитів, її забір все ж не є ефективним способом отримання достатньої кількості клітин, що містять ядра.

Забір крові проводиться натще з ліктьової вени одноразовим шприцем об'ємом 5 мл з голкою діаметром 0,8–1,1 мм. Після забору, кров зі шприца акуратно (без утворення піни) переноситься в пронумеровану стерильну пробірку з антикоагулянтом (6 % розчин ЕДТА у співвідношенні 1:19 або 3,8 % розчин цитрату Na у співвідношенні 1:9, гепарин в якості антикоагулянта використовувати не можна). Найкращим способом виконання процедури венопункції є застосування вакутайнера – системи вакуумного забору венозної крові. Пробірка вакутайнера повинна містити антикоагулянти: ЕДТА (пробірка має кришку бузкового коліру) або цитрат Na (пробірка має кришку блакитного коліру).

Після здійснення венопункції одним з вищеписаних способів, пробірка перевертається кілька разів (для перемішування з антикоагулянтом). Пробірку з кров'ю до дослідження зберігають у холодильнику при +4 – +8 °С (бажано не більше двох діб). Можна виділити з крові лейкоцити, заморозити їх і періодично використовувати їх порції для екстракції з них ДНК.

4. Амніоцентез

Для отримання зразка ДНК розвиваючогося плоду людини, використовують процедури амніоцентезу, кордоцентезу та біопсії хоріону, які складають основу пренатальної генетичної діагностики, або преімплантаційної генетичної діагностики – ПГД (англ. pre-implantation genetic diagnosis – PGD або PIGD). ПГД проводиться з метою отримання біоматеріалу, екстракції з нього ДНК та її аналізу. ПГД необхідна для виявлення та профілактики

хромосомних хвороб, носійства хромосомних аномалій, а також моногенних хвороб.

Амніоцентез (англ. amniocentesis або amniotic fluid test – AFT) представляє собою інвазивну процедуру, яка полягає в пункції амніотичної оболонки з метою отримання амніотичної рідини (навколоплідних вод) для подальшого лабораторного дослідження.

У амніотичній рідині знаходяться клітини плоду, що представляють собою частинки епітелію, які містять повний хромосомний набір майбутньої дитини. Після забору біоматеріалу з амніотичної рідини виділяються клітини плоду і поміщаються в спеціальне живильне середовище, де відбувається їх розмноження. Отримавши потрібну кількість біоматеріалу, фахівці проводять екстракцію з нього ДНК, а потім всі необхідні дослідження. Дана процедура вимагає значних витрат часу і може тривати від 3 до 6 тижнів.

Амніоцентез дозволяє виявити порушення в ДНК і визначити правильність розвитку плоду. Передумовами для призначення діагностичного заходу є наявність аномалій хромосомного набору і спадкових захворювань у членів сім'ї майбутньої дитини, а також можлива генетична схильність плода до розвитку проблем спинного і головного мозку. До групи ризику відносяться вагітні жінки, чий вік перевищує 35-річний рубіж. Крім цього, дослідження амніотичної рідини призначається при отриманні негативних результатів ДНКтестів крові. В цьому випадку амніоцентез дозволяє отримати найбільш достовірні дані, що свідчать про стан плода. Дослідження амніотичної рідини дає можливість виявити такі серйозні захворювання, як хвороба Дауна, синдром Клайнфельтера і синдром Тернера. Якщо у фахівців є дані про наявність у одного з батьків патології генетичного розвитку, проводиться аналіз на предмет даного захворювання. Крім цього, в ході проведення пренатальної діагностики вдається виявити фенілкетонурію, гемофілію та муковісцидоз. Крім виявлення генетичних порушень, справжнє дослідження дозволяє встановити стать майбутньої дитини. Проведення тесту дає можливість отримати найбільш достовірні результати. Медична статистика стверджує, що

ступінь точності при виконанні амніоцентезу становить приблизно 99,4 %.

Амніоцентез можна виконувати в першому, другому і третьому триместрах вагітності (оптимально – в 16–20 тижнів вагітності). Найчастіше діагностика проводиться на 16 тижні вагітності, після проведення УЗД, що дозволяє визначити найбільш безпечно для плода місце забору амніотичної рідини.

Для проведення амніоцентезу необхідно близько 45 хв. Процедура виконується під місцевим наркозом. Під ультразвуковим контролем вибирають місце пункції. Пункцію переважно проводять внеплацентарно, у вільній від петель пуповини найбільшій кишені. Якщо голку необхідно ввести трансплацентарно, вибирають найбільш тонку ділянку плаценти, що не має розширених межворсінкових просторів. Амніоцентез проводять за допомогою голок, які мають діаметр 18–22 G. Технічно амніоцентез виконують методом «вільної руки» або з використанням пункційного адаптера, розміщеного на конвексному абдомінальному датчику. Його використання дозволяє контролювати траєкторію руху і глибину занурення пункційної голки за допомогою траси на екрані монітора. Переконавшись в тому, що голка після пункції розташована в порожнині плідного міхура, з неї витягують мандрен, приєднують шприц і аспірують необхідну кількість амніотичної рідини. Після цього в просвіт голки знову поміщають мандрен і видаляють її з порожнини матки. Після закінчення процедури здійснюють оцінку стану плода – наявність і частоту його серцебиття.

Під час проведення процедури, больові відчуття відсутні, проте деякі вагітні жінки відчувають тиск в момент забору рідини з матки.

Після виконання амніоцентеза жінці необхідний спокій. Протягом декількох годин вона повинна уникати серйозних фізичних навантажень.

При проведенні амніоцентезу можливий розвиток ускладнень, але у більшості випадків їх не виникає. Даний захід може стати причиною викидня, однак ризик становить менше 1 %. Після виконання забору біоматеріалу в деяких випадках у вагітних жінок спостерігаються кровотечі і судоми, а також

незначна втрата рідини. Крім цього, до ускладнень після амніоцентезу відносяться інфекційне зараження, нанесення ушкоджень плоду голкою і змішування крові при наявності у матері і дитини різних груп крові. Факторами, що збільшують ризик виникнення ускладнень, є ожиріння і перенесені вагітною раніше операції на черевній порожнині.

Абсолютними протипоказаннями для проведення дослідження є наявність у матері гострих запальних процесів або загострення хронічних захворювань.

При виконанні амніоцентезу в третьому триместрі вагітності рекомендують виконання моніторного спостереження за станом і рухами плоду, яке триває на протязі всієї процедури. При необхідності вагітній жінці може бути призначена зберігаюча, антибактеріальна або інтраопераційна терапія.

5. Кордоцентез

Кордоцентез (англ. cordocentesis або percutaneous umbilical cord blood sampling – PUBS) представляє собою інвазивну процедуру отримання пуповинної або кордової крові плода для подальшого лабораторного дослідження, яка зазвичай проводиться паралельно процедурі амніоцентезу. Кордоцентез проводиться не раніше 18 тижнів гестації. Після проведення інфільтраційної анестезії, під ультразвуковим контролем, через передню черевну стінку вагітної жінки роблять прокол тонкою пункційною голкою. Після того, як голка опиняється у суді пуповини, отримують до 5 мл крові.

6. Біопсія хоріону (хоріонбіопсія)

Біопсія хоріону (хоріонбіопсія) (англ. chorionic villus sampling – CVS) представляє собою інвазивну процедуру отримання зразка тканини хоріона для подальшого лабораторного дослідження. Основні переваги хоріонбіопсії – це виконання діагностики в ранні терміни вагітності, швидкість отримання результату (в середньому 2–3 дні), ДНК-діагностика захворювання і можливе визначення статі плоду.

Тканина хоріона, в основному, має ту ж генетичну структуру, що і плід,

тому також придатна для проведення генетичної діагностики. Достатній обсяг тканин хоріона дорівнює 10–15 мг. Частота отримання необхідної кількості плодового матеріалу – 94–99,5 %.

Отримання тканини хоріона здійснюють шляхом пункції матки через передню черевну стінку (трансабдомінальна хоріонбіопсія) або через піхву і шийку матки (трансцервікальна хоріонбіопсія) біопсійними щипцями або аспіраційним катетером. Вибір методу залежить від особливостей розташування хоріона в матці.

Хід роботи

Завдання 1. Описати процедуру виконання букального зішкрібу.

Завдання 2. Надати методику виконання процедури кордоцентезу.

Контрольні питання

1. Яким чином здійснюється процедура букального зішкрібу?
2. Які відомі варіанти букального зішкрібу?
3. Які умови висуваються для забору венозної крові?
4. Що таке амніоцентез?
5. Що представляє собою хоріонбіопсія?

Література: [1–31].

Лабораторна робота № 2

Тема: Екстракція ДНК з біологічного матеріалу

Мета: вивчити методику екстракції ДНК з букального епітелію та лейкоцитів крові.

Навчальні елементи:

Короткі теоретичні відомості

1. Екстракція ДНК з букального епітелію сорбентним методом

Сорбентний метод застосовується для виділення ДНК з епітеліальних клітин, отриманих за допомогою букального зішкрібу.

ДНК виділяють сорбентним методом відповідно з доданою до відповідного комплекту інструкцією щодо застосування. Мікропробірки з

пробами (містять зішкріблені клітини і транспортне середовище) центрифугують протягом 10 хв при 12000 об/хв. Супернатант видаляють вакуумним аспіратором з використанням окремого наконечника, а до осаду додають 300 мкл лізуючого розчину. Далі проби ретельно перемішують на вортексі і встановлюють до термостату на 5 хв при 65 °С. Лізат центрифугують протягом 5 хв при 12000 об/хв. Супернатант забирають окремим наконечником і переливають у нові маркировані пробірки, що містять 20 мкл ресуспендованого сорбенту. З сорбентом перемішують на вортексі, залишають на 2 хв на штативі, потім знову перемішують і залишають на 5 хв. Далі проби центрифугують протягом 30 сек при 5000 об/хв, супернатант видаляють вакуумним аспіратором з використанням окремого наконечника, а до осаду додають 500 мкл відмивного розчину і перемішують на вортексі. Після цього проби центрифугують протягом 30 сек при 10000 об/хв, супернатант видаляють вакуумним аспіратором з використанням окремого наконечника, і відмивання повторюють. Супернатант після відмивання видаляють повністю, а мікропробірки з відкритими кришками встановлюють до термостату на 10 хв при 65 °С до повного просушування сорбенту, що містить очищену ДНК. Потім в пробірки додають 50-100 мкл ТЕ-буфера для елюції ДНК, перемішують на вортексі і поміщають до термостату при 65 °С на 5 хв, періодично струшуючи на вортексі.

Мікропробірки центрифугують при 12000 об/хв протягом 1 хв, після чого супернатант містить ДНК, готову до постановки ПЛР. Мікропробірки з ДНК зберігають при 20°С або при більш низьких температурах у холодильниках та автоматичних системах біобанкінгу.

Постійне розморожування розчину з ДНК для подальшої роботи з нею, призводить до її деградації. Тому відразу після екстракції ДНК загальний розчин необхідно розділити на різні частини (розаліквотити) і розморожувати тільки окремі аліквоти. Термін придатності проб ДНК, виділених сорбентним методом, при дотриманні умов зберігання становить не менше 1 року.

2. Виділення ДНК з букального епітелію методом лужної екстракції

Метод лужної екстракції ДНК застосовують у разі використання в якості біоматеріалу букального епітелію, отриманого за допомогою змиву.

Вміст пробірок з сумішшю фізіологічного розчину і слинної рідини зливають у пронумеровані 1,5-міліметрові мікропробірки для накопичення клітин букального епітелію.

Для цього клітини осаджують центрифугуванням протягом 10 хв при 12000 об/хв, а супернатант видаляють в колбу-пастку, використовуючи вакуумний відсмоктувач і окремий наконечник для кожної проби. При необхідності цю процедуру повторюють 2–3 рази (для достатнього накопичення клітин). До осаду додають 1 мл фізіологічного розчину, що містить 10 мМ ЕДТА, і перемішують на вортексі. Після подальшого центрифугування проб протягом 10 хв при 12000 об/хв супернатант видаляють вакуумним відсмоктувачем, а до осаду додають 0,5 мл 20 мМ NaOH. Далі проби ретельно перемішують на вортексі і встановлюють у твердотільний термостат на 20 хв при температурі 95 °С.

Після охолодження проби центрифугують протягом 10 хв при 12000 об/хв для осадження білків і продуктів розпаду клітин. Супернатант з розчищеною в ньому ДНК забирають окремим наконечником і переливають у нові маркеровані пробірки. Для нейтралізації лужного розчину з ДНК в проби додають 4 мкл 1М HCl. Після закінчення цієї процедури проби готові до постановки ПЛР. Термін придатності проб ДНК, виділених методом лужної екстракції, при дотриманні умов зберігання становить не менше 5 років.

3. Екстракція ДНК з лейкоцитів крові сорбентним методом

Сорбентний метод також може застосовуватися для виділення ДНК із лейкоцитів після взяття венозної крові.

У цьому випадку ДНК виділяють сорбентним методом відповідно з доданою до відповідного комплексу інструкцією щодо застосування. Комплект відрізняється наявністю додаткового відмивного розчину. У зв'язку з цим

виділення ДНК з лейкоцитів крові аналогічно процедурі, описаній вище, але доповнюється промиванням за допомогою додаткового відмивного розчину.

В справжній час виділення ДНК з отриманих біологічних зразків є автоматичним процесом завдяки існуванню автоматичних систем (станцій або роботів) екстракції і очищення нуклеїнових кислот, які максимально знижують ймовірність контамінації біоматеріалу.

Принцип дії даних систем заснований на *методі приципітації (осадження) з утворенням супернантанту і приципітату (осаду)*. Реакції за участю нуклеїнових кислот часто вимагають точних відомостей про кількість і чистоту препарату. Тому після екстракції проводять кількісний аналіз нуклеїнових кислот – визначення концентрації ДНК або РНК в суміші або чистому препараті.

Для кількісного аналізу застосовують методи спектрофотометрії і флуориметрії.

Спектрофотометрія – це фізико-хімічний метод дослідження розчинів і твердих речовин, заснований на вивченні спектрів поглинання в ультрафіолетовій (200–400 нм), видимій (400–760 нм) та інфрачервоній (>760 нм) областях спектру. Нуклеїнові кислоти певним чином поглинають ультрафіолет. У спектрофотометрах зразок піддається дії ультрафіолету з довжиною хвилі 260 нм, а фотодетектор вимірює кількість світла, що пройшло через зразок. Чим більше світла поглинено, тим вище концентрація нуклеїнової кислоти у зразку.

Флуориметрія (флуорисцентний аналіз) – це визначення концентрації речовини за інтенсивністю флуоресценції, що виникає при опроміненні речовини УФ-променями. За відповідних умов цим шляхом можна виявити наявність незначних кількостей речовини.

Процес підготовки реакційних сумішей для постановки ПЛР або процес підготовки бібліотек для NGS-секвенування, відносяться до рутинних процедур. Тим не менш, від точності і якості організації даного етапу пробопідготовки безпосередньо залежить результат подальших експериментів.

Таким чином, вкрай важливо використовувати автоматичні рішення для етапів дозування рідини.

Хід роботи

Завдання 1. Провести виділення ДНК за методикою.

Кроки 1, 2: Збір і лізис клітин

1. Взяти пробірку 15 мл, налити в неї 3 мл води.
2. Тому, чия ДНК буде визначатися необхідно обережно покусувати внутрішні поверхні щік протягом 30 секунд. НЕ ТРЕБА кусати щоки до крові!
3. Набрати воду з 15 мл пробірки в рот і ретельно полоскати його протягом 30 секунд. Не ковтати воду!
4. Акуратно виплюнути воду назад в пробірку.
5. Використовуючи чисту одноразову пластикову піпетку, додати 2 мл буфера для лізису в вашу пробірку.
6. Закрутити пробірку кришкою і акуратно перевернути пробірку 5 разів.

Не струшуйте пробірку!

Крок 3: видалення білків

1. Використовуючи чисту одноразову пластикову піпетку, додати 5 крапель протеази до зразка.
2. Закрити пробірку і кілька разів перевернути її, щоб перемішати вміст.
3. Помістити пробірку в склянку на водяну баню, нагріту до 50 °С, на 10 хвилин. Після закінчення цього часу вийняти пробірку.

Кроки 4 і 5: ДНК стає видимою

1. Наповнити одноразову пластикову піпетку холодним спиртом. Тримаючи пробірку з вашим зразком під кутом 45 °С, додати туди 10 мл спирту так, щоб він повільно стікав по стінці пробірки.
2. Загвинтити кришку на пробірці.
3. Поставити пробірку прямо перед вами в стакан або штатив і залиште її на 5 хвилин, не чіпаючи.
4. Через 5 хвилин знову подивіться на пробірку.
5. Повільно переверніть пробірку 5 разів, щоб прискорити процес.

Завдання 2. За результатами експерименту заповнити таблицю.

Кроки 1 та 2. Збір та лізис клітин.

Що робили?	Що спостерігали? (результати)	Пояснити механізми реакції
------------	----------------------------------	----------------------------

Крок 3. Видалення білків

Що робили?	Що спостерігали? (результати)	Пояснити механізми реакції
------------	----------------------------------	----------------------------

Крок 4 та 5. ДНК стає видимою

Що робили?	Що спостерігали? (результати)	Пояснити механізми реакції
------------	----------------------------------	----------------------------

Контрольні питання

1. В якому випадку застосовують екстракцію ДНК з букального епітелію сорбентним методом.
2. Опишіть методику проведення екстракції ДНК з букального епітелію сорбентним методом.
3. В якому випадку застосовують виділення ДНК з епітеліальних клітин ротової порожнини методом лужної екстракції?
4. Як проводиться екстракція ДНК з лейкоцитів крові сорбентним методом?
5. Для чого використовують спектрофотометрію? На чому заснований даний метод?
6. Для чого використовують флуориметрію?

Література: [1–31].

Лабораторна робота № 3

Тема: Ампліфікація ДНК

Мета: ознайомитися з технологією проведення ампліфікації на основі методу полімеразної ланцюгової реакції.

Навчальні елементи: ампліфікація, фрагмент ДНК, процес денатурації, процес ренатурації, синтез комплементарного ланцюга ДНК.

Короткі теоретичні відомості

Ампліфікація (лат. *Amplificatio* – посилення, збільшення) – це процес утворення додаткових копій ділянок хромосомної ДНК, як правило, містять певні гени або сегменти структурного гетерохроматину. Ампліфікація може бути відповіддю клітин на селективну дію (наприклад, при дії метотрексату). Ампліфікація – один з механізмів активації онкогенів в процесі розвитку пухлини, наприклад, онкогена N-мус при розвитку нейробластоми. Також ампліфікація – накопичення копій певної нуклеотидної послідовності під час ПЛР – полімеразної ланцюгової реакції.

Молекулярні методи, засновані на ампліфікації нуклеїнових кислот

Ці методи стали переломним етапом у розвитку мікробіологічної діагностики. В якості мішені вони використовують унікальний для даного збудника короткий ділянку ДНК або РНК. Специфічна ділянка генома розпізнається за допомогою специфічних олігонуклеотидних праймерів (запалів) і багаторазово копіюється (ампліфікують) комплексом ферментів. Накопичення такого продукту свідчить про позитивний результат і відбувається в геометричній прогресії, по експоненті. В результаті навіть при наявності мінімальної початкової кількості збудника – теоретично однієї копії його генома – в процесі 1–2 ампліфікації відбувається накопичення продукту реакції, що перевищує вихідну кількість фрагментів геному в мільйони і мільярди разів.

Методи діагностики мікроорганізмів на основі ампліфікації нуклеїнових кислот володіють найбільшою аналітичної чутливістю, що дозволяє виявити навіть мінімальну кількість мікроорганізмів в досліджуваному матеріалі. Специфічність реакції визначається олігонуклеотидними праймерами – короткими (18-30 основ), штучно синтезованими молекулами РНК. Праймери розробляються на основі інформації про структуру геному збудника таким чином, щоб забезпечити їх взаємодію зі строго специфічним ділянкою генома цільової бактерії

Полімеразна реакція (метод ПЛР)

Метод з'явився в середині 1980-х років і дуже швидко став головним в фундаментальних дослідженнях нуклеїнових кислот і в ДНК-діагностики. Ампліфікація ДНК-мішені здійснюється в ході повторюваних циклів, кожен з яких включає: плавлення (утворення одно ланцюгових молекул) ДНК-мішені при температурі вище 90 °С; гібридизація на кожній одно ланцюговій молекулі ДНК комплементарного олігонуклеотидного праймера при 55–65 °С і добудову (синтез) фрагмента дво ланцюгової молекули ДНК термостабільної ДНК-полімеразою при 72 °С. Дотримання високої точності при відтворенні зазначених температурних режимів циклу ампліфікації змушує використовувати конструктивно складні і дорогі пристрої – прецизійний програмований термоциклер (ампліфікатор) зображений на рисунку 3.1. Після закінчення циклу відбувається подвоєння фрагментів ДНК-мішені (при проведенні n циклів кількість фрагментів ДНК-мішені становитиме $2n$). На практиці для отримання амплікон (продуктів ампліфікації) в кількості, достатній для їх детектування звичайними аналітичними методами, необхідно близько 30 циклів ампліфікації.



Рисунок 3.1 – Ампліфікатор (термоциклер, ПЛР-машина)

До недавнього часу найбільш поширеним методом детекції амплікону був горизонтальний електрофорез в агарозному гелі зразка реакційної суміші після ампліфікації. Результат ПЛР вважався позитивним при виявленні фрагмента ДНК, що відповідає за своєю молекулярною масою амплікона контрольного

зразка. Істотними недоліками цього методу детекції виявилися суб'єктивність оцінки результатів електрофорезу, низька продуктивність, неможливість автоматизації процесу, труднощі кількісної оцінки продуктів ПЛР.

Головним недоліком, що утрудняє використання класичної ПЛР в діагностичній практиці, була необхідність маніпуляцій з продуктами ампліфікації. Адже при вкрай високої чутливості ПЛР завжди існував значний ризик отримання хибно позитивних результатів через перехресну контамінацію досліджуваних зразків.

Перерахованих недоліків позбавлена ПЛР в реальному часі – Real-Time PCR (ПЛР-РВ) В даному випадку процеси ампліфікації і детекції амплікону відбуваються одночасно в одній пробірці. Це практично повністю виключає забруднення амплікона і зводить ризик отримання хибно позитивних результатів до абсолютного мінімуму.

Для детекції амплікону в ПЛР-РВ найбільш широко використовуються методи гібридизаційним-флуоресцентної детекції. При цьому ампліфікувати ДНК гібридизуючою з праймерами і з міченими флуоресцентним барвником олігонуклеотидних зондами. Утворений гібрид автоматично реєструється флуоресцентним детектором.

Важлива перевага ПЛР-РВ – кількісна оцінка числа копій ДНК цільового мікроорганізму в досліджуваному матеріалі. Однак для реалізації цього методу необхідні ще більш складні, ніж для класичної ПЛР пристрої, спеціальні термоциклери з прецизійною оптикою, що дозволяють проводити моніторинг інтенсивності флуоресцентної реакційної суміші. Сучасні термоциклери для ПЛР-РВ оснащені каналами для детектування флуоресценції в декількох діапазонах довжин хвиль, що дозволило розробити мультиплексні формати реакції.

Альтернативні методи ампліфікації ДНК

ПЛР – найбільш поширена, але не єдина реакція, заснована на методі ампліфікації нуклеїнових кислот. На рубежі 1990 років стали використовувати цілий ряд інших реакцій ампліфікації. У їх числі лігазна ланцюгова реакція,

ампліфікація зі зміщенням ланцюга, технологія цикліруючих проб, що самопідтримується реплікація, QR-реплікаційна ампліфікація, розгалужена гібридизаційною пробою.

Одним з перспективних варіантів ампліфікації зі зміщенням ланцюга є ізотермічна ампліфікація за допомогою утворення петель (LAMP-loop-mediated isothermal amplification). Кінцевий продукт цієї реакції має специфічні структури, що складаються з декількох перевернутих повторюваних послідовностей оригінального ДНК-шаблону, з'єднаних петлями одно ланцюгової ДНК. В даному методі ДНК ампліфікують безперервно з високою швидкістю і специфічністю при постійній температурі. LAMP використовує ДНК-полімерази з високою активністю зсуву і чотири праймера, що підвищує специфічність реакції. На основі ізотермічної ампліфікації вже створені комерційні тест-системи для діагностики збудників деяких захворювань.

Хід роботи

Завдання 1. Провести метод полімеразної реакції (ПЛР реакція).

Суть ПЛР полягає у трьох процесах:

- Виділення ДНК;
- Ампліфікація ДНК;
- Детекція ампліфікованих продуктів.

Для ампліфікації вибраного фрагмента ДНК використовують два праймера, комплементарних сайтами на досліджуваній ДНК. Праймери орієнтовані 3'-кінцями на зустріч один одному та у бік тієї послідовності, яку потрібно ампліфікувати. ДНК полімер аза здійснює синтез взаємо комплементарних ланцюгів ДНК, починаючи з праймерів. При синтезі ДНК праймери фізично вбудовуються у ланцюг молекули ДНК, що синтезуються. Кожна із синтезованих за допомогою одного із праймерів молекул ДНК може бути матрицею для синтезу комплементарної ДНК за допомогою іншого праймера.

ПЛР-ампліфікація проводиться багаторазовим повторенням трьох реакцій:

1. **Денатурація** – теплова денатурація зразка ДНК при температурі 95 °С

в продовж 1 хв. В реакційній суміші разом з ДНК містяться в надлишку два праймера, термостабільна ДНК полімераза Taq і 4 дезоксирибонуклеозида.

2. **Ренатурація** – температуру знижують до 55 °С, відбувається гібридизація праймерів з комплементарними послідовностями ДНК.

3. **Синтез** – температуру підвищують до 75 °С, починається синтез комплементарного 7 ланцюга ДНК, що ініціюється 3'-гідроксильною групою праймера.

Завдання 2. Зарисувати схематичне зображення ампліфікатора (ПЛР-машини) у лабораторному журналі.

Контрольні питання

1. Навести визначення поняття «ампліфікація». Які приклади методів ампліфікації ДНК вам відомі?

2. Охарактеризуйте молекулярні методи, засновані на ампліфікації нуклеїнових кислот.

3. У чому полягає суть полімеразної ланцюгової реакції?

4. Назвати перспективні методи ампліфікації ДНК.

5. Який матеріал можна використовувати для проведення ПЛР?

Усі реакції проводяться в пробірках, розміщених у термостаті; зміна температурного режиму і його підтримка здійснюються автоматично; кожен цикл триває 3–5 хв.

Література: [1–31].

Лабораторна робота № 4

Тема: Репарація ДНК

Мета: вивчити механізми репарації ДНК; засвоїти методику процесу репарації.

Навчальні елементи: ДНК-N-глікозилаза, нуклеотиди, білок, екзонуклеази, хелікази, ДНК-полімераза β , ДНК-лігаза, SSB-білки, амінокислоти, АП-сайт.

Короткі теоретичні відомості

Процес, що дозволяє живим організмам відновлювати пошкодження, що виникають в ДНК, називають **репарацією**. Всі репараційні механізми засновані на тому, що ДНК – дволанцюгова молекула, тобто в клітині є дві копії генетичної інформації. Якщо нуклеотидна послідовність одного з двох ланцюгів виявляється пошкодженою (зміненою), дані можна відновити, так як другий (комплементарний) ланцюг збережений.

Процес репарації відбувається в кілька етапів. На **першому етапі** виявляється порушення комплементарності ланцюгів ДНК. У ході **другого етапу** некомплементарний нуклеотид або тільки підстава усувається, на третьому і четвертому етапах йде відновлення цілісності ланцюга за принципом комплементарності. Однак у залежності від типу пошкодження кількість етапів і ферментів, які беруть участь у його усуненні, може бути різною, рисунок 4.1.

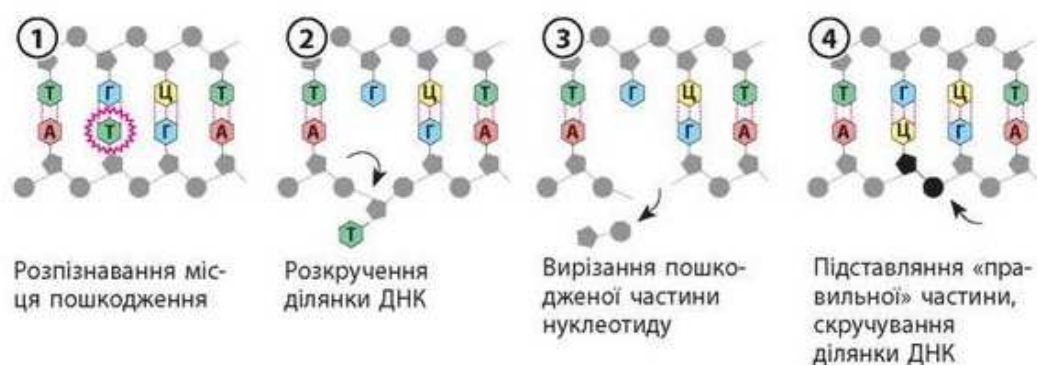


Рисунок 4.1 – Приклад репарації ДНК

Дуже рідко відбуваються ушкодження, які зачіпають обидва ланцюга ДНК, тобто порушення структури нуклеотидів комплементарної пари. Такі пошкодження в статевих клітинах не рапаруються, так як для здійснення складної репарації за участю гомологічної рекомбінації потрібна наявність диплоїдного набору хромосом.

Усі пошкодження ДНК поділяються на два типи:

- спонтанні пошкодження;
- індукуємі пошкодження.

Спонтанні пошкодження ДНК. Порушення комплементарності ланцюгів ДНК можуть відбуватися спонтанно, тобто без участі будь-яких пошкоджуючих факторів, наприклад в результаті помилок реплікації, депуринізації, дезамінування нуклеотидів.

Помилки реплікації. Точність реплікації ДНК дуже велика, але приблизно один раз на 10⁵–10⁶ н.з. відбуваються помилки спаровування, тоді замість пари нуклеотидів А-Т, G-C в дочірньому ланцюгу ДНК виявляються включеними нуклеотиди, некомплементарні нуклеотидам матричного ланцюга. Однак ДНК-полімерази δ і ϵ здатні після приєднання чергового нуклеотида у зростаючий ланцюг ДНК робити крок назад (в напрямку від 3' до 5' кінця) і вирізати останній нуклеотид, якщо він не комплементарний нуклеотиду в матричному ланцюгу ДНК. Цей процес виправлення помилок спаровування (чи корекція) інколи не спрацьовує і тоді в ДНК після закінчення реплікації залишаються некомплементарні пари, тим більше, що ДНК-полімераза α позбавлена коригуючого механізму та «помиляється» частіше, ніж інші полімерази.

При неправильному спаровування в первинній структурі дочірнього ланцюга ДНК незвичайні підстави не з'являються, порушена тільки комплементарність. Система репарації некомплементарних пар повинна відбуватися тільки на дочірньому ланцюгу і робити заміну некомплементарних підстав тільки в ньому. Ферменти, що беруть участь у видаленні неправильної пари нуклеотидів, розпізнають матричний ланцюг по наявності метилованих залишків аденіну в послідовностях -GATC-. Поки підстави нуклеотидних залишків в дочірньому ланцюгу неметиловані, ферменти повинні встигнути виявити помилку реплікації і усунути її.

Розпізнавання та видалення (перший етап) не комплементарного нуклеотиду відбувається за участю спеціальних білків mut S, mut L і mut H. Кожен з білків виконує свою специфічну функцію. Mut S знаходить неправильну пару і зв'язується з цим фрагментом. Mut H приєднується до метилованої (по аденіну) ділянки -GATC-, розташованій поблизу

некомплементарної пари. Сполучним елементом між mut S і mut H служить білок mut L, його приєднання завершує утворення активного ферменту. Формування комплексу mut S, mut L і mut H на ділянці, що містить помилку, сприяє прояву у білка mut H ендонуклеазної активності. Ферментативний комплекс гідролізує фосфоефірний зв'язок в неметилованому ланцюгу.

До вільних кінців ланцюга приєднується екзонуклеаза (другий етап). Відщеплюючи по одному нуклеотиду в напрямку від 3'- до 5'-кінця дочірнього ланцюга, вона усуває ділянку, що містить некомплементарну пару. Пролом забудовує ДНК-полімераза β (третій етап), з'єднання основної і знову синтезованої ділянок ланцюга каталізує фермент ДНК-лігаза (четвертий етап). Для успішного функціонування екзонуклеази, ДНК-полімерази β і ДНК-лігази необхідна участь у репарації хелікази і SSB-білків.

Депуринізація (апуринізація). ДНК кожної клітини людини втрачає за добу близько 5000 пуринових залишків внаслідок розриву N-глікозидного зв'язку між пурином і дезоксирибозою.

Тоді в молекулі ДНК на місці цих підстав утворюється ділянка, що позбавлена азотистих підстав. Вона носить назву апуринового сайту, або АП-сайту (англ. apurinic site – AP-site). Термін «АП-сайт» використовують також у тих випадках, коли з ДНК випадають піримідинові підстави і утворюються апіримідинові сайти (англ. apurinic-apurimidinic site). Цей тип ушкоджень усуває фермент ДНК-інсертаза, який може приєднувати до дезоксирибози підставу у відповідності з правилом комплементарності. У цьому випадку немає необхідності розрізати ланцюг ДНК, вирізати неправильний нуклеотид і репарувати розрив.

Дезамінування. Реакції дезамінування цитозину та перетворення його в урацил, аденіну в гіпоксантин, гуаніну в ксантин відбуваються значно рідше, ніж депуринізація, і складають 10 реакцій на один геном на добу.

Виправлення цього виду спонтанного пошкодження відбувається в 5 етапів. У репарації приймає участь ДНК-N-глікозілаза, яка гідролізує зв'язки між аномальною підставою і дезоксирибозою (перший етап), в результаті

утворюється АП-сайт, який розпізнає фермент АП-ендонуклеаза (другий етап). Як тільки в ланцюгу ДНК виникає розрив, в роботу вступає ще один фермент – АП-екзонуклеаза, який відщеплює від ланцюга дезоксирибозу, позбавлену підстави (третьої етап). У ланцюгу ДНК з'являється пролом розміром в один нуклеотид. Наступний фермент ДНК-полімераза β до 3'-кінця розорваного ланцюга приєднує нуклеотид за принципом комплементарності (четвертий етап). Щоб з'єднати два вільних кінця (3'-кінець вбудованого нуклеотиду і 5'-кінець основного ланцюга), потрібен ще один фермент – ДНК-лігаза (п'ятий етап). Нерепаруємо і тому небезпечно дезамінування метилованого цитозину. Продукт його спонтанного дезамінування – тимін, нормальна для ДНК підстава, яка не розпізнається ДНК-N-глікозилазою.

Індуковані пошкодження ДНК. Індуковані пошкодження виникають в ДНК в результаті впливу різноманітних мутагенних факторів як хімічної, так і радіаційної природи.

Утворення димерів піримідинових підстав. Під дією УФО подвійний зв'язок між С5 і С6 атомами вуглецю в складі піримідинових підстав (тиміні і цитозині) може розриватися. Атоми вуглецю залишаються пов'язаними одним зв'язком. Відстань між паралельними площинами підстав полінуклеотидного ланцюга, у якому відбувся розрив, дорівнює приблизно 3,4 Å. Ця відстань дозволяє звільнившись валентностями між С-С атомами піримідинових підстав, розташованих послідовно в ланцюгу ДНК, сформувати циклобутанове кільце. У залежності від того, які підстави з'єднані в димер, їх називають димерами тиміну, цитозину або тимін-цитозиновими димерами.

Видалення піримідинових димерів відбувається під дією ферменту фотоліази. Фотоліаза розщеплює зв'язки між сусідніми піримідиновими підставами, які тільки утворилися і відновлює нативну структуру. У фотоліазі є ділянка, або сама поглинаюча фотони (у синій частині спектру), або здійснююча зв'язування з кофакторами, адсорбуючими світло. Таким чином, світло активує фотоліазу, яка розпізнає димери в опроміненій ДНК,

приєднується до них і розриває зв'язки, які виникли між піримідиновими кільцями. Після цього фермент відділяється від ДНК.

Пошкодження підстав ДНК хімічними мутагенами. А.п. в ДНК можуть піддаватися різноманітним пошкодженням: алкілуванню, окисленню, відновленню або зв'язуванню підстави з формамідними групуваннями. Репарація починається з приєднання ДНК-N-глікозилази до ушкодженої підстави. Існує безліч ДНК-N-глікозилаз, специфічних до різних модифікованих підстав. Ферменти гідролітично розщеплюють N-глікозидний зв'язок між зміненою підставою і дезоксирибозою, це призводить до утворення АП-сайту в ланцюгу ДНК. Репарація АП-сайту може відбуватися або тільки при участі ДНК-інсертази, яка приєднує до дезоксирибози підставу у відповідності з правилом комплементарності, або за участю всього комплексу ферментів, які беруть участь у репарації: АП-ендонуклеази, АП-екзонуклеази, ДНК-полімерази і ДНК-лігази.

Хід роботи

Завдання 1. Дослідити процес репарації ДНК, занести відповідні запаси до лабораторного журналу.

Завдання 2. Визначити поширені причини виникнення пошкодження ДНК, занести відповідні запаси до лабораторного журналу.

Завдання 3. Зарисувати схему репарації ДНК у лабораторному журналі.

Контрольні питання

1. Навести визначення поняття «репарація».
2. Назвати спонтанні пошкодження ДНК.
3. У чому полягає процес репарації?
4. Які найпоширеніші помилки реплікації вам відомі?
5. Охарактеризувати основні процеси етапу репарації.

Література: [1–31].

Лабораторна робота № 5

Тема: Рестрикційний аналіз ДНК

Мета: ознайомитися з методом рестрикційного аналізу ДНК.

Навчальні елементи:

Короткі теоретичні відомості

Ферменти, що каталізують деградацію нуклеїнових кислот шляхом розриву межнуклеотидної фосфодієфірних зв'язків (нуклеази), присутні у всіх живих організмах. Деякі з них - РНКази - активні виключно по відношенню до РНК, інші - ДНКази - діють на ДНК. Окрема група (так звані неспецифічні нуклеази) проявляє активність у відношенні як РНК, так і ДНК.

Принципи, які використовуються для класифікації нуклеаз, пов'язані з трьома їх головними властивостями. Перше - це субстратна специфічність. Зазначений критерій дозволяє дискримінувати ферменти за їхньою здатністю дізнаватися у вигляді субстратів або РНК, або ДНК, або обидві нуклеїнові кислоти. Другим властивістю є спосіб атаки субстрату. Цей критерій дозволяє розрізняти ендонуклеази - ферменти, що розщеплюють зв'язки всередині полімерного ланцюга, від екзонуклеаза, послідовно відщеплює нуклеотиди з одного з кінців ланцюга. Фермент, який дізнається специфічну послідовність нуклеотидів в двцепочечной ДНК і розщеплює сахарофосфатний остов кожної ланцюга дуплексу в певному місці, називають також ферментом рестрикції (перев. з англ. restriction - обмеження). Слід зазначити, що деякі екзонуклеаза (наприклад, фермент, що виділяється зі зміїної отрути) в літературі називають фосфодієстерази. Однак, оскільки і ендонуклеази є фосфодієстерази, некоректно застосовувати цей термін лише до деяких з них, а саме до екзонуклеаза. З третім властивістю пов'язаний спосіб розриву фосфодієфірних зв'язку - гідроліз зв'язку між 5'-ОН-групою і фосфатом або зв'язку між 3'-ОН-групою і фосфатом з утворенням продуктів, які несуть відповідно 3' або 5'-кінцеві фосфатні групи. Для характеристики дії нуклеаз залучаються і інші критерії. Серед них:

а) відношення до вторинної структури субстрату. За цією ознакою ДНКазиди поділяються на ферменти, що розщеплюють двухцепочечную, одноцепочечную або обидві зазначені форми ДНК;

б) здатність розщеплювати ДНК по одно- або двуударному механізму, розриваючи обидві ланцюга полімеру в одному і тому ж ділянці або виробляючи безладні поодинокі розриви;

в) специфічність до азотистих підстав у гідролізованого фосфодієфірних зв'язку. Цей критерій, запроваджений після виявлення специфічності панкреатичної РНКазиди до ділянок РНК, що містить піримідинові, виправдовує себе по відношенню до деяких РНКаз і особливо рестрикційними ендодезоксирібонуклеазама;

г) специфічність до певних нуклеотидних послідовностей (так звані рестриктази).

Слід зазначити, що розглянута класифікація нуклеаз на практиці часто виявляє свою відносність. Наприклад, є кілька ферментів, які можуть виступати і як ендонуклеаза, і як екзонуклеаза. Крім того, нещодавно було показано, що деякі бактеріальні та дріжджові ДНКазиди мають і хеліказную активність. При цьому дріжджовий фермент проявляє ще й ДНК-залежну АТФазную активність. Деякі РНКазиди, наприклад РНКазиди H, розщеплюють РНК виключно в складі гібрида з комплементарної ланцюжком ДНК.

Говорячи про роль нуклеаз в клітині, перш за все, слід зазначити, що в клітинах не тільки відбувається синтез молекул ДНК і РНК, а й спостерігається їх специфічна деградація за допомогою досить широкого спектра нуклеаз. Так, ендонуклеаза V *Escherichia coli* репаруючу пошкодження в одно- і двухнитевой ДНК, а ендонуклеаза *Vsr* ініціює репарацію Т / G-помилки спарювання. Участь екзонуклеази в репарації помилково спарених підстав показано також для *Saccharomyces cerevisiae* і вірусу грипу.

Показана роль нуклеаз у *E. coli* для підтримки структури хромосом шляхом розщеплення шпилькових структур, які з'являються в деяких реакціях рекомбінації і заважають руху реплікативної вилки.

3'-Екзонуклеазная активність у *E. coli* грає важливу роль, забезпечуючи освіту проломів під час репарації межнітевих зшивок і пошкоджень в протилежних нитках ДНК. Тому не є випадковим те, що зниження активності екзонуклеаза *Bacillus subtilis* в результаті мутації підвищує чутливість клітин до УФ-опромінення.

Деякі з нуклеаз виконують кілька функцій. Наприклад, нуклеаза Mre11 *Sacch. cerevisiae* бере участь у репарації і рекомбінації ДНК, а також у підтримці розміру теломер.

Важлива роль нуклеаз показана в так званій запрограмованій загибелі клітин (апоптозу) вищих еукаріот, в процесі якої відбувається деградація ядерної ДНК під дією декількох нуклеаз, що знаходяться під різною регуляцією. Аналогічна роль виявлена недавно і для деяких нуклеаз *Str. antibioticus*, які беруть участь в загибелі клітин в процесі диференціювання і споруляції міцелію. Мембрансвязанного нуклеаза *Bac. subtilis* приймає основну участь в деградації ДНК в процесі загибелі клітин, викликаній температурним шоком.

Цікаві послідовні дії нуклеаз показано при деградації мРНК у еукаріот. Так, на першій стадії специфічна нуклеаза проводить видалення поліаденілатного ділянки на 3'-кінці молекули мРНК, після чого специфічна фосфодіестераза видаляє кеп на її 5'-кінці і, нарешті, 5' → 3' екзонуклеаза повністю деградує РНК до мононуклеотидів.

Деякі позаклітинні нуклеази захищають клітини бактерій від проникнення чужорідного генетичного матеріалу. Інші можуть бути вірулентними факторами у патогенних бактерій і вірусів. РНКазы, специфічні до субстратів *polu* (U) і *polu* (C), відіграють важливу роль в процесингу РНК і термінації транскрипції у бактерій і дріжджів.

Серед причин, що привертають увагу багатьох дослідників до вивчення нуклеаз, слід вказати на перспективність використання цих ферментів:

- а) при отриманні нуклеотидів і нуклеозидів;

б) в якості противірусних препаратів в медицині і сільському господарстві. У Росії розроблений спосіб вирощування безвірусного картоплі методом апікальної меристеми з використанням бактеріальних нуклеаз. Крім антивірусної активності, ці нуклеази мають рістстимулюючу дію, що сприяє збільшенню числа прижилися меристем, збільшення довжини паростків картоплі в 2-3 рази, збільшення числа і маси бульб;

в) в якості інструментів в дослідженні структури ДНК, створення рекомбінантних молекул, вивченні генетичного матеріалу, в тому числі геномної дактилоскопії;

г) для видалення домішок РНК з препаратів ДНК і, навпаки, для розв'язання оберненої задачі;

д) для зменшення вмісту нуклеїнових кислот в препаратах білків одноклітинних, призначених для харчових і кормових цілей;

е) для використання в якості об'єктів вивчення структурно-функціональних зв'язків в хімії білка;

ж) для стимуляції росту мікроорганізмів і рослин, а також активації біосинтезу різних продуктів в мікробіологічній промисловості. Так, встановлено здатність мікродоз РНКаз (бінази) прискорювати освіту біомаси лактобацил і підвищувати їх адгезивні властивості;

з) для активації реакцій клітинного і гуморального імунітету.

Система рестрикції-модифікації бактерій (так звана R-M система від англ. Restriction modification system). Зазвичай термін відносять до системи, яка має двома ферментативними активностями, характерними для ендонуклеази рестрикції і метилтрансферази. Загальноприйнято, що такі системи в нормі використовуються бактеріями (і, ймовірно, іншими прокариотами) для захисту від вірусів, плазмід і інших чужорідних ДНК. Ендонуклеази рестрикції дізнаються і розщеплюють надходить ззовні ДНК. Собственное ДНК клітини не розщеплюється, оскільки впізнавані ендонуклеаза рестрикції послідовності метілюються ДНК-метилтрансферази і таким чином виявляються захищеними від гідролізу.

Існує чотири типи RM-систем. Вони були названі в порядку відкриття, хоча RM-система типу II найбільш поширена.

Ферменти RM-системи типу I складаються з суб'єдінце метилтрансферазної активності, субодиниці представляє собою ендонуклеази рестрикції, і субодиниці опрделеяющей специфічність впізнавання нуклеотидної послідовності (кодуються трьома різними генами). Ферменти RM-системи типу II кодуються двома генами; це два різних ферменту - ендонуклеаза рестрикції і метилтрансфераза. Ферменти RM-системи типу III також кодуються двома генами. Один з них відповідає за синтез метилтрансферази, яка може функціонувати самостійно або утворювати комплекс з субодиницею, що представляє собою ендонуклеази рестрикції. Ферменти RM-системи IV функціонують автономно і розщеплюють метильованих ДНК (див. Табл. 1).

Ендонуклеази рестрикції II типу широко використовують в роботах з генної інженерії, зокрема з картування геномів, клонування, визначенню нуклеотидних послідовностей (секвенування). Рестрикційний картування полягає в аналізі фрагментів рестрикції², отриманих розщепленням ДНК декількома ферментами індивідуально і в комбінації. У поєднанні з простим порівнянням рестрикційних фрагментів часто використовуються деякі додаткові підходи, наприклад, введення радіоактивно міченої фосфатної групи в кінець молекули ДНК. В цьому випадку можна визначити положення сайту рестрикції від кінця вихідної молекули ДНК. Чим більше довжина спостережуваного фрагмента, тим далі сайт рестрикції розташований від радіоактивно міченого кінця заданої ДНК. Зазвичай для складання рестрикційних карти потрібно біоінформаційний аналіз довжини фрагментів рестрикції.

Таблиця 1. Характеристика ендонуклеаз рестрикції прокариот.

Тип рестриктаз	Загальна характеристика типу	Сайт рестрикції	Приклади
I (29%)	Складаються з трьох субодиниць - HsdS, HsdR, HsdM. Вони відповідальні за впізнання нуклеотидної послідовності, гідроліз і її метильовання відповідно. Четвертична структура активної ендонуклеази має вигляд HsdS ₂ HsdR ₂ HsdM ₂ . Для ефективного каталізу необхідні АТФ, Mg ²⁺ , S ⁻ аденозин-L-метіонін.	Зазвичай взаємодіють з двома асиметричними ділянками, розділеними довільної нуклеотидної послідовністю, транслоцирується ДНК і розщеплюють її у випадковому помсти, яке може знаходитися на відстані 1000 п.н. і більше від ділянки впізнання.	EcoKI, EcoAI EcoR1241
II (45%)	Ди- і тетрамірні білки, які функціонують незалежно від метилтрансфераза. Кофактор Mg ²⁺	Зазвичай впізнають досить короткі (4-8 пар основ) специфічні (дуже часто паліндромний) послідовності ДНК. Розщеплюють зв'язку в певних положеннях всередині ділянки впізнання або за його межами з утворенням тупих або липких кінців.	
III (8%)	Складаються з двох субодиниць - Mod (відповідальна за впізнання і модифікацію ДНК) і Res (відповідає за розщеплення ДНК). В активному стані ферменти мають стехіометрію Mod ₂ Res ₂ . Для функціонування потрібно АТФ і Mg ²⁺ . S ⁻ аденозин-L-метіонін також стимулює їх дію.	Взаємодіють з двома асиметричними участками узнавання, транслоцирують ДНК і розщепляють її на расстоянии примерно 25 п.н. от одного из участков узнавания.	EcoKPII, EcoP15I
IV (18%)	Найбільш вивчений фермент MrcBC, який складається з двох субодиниць (B і C), відповідальних за впізнання і гідроліз ДНК. Для розщеплення ферменту потрібні ГТФ і Mg ²⁺ .	Впізнають і розщеплюють метильованих ДНК. У молекулі ДНК MrcBC зазначається як мінімум два динуклеотид - dA і dG, за якими слід метильований залишок dC; при цьому відстань між ними може складати від 40 до 3000 п.н.	MrcBC ³

За одиницю активності рестриктази приймають кількість ферменту, здатне за 1 год в оптимальних для нього умовах повністю гідролізувати 1 мкг ДНК фага λ . Для проведення успішної рестрикції необхідно дотримуватися ряду умов, які наведені в табл. 2.

Таблиця 2. Умови рестрикції.

Фактор	Умова	Додаткова інформація
Рестриктаза	<p>1. <i>Tun</i> - в залежності від мети роботи. При виборі необхідно знати, чи є використовуваної ДНК сайт або сайти впізнавання для даної рестриктази</p> <p>2. <i>Кількість</i> - залежності від кількості ДНК (1 од. Акт. Ферменту на 1 мкг ДНК). Для більшої ефективності краще використовувати двох- або триразовий надлишок ферменту.</p>	<p>Для виявлення сайтів використовують генетичні карти або секвенований послідовності ДНК.</p> <p>Великий надлишок активності рестриктази або обсягу її розчину, взятого на реакцію (більш 1/10 кінцевого обсягу), може призвести до зменшення специфічності роботи ферменту</p>
Буферний розчин	<p><i>Склад:</i></p> <p>1) трис-НСІ буферний розчин для підтримки рН (близько 7,5);</p> <p>2) MgCl₂ (іони магнію є єдиним кофактором рестриктаз класу II);</p> <p>3) дітіотрейтол або меркаптоетанол для стабілізації ферменту з додаванням бичачого сироваткового альбуміну (БСД) як стабілізатора;</p> <p>4) NaCl (або KCl) для створення необхідної іонної сили реакційної суміші</p>	<p>Для різних рестриктаз потрібні певні концентрації компонентів. Однак для зручності роботи більшість ферментів було об'єднано в 4-5 груп і для кожної з них</p>
ДНК	<p>Від 1 до 10 мкг, оскільки великі кількості ДНК збільшують в'язкість розчину, що призводить до пригнічення реакції</p>	<p>ДНК повинна бути очищена від реагентів, які використовуються полісахаридів і РНК</p>
Об'єм суміші	<p>Від 10 до 50 мкл</p>	<p>Для зменшення випаровування і підтримки постійного обсягу реакційної суміші додають Вазелинове масло</p>
Температура	<p>37 °С для більшості рестриктаз</p>	<p>25 °С (для <i>SmaI</i>), 65 °С (для рестриктаз з термофільних бактерій - <i>BstBI</i>, <i>TaqI</i> і ін.)</p>
Час	<p>Від 1 до 5 год</p>	<p>Реакцію можна зупинити за допомогою ЕДТА-Na</p>

Хід роботи

1. Суміш для рестрикції (загальний обсяг – 40 мкл) готують в мікропробірку місткістю 0,5 мл, помістивши її та всі вихідні компоненти в термостат з функцією охолодження при 4 °С:

10x буфер для рестриктази EcoRI – 6 мкл;

рестриктаза EcoRI (10 од.) – 2 мкл;

вода стерильна деіонізована – 32 мкл.

Перераховані вище компоненти змішують в зазначених кількостях, за допомогою автоматичного дозатора відбирають по 20 мкл суміші і переносять в дві чисті мікропробірки місткістю 0,5 мл.

Увага! При змішуванні необхідно проводити зміну наконечників після кожного розчину.

В пробірку 1 додають 10 мкл розчину ДНК фага λ в концентрації 0,4 мкг / мкл, а в пробірку 2 – 10мкл розчину плазмідної ДНК (pGEM3Z) в концентрації 0,4 мкг/мкл.

2. Суміші в двох пробірках дуже обережно перемішують з використанням дозатора з наконечником, додають 10 мкл мінеральної олії, центрифугують 5 с при 2000 g і витримують в термостаті 1 год при 37 ° С.

3. Через 5, 20, 40 хв і після закінчення 1 год від початку рестрикції з пробірки 2 відбирають проби по 5 мкл і переносять в чисті мікропробірки місткістю 0,5 мл, маркуючи їх при цьому.

4. Кожну з відібраних проб відразу ж змішують з 5 мкл фарби-лідера (з набору для електрофорезу), поміщають в термостат з функцією охолодження при 4 °С і залишають до тих пір, поки не буде відібрана остання проба.

5. Чотири проби які містять гідролізовану ДНК, відібрані з пробірки 2, а також пробу з пробірки 1 (аналогічно змішану з фарбою-лідером) вносять в лунки пластини агарозного гелю і піддають електрофорезу для дослідження динаміки рестрикції.

Контрольні питання

1. Які ферменти прийнято називати нуклеазами і які особливості їх каталізу?
2. Які функції можуть виконувати нуклеази всередині клітини?
3. У чому полягає перспективність використання нуклеаз в молекулярно генетичних дослідженнях?
4. Яка функція RM-систем в прокаріотичній клітині?
5. Чому в генетичній інженерії застосовуються тільки рестриктази другого типу? У чому особливість їх каталізу?
6. Які основні умови необхідно дотримуватися при проведенні рестрикційного аналізу?

Література: [1–31].

Лабораторна робота № 6

Тема: Методи аналізу на основі ДНК-маркерів

Мета: розглянути принцип роботи з ДНК-маркерами та їх особливості залежно від типу маркера.

Навчальні елементи:

Короткі теоретичні відомості

Найбільш широко використовувані ДНК-маркери умовно можна поділити на наступні типи:

- маркери ділянок структурних генів, що кодують амінокислотні послідовності білків (електрофоретичні варіанти білків);
- маркери некодуючих ділянок структурних генів;
- маркери різних послідовностей ДНК, ставлення яких до структурних генів, як правило, невідомо.

В справжній час існує цілий набір сучасних технологій виявлення поліморфізму на рівні ДНК, серед яких можна виділити наступні:

- Маркери на основі ДНК-зондів;
- ПЛР-маркери.

1. Маркери на основі ДНК-зондів

Поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів – ПДРФ (англ. restriction fragment length polymorphism – RFLP). Зміни в послідовностях ДНК можуть обумовлювати зміни у розташуванні сайтів рестрикції і тому позначатися на довжині рестрикційних фрагментів. Стійку успадковану зміну у розподілі довжини рестрикційних фрагментів (що спостерігається для більш ніж 1% чисельності популяції) називають поліморфізмом довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Цей феномен може бути результатом або точкових замін (серповідноклітинна анемія), або делецій і інсерцій (таласемії). Останнім часом ПДРФ стали з успіхом використовувати в діагностичних цілях. Рестрикційний поліморфізм виявлений як в послідовностях відомих генів, так і в ділянках ДНК з невідомою функцією. ПДРФ може порушувати біологічну функцію, а може і не мати ніяких біологічних наслідків. В будь-якому випадку відповідні змінені локуси успадковуються відповідно до законів Менделя.

ПДРФ-аналіз включає наступні етапи:

- екстракція геномної ДНК;
- її рестрикція специфічною ендонуклеазою;
- сепарація фрагментів ДНК, що утворюються, методом геле-електрофорезу;
- ідентифікація цих фрагментів шляхом Саузерн-блотінгу.

На електрофореграмах за відсутності рестрикції в досліджуваній ДНК виявляють один великий фрагмент, відповідний по довжині послідовності ДНК між двома сусідніми ділянками рестрикції для тієї ж ендонуклеази. При наявності рестрикції в поліморфній ділянці на електрофореграмі буде присутній менший за розмірами фрагмент, рівний відстані між поліморфною ділянкою рестрикції і одною з найближчих постійних ділянок рестрикції. ПДРФ-аналіз може бути значно спрощено в тому випадку, якщо можлива специфічна ампліфікація ділянки ДНК, яка містить поліморфний сайт рестрикції.

Тестування стану цього локусу можливо шляхом проведення ПЛР і рестрикції ампліфікованого фрагмента. При відсутності сайту впізнання у досліджуваній області ДНК розміри ампліфікованого фрагменту не зміняться після його обробки рестриктазою. Якщо ділянка впізнання не змінена, обробка ферментом призведе до утворення 2 маленьких фрагментів з тією ж сумарною довжиною, що й вихідний фрагмент. 20% виявлених випадків ПДРФ відноситься до X-хромосоми, і саме для неї складено практично повна карта. Використовуючи феномен ПДРФ, можна локалізувати ген будь-якої X-зчепленої хвороби (наприклад, м'язової дистрофії Дюшена). За допомогою ПДРФ вдалося встановити, що генетичний дефект при хорей Гентінгтона зачіпає кінець короткого плеча хромосоми 4, а ген, що викликає полікістоз нирок, зчеплений з локусом α -глобіну на хромосомі 16.

2. ПЛР-маркери

Метод ПЛР передбачає використання специфічних праймерів та отримання дискретних ДНК-продуктів ампліфікації окремих ділянок геномної ДНК. На цьому принципі побудовано велика кількість споріднених технологій.

Прості повтори або мікросателіти (англ. simple sequence repeats – SSR). ПЛР з фланкуючими праймерами до короткого міні або мікросателітного повтору, дозволяє виявляти маркери з кодомінантним спадкуванням і, відповідно, є зручним для виявлення гетерозигот за даним локусом. Одна пара праймерів для флангів в ПЛР дозволяє розглядати поліморфізм тільки одного локусу. Для багатьох мікросателітних локусів не вдається виявити поліморфізм. Як правило, фланкуючі послідовності для даного мікросателітного локусу виявляються видоспецифічними.

Довільно (випадково) ампліфікована поліморфна ДНК – ДАПД (англ. random amplified polymorphic DNA – RAPD), полімеразна ланцюгова реакція з використанням одиничного короткого, зазвичай, 10-членного праймеру, з довільною нуклеотидною послідовністю. Послідовність праймерів не абсолютно будь-яка, а обмежена в межах 40-70% вмісту GC і 50-100% лінгвістичної складності нуклеотидної послідовності. У RAPD можна

використовувати як одиночний праймер, так і декілька RAPD-праймерів. Продукт RAPD утворюється в результаті ампліфікації фрагменту геномної ДНК, фланкованої інвертованою послідовністю використовуваного праймера.

Метод є універсальним для досліджень різних видів, при використанні одних і тих же праймерів.

Як правило, праймер що виявляє високий поліморфізм для одного виду, буде також ефективним і для інших видів.

Міжмікросателітні повтори (англ. inter simple sequence repeats – ISSR) представляють собою спеціалізований варіант методу RAPD, в якому праймер складається з мікросателітної послідовності. У цьому методі, також як і в RAPD, використовується один або кілька праймерів, довжиною в 15-24 нуклеотидів. Але в даному випадку, праймери складаються з тандемних коротких 2-4 нуклеотидних повторів, наприклад: 5'-CA CA CA CA CA CA CA CA CA G і одним або двома селективними нуклеотидами на 3'-кінці праймеру. Продукти ISSR-ампліфікації містять на флангах інвертовану мікросателітну послідовність праймера. Так як в даному методі послідовність праймерів є специфічною і підбирається більш строго, ніж в RAPD, тому, температуру відпалу в ПЛР можна проводити вище (55-60 °C), ніж для RAPD-методу, а тому фінгерпринт, зазвичай, краще відтворюється.

Поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів – ПДАФ (англ. amplified fragment length polymorphism – AFLP). Технологія являє собою комбінацію ПЛР- і ПДРФ-методів. AFLP – досить складний метод і складається з декількох етапів: геномна ДНК одночасно рестрикується двома рестриктазами (EcoRI і MseI), які впізнають 4 і 6 підстав, відповідно, отримуючи фрагменти з виступаючими 3'-кінцями. Потім рестрикована геномна ДНК лігується з адаптором, що містить «липкі» кінці для рестрикційних сайтів (EcoRI і MseI). Після цього проводиться дві послідовних ПЛР. У першій ПЛР (преампліфікація) використовуються праймери повністю комплементарні адапторам EcoRI і MseI. Після першої ПЛР утворюється велика кількість продуктів ампліфікації між EcoRI і MseI адапторами, які важко диференціювати

за допомогою електрофорезу. Тому, у другій ПЛР, праймери з EcoRI і MseI адапторами містять на 3'-кінці додаткові і не комплементарні адаптори від 1 до 3 підстави, для селективної ампліфікації. Поділ фрагментів ДНК виконується в ПААГ, з радіоактивною або флюоресцентною міткою, відповідно.

Поліморфізм специфічно ампліфікованих фрагментів – ПСАФ (англ. sequence specific amplification polymorphism – SSAP) є модифікацією методу AFLP, для виявлення поліморфізму як по сайту рестрикції, так і по вставці в геномну ДНК транспозону або ретротранспозону. Геномна ДНК досліджуваних зразків розщеплюється рестриктазами PstI і MseI, в результаті чого отримуються фрагменти з виступаючими 3'-кінцями. Потім рестрикована ДНК лігується з PstI і MseI адапторами. Перша ПЛР (преампліфікація) проводиться з праймерами від PstI і MseI адапторів, тобто ампліфікують всі можливі комбінації поєднання цих адаптерів в рестрикованій геномній ДНК. Після першої ПЛР утворюється велика кількість продуктів ампліфікації фрагментів ДНК, локалізованих між праймерами і адапторами. ПЛР продукти розбавляються і використовуються для другої, селективної ПЛР. Друга ПЛР проводиться з міченим праймером до LTR і будь-яким праймером адапторів, або з PstI або MseI. У другій ПЛР можна використовувати праймери до адапторів з додатковими нуклеотидами на 3'-кінці, наприклад, один, два або три нуклеотиди, що не комплементарні адапторам. Електрофорез після другої ПЛР проводять в ПААГ або в секвенаторі, якщо використовувалася флюоресцентна мітка. Продукти ампліфікації після другої ПЛР утворюються в результаті ампліфікації фрагмента ДНК між послідовністю LTR ретротранспозону і адаптором. Отримання продуктів ампліфікації між тільки LTR послідовностями принципово можливі, але, як правило, відстань між двома ретротранспозонами довше зазвичай одержуваних розмірів ПЛР продуктів (2500-3000 п.п). А продукти ампліфікації між адапторами не будуть виявлятися, оскільки використовується мітка тільки для LTR праймера.

Inter retrotransposone amplified polymorphism (IRAP). ПЛР між праймерами, комплементарними послідовностям двох поруч розташованих

LTR ретротранспозону. Метод має кілька варіантів. У першому варіанті IRAP використовується одиничний праймер з LTR. Продукти ампліфікації утворюються між двома інвертованими LTR з однаковою послідовністю, тобто у одного ланцюга 5'-кінець одного LTR орієнтований до 3'-кінця іншого LTR.

Якщо центральна частина ретротранспозону довше звичайного розміру ПЛР продуктів (близько 3000 п.п), то ПЛР буде проходити тільки між двома LTR з різних ретротранспозицій. У цьому випадку сусідні LTR повинні розташовуватися в інвертованому положенні. В іншому варіанті IRAP використовуються два різних праймера до інвертованих LTR: один праймер з 5'-кінця, а інший з 3'-кінця LTR, орієнтовані в різні боки від ретротранспозону. В даному випадку сусідні LTR розташовуються як прямі довгі повтори. І, нарешті, в третьому варіанті IRAP використовуються праймери до LTR з різних ретротранспозонів в різній орієнтації. Можна комбінувати праймери з LTR з іншими праймерами з повторюваної ДНК.

Retrotransposone microsatellite amplified polymorphism (REMAP) – це метод ПЛР між праймером до фрагмента LTR ретротранспозону і праймером з поруч розташованого, простого мікросателітного повтору (ISSR праймер). В даному випадку позиція ампліфікуемого фрагмента ретротранспозону «заякорюють» шляхом використання праймера до мікросателітного локусу. Наприклад, у рослин зручним виявляється використання праймера до LTR і праймера до мікросателітів (5'-CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA G) з одиничним селективним нуклеотидом на 3'-кінці праймера. У REMAP застосовують варіанти LTR праймерів як для 5'-кінця, так і для 3'-кінця LTR, як і в IRAP.

Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) – метод, заснований на використанні праймерів до послідовностей ретротранспозонів і виявляє кодомінантність алельних варіантів. Його принцип заснований на мультилокусній ПЛР, в якій використовуються пара праймерів, фланкуючих ділянку ДНК до ретротранспозиції і праймер до LTR ретротранспозону, який вбудований в дану ділянку між першими двома праймерами. В результаті ПЛР

буде ампліфікуватися один з варіантів фрагментів, фланкуємих парою праймерів, оскільки послідовність між LTR занадто довга для ПЛР між сайтами геномної ДНК з ретротранспозонів всередині. Цей метод виявляє поліморфізм тільки для даного поліморфного локусу. До його переваг відносять кодомінантність поліморфних варіантів та можливість використання для дот-блот аналізу великої кількості сортів.

Inter PBS amplification (iPBS). Даний метод, заснований на використанні праймерів до PBS (англ. primer binding site (ділянка зв'язування тРНК)) послідовностям ретротранспозонів. Метод ефективний для виявлення поліморфізму між зразками, а також для клонування нових ретротранспозонів у еукаріот.

Хід роботи

1. Описати типи та особливості роботи різних ДНК-маркерів.
2. Розглянути приклади застосування ДНК-маркерів.

Контрольні питання

1. Що таке генетичні маркери?
2. Яку інформацію про організм може дати генетичне маркування?
3. Що таке RAPD-аналіз? Які його переваги і недоліки?
4. Що таке ISSR-аналіз? У чому його відмінності від RAPD?
5. Назвіть методи генетичного аналізу, засновані на ампліфікації зі специфічними праймерами.
6. У чому суть методу RFLP?
7. У чому суть методу AFLP?
8. Як виявити поліморфізм на рівні окремих нуклеотидів?
9. У вас є організм з невідомим геномом. Необхідно оцінити ступінь поліморфізму в його популяції. Який метод аналізу ви будете використовувати?

Література: [1–31].

КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ ЗНАНЬ СТУДЕНТІВ

Навчальні досягнення студентів з навчальної дисципліни «Імунобіотехнологія» оцінюються за модульно-рейтинговою системою, в основу якої покладено принцип поопераційної звітності, обов'язковості модульного контролю, накопичувальної системи оцінювання рівня знань, умінь і навичок; розширення кількості підсумкових балів до 100.

«Відмінно»

Ставиться за повні та міцні знання матеріалу в заданому обсязі, уміння вільно виконувати лабораторні роботи, передбачені навчальною програмою; за знання основної та додаткової літератури; за вияв креативності у розумінні і творчому використанні набутих знань та умінь.

«Добре»

Ставиться за вияв студентом повних, систематичних знань з початкової дисципліни, успішне виконання лабораторних робіт, засвоєння основної та додаткової літератури, здатність до самостійного поповнення та оновлення знань. Але у відповіді студента наявні незначні помилки.

«Задовільно»

Ставиться за вияв знання основного навчального матеріалу в обсязі, достатньому для подальшого навчання і майбутньої фахової діяльності, поверхову обізнаність з основною і додатковою літературою, передбаченою навчальною програмою; можливі суттєві помилки у передбаченою навчальною Програмою; можливі суттєві помилки у передбаченою навчальною програмою; можливі суттєві помилки у розв'язанні лабораторних завдань, але студент спроможний усунути їх за допомогою викладача.

«Незадовільно»

Виставляється студентові, відповідь якого під час відтворення основного програмового матеріалу поверхова, фрагментарна, що зумовлюється початковими уявленнями про предмет вивчення. Отже, оцінка «незадовільно»

ставиться студентові, який неспроможний до навчання чи виконання фахової діяльності після закінчення ВНЗ без повторного навчання за програмою відповідної навчальної дисципліни.

Порядок переведення рейтингових показників успішності
у європейські оцінки ECTS

Підсумкова кількість	Оцінка за національною шкалою для заліку	Оцінка за шкалою
1-34	«Незадовільно»	F
35-59	«Незадовільно»	FX
60-63	«Задовільно»	E
64-73		D
74-81	«Добре»	C
82-89		B
90-100	«Відмінно»	A

Кожний модуль включає бали за поточну роботу студента на лабораторних роботах, практичних заняттях, виконання самостійної роботи, індивідуальну роботу, модульну контрольну роботу.

Виконання модульних контрольних робіт здійснюється в режимі комп'ютерної діагностики або з використанням роздрукованих завдань.

Реферативні дослідження, які виконує студент за визначеною тематикою, обговорюються та захищаються на індивідуальних заняттях. Модульний контроль знань студентів здійснюється після завершення вивчення навчального матеріалу модуля.

Кількість балів за роботу з теоретичним матеріалом, на лабораторних роботах, під час виконання самостійної та індивідуальної навчально-дослідної роботи залежить від дотримання таких вимог: своєчасність розв'язання навчальних завдань; повний обсяг їх розв'язання; якість розв'язання навчальних завдань; самостійність; творчий підхід у розв'язанні завдань; ініціативність у навчальній діяльності.

ЛІТЕРАТУРА

1. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – Москва : Мир, 2002. – 488 с.
2. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии : учебник / В. Н. Рыбчин ; 2-е изд., перераб. и доп. – СПб : ГТУ, 1999. – 521 с.
3. Руденко С. С. Генетична інженерія : навч. посібник / С. С. Руденко. – Чернівці : Рута, 1997. – 182 с.
4. Ніколайчук С. І. Генетична інженерія / С. І. Ніколайчук, І. Ю. Горбатенко. – Ужгород, 1999. – 101 с.
5. Картель Н. А. Биоинженерия : методы и возможности / Н. А. Картель. – Минск : Ураджай, 1989. – 144 с.
6. Воронина Л. Н. Основы биохимической инженерии : учеб. пособие / Л. Н. Воронина, Н. А. Шоно, А. Л. Загайко. – Х. : Золотые страницы, 2004. – 240 с.
7. Методы молекулярной генетики и генной инженерии / Под. ред. Р. И. Салганик. – Новосибирск : Наука, Сиб. отд-ние, 1990. – 248 с.
8. Біотехнологія : навч.-метод. посіб. Ч. 1. Генетична інженерія мікроорганізмів / Під ред. В. М. Тоцького. – Одеса : ЛАТСТАР, 2004. – 76 с.
9. Кучук Н. В. Генетическая инженерия высших растений / Н. В. Кучук. – Киев : Наук. думка, 1997. – 152 с.
10. Глеба Ю. Ю. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений / Ю. Ю. Глеба, К. М. Ситник. – Киев : Наук. думка, 1982. – 102 с.
11. Глазко В. И. Генетически модифицированные организмы: от бактерий до человека / В. И. Глазко. – Киев : КВІЦ, 2002. – 210 с.
12. Дромашко С. Е. Генетически модифицированные организмы и проблемы биобезопасности : учеб.-метод. пособие / С. Е. Дромашко [и др.]. – Минск : Ин-т подгот. науч. кадров Нац. акад. наук Беларуси, 2011. – 70 с.

13. Левенко Б. А. Трансгенные растения. Современное состояние. Проблемы. Перспективы / Б. А. Левенко. – Киев : Дошкольник, 2000. – 305 с.
14. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений / Л. А. Лутова. – СПб : Изд-во С.-Петерб.ун-та, 2003. – 228 с.
15. Рудишин С. Д. Основи біотехнології рослин / С. Д. Рудишин. – Вінниця, 1998. – 224 с.
16. Вечернина Н. А. Биотехнология растений / Н. А. Вечернина. – Барнаул: АлтГУ, 2009. – 224 с.
17. Вечернина Н. А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений / Н. А. Вечернина. – Барнаул : Изд-во АлтГУ, 2004. – 205 с.
18. Сельскохозяйственная биотехнология: векторные системы молекулярного клонирования / Под ред. В. И. Негрука ; пер. с англ. Г. И. Эйснер. – М. : Агропромиздат, 1991. – 534 с.
19. Генная инженерия растений : Лабораторное руководство; пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера и др. – М. : Мир, 1991. – 408 с.
20. Коваленко В. П. Біотехнологія у тваринництві й генетиці / В. П. Коваленко, І. Ю. Горбатенко. – К. : Урожай, 1992. – 152 с.
21. Черепенко Е. И. Проблема репликации ДНК и генетические манипуляции с растениями / Е. И. Черепенко, А. П. Галкин. – К. : Наук. думка, 1987. – 160 с.
22. Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть : у 4 т.; Т. 1 / Під ред. В. В. Моргун. – К. : Логос, 2001 . – 641 с.
23. Уотсон Дж. Рекомбинантные ДНК : краткий курс / Дж. Уотсон, Дж. Туз, Д. Курц ; пер. с англ. – М. : Мир, 1986. – 288 с.:
24. Рекомбинантные молекулы : значение для науки и практики / Под ред. Р. Бирса и Э. Бэсита ; пер. с англ. – М. : Мир, 1980. – 624 с.
25. Щелкунов С. Н. Клонирование генов / Под ред. В. В. Власова. – Новосибирск : Наука, Сиб. отд-ние, 1986. – 230 с.

26. Щелкунов С. Н. Конструирование гибридных молекул ДНК / Под ред. В. В. Власов. – Новосибирск : Наука, 1987. – 168 с.
27. Новое в клонировании ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера ; пер. с англ. – М. : Мир, 1989. – 368 с.
28. Руденко С. С. Бібліотеки та карти геномів / С. С. Руденко. – Чернівці : Рута, 1995. – 65 с.
29. Бейли Дж. Основы биохимической инженерии / Дж. Бейли, Д. Оллис. – Ч. 2. – М. : Мир, 1989. – 590 с.
30. Бужієвська Т.І. Основи медичної генетики : навч. посіб. / Т. І. Бужієвська. – К. : Здоров'я, 2001. – 136 с.
31. Бердышев Г. Д. Биологическая инженерия и старение / Г. Д. Бердышев. – К. : Вища шк. Головное изд-во, 1988. – 72 с.

Методичні вказівки щодо виконання лабораторних робіт з навчальної дисципліни «ДНК-технології та корекція генофонду популяцій» для студентів денної форми навчання зі спеціальності 101 – «Екологія» освітньо-професійної програми «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Укладачі: к. т. н., доц. А. В. Пасенко
ст. викладач О. О. Никифорова

Відповідальний за випуск в.о. завідувача кафедри біотехнологій та біоінженерії,
доц. О. В. Новохатько

Підп. до др. _____ . Формат 60×84 1/16. Папір тип. Друк ризографія.
Ум. друк. арк. _____. Наклад _____ прим. Зам. № _____ Безкоштовно.

Видавничий відділ
Кременчуцького національного університету
імені Михайла Остроградського
вул. Першотравнева, 20, м. Кременчук, 39600