

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КРЕМЕНЧУЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ МИХАЙЛА ОСТРОГРАДСЬКОГО



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ЩОДО ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ
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 практичних занять 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.....	4
ПЕРЕЛІК ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ	6
Практичне заняття № 1	6
Тема. Організація лабораторії молекулярної генетики. Правила безпеки роботи у лабораторії з використанням ДНК-технологій. Рівні фізичного та біологічного захисту	6
Практичне заняття № 2	11
Тема. Ферменти – «інструменти» ДНК-технологій	11
Практичне заняття № 3	15
Тема. Полімеразна ланцюгова реакція. ПЛР-лабораторія	15
Практичне заняття № 4	21
Тема. Секвенування ДНК	21
Практичне заняття № 5	25
Тема. ДНК-діагностика. Персональна геноміка.....	25
КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ ЗНАНЬ СТУДЕНТІВ	31
ДОДАТОК А	33
ЛІТЕРАТУРА.....	34

ВСТУП

Біотехнологія – це галузь діяльності людини, заснована на знаннях і методах біохімії, мікробіології, генетики, імунології, хімічної технології та дозволяє отримувати користь з властивостей мікроорганізмів і культур клітин в промислових процесах. Біотехнологію розглядають як промислове використання біологічних процесів і агентів на основі отриманих високоефективних форм мікроорганізмів, культур клітин, тканин рослин і тварин із заданими властивостями, метаболізм біосинтетичних можливості яких забезпечують продукування специфічних речовин, використовуваних людиною.

Генетика – це наука, що вивчає закономірності передачі ознак від батьківських особин до нащадків. Ця дисципліна розглядає їх властивості і здатність до мінливості. При цьому в якості носіїв інформації виступають особливі структури – гени. В даний час наука має достатньо інформації. Вона має кілька розділів, кожен з яких володіє своїми завданнями і об'єктами досліджень. Найбільш важливі з розділів: класична, молекулярна, медична генетика і гenna інженерія.

Щоб зрозуміти мову генетики, треба добре розуміти, що позначають генетичні поняття: домінантний ген, що рецесивний ген, алельні гени, гомозигота, гетерозигота, фенотип, генотип, гамета, диплоїдний набір хромосом, гаплоїдний набір хромосом, гібриди, схрещування, перше покоління, друге покоління, батьківські форми, і як все це записується генетичним мовою.

Спадковість – це здатність організму передавати свої ознаки, особливості розвитку наступним поколінням.

Елементарною одиницею спадковості є гени, розташовані в хромосомах. Передача ознак у спадок здійснюється в процесі розмноження.

Мінливість – властивість організму набувати нових ознак у процесі індивідуального розвитку. Сукупність усіх спадкових ознак організму (генів) називається генотипом.

Метою навчальної дисципліни є вивчення основних правил та понять як:

- Організація лабораторії молекулярної генетики. Правила безпеки роботи у лабораторії з використанням ДНК-технологій. Рівні фізичного та біологічного захисту.
- Ферменти – «інструменти» ДНК-технологій.
- Полімеразна ланцюгова реакція. ПЛР-лабораторія.
- Секвенування ДНК.
- ДНК-діагностика. Персональна геноміка.

В результаті вивчення навчальної дисципліни студент повинен знати та вміти:

- Дотримуватися правил техніки безпеки, охорони праці в галузі, професійної безпеки, протиепідемічного режиму, чинних наказів МОЗ України під час роботи з інфікованим матеріалом, культурами мікроорганізмів, обладнанням, тощо.
- Ферменти, що використовуються в генно-інженерних дослідках.
- Метод ПЛР та діагностику інфекційних захворювань.
- Етапи секвенування ДНК.
- Методи ДНК-діагностики та поняття «персональна геноміка».

ПЕРЕЛІК ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

Практичне заняття № 1

Тема. Організація лабораторії молекулярної генетики. Правила безпеки роботи у лабораторії з використанням ДНК-технологій. Рівні фізичного та біологічного захисту

Мета: вміти дотримуватися правил техніки безпеки, охорони праці в галузі, професійної безпеки, протиепідемічного режиму, чинних наказів МОЗ України під час роботи з біоматеріалом, культурами організмів, обладнанням, тощо.

Навчальні елементи: молекулярна генетика, лабораторія молекулярної генетики, бокс біологічної безпеки, дезінфекція.

Короткі теоретичні відомості

Сучасна лабораторія молекулярної генетики – це комплекс приміщень, обладнання і приладів, які забезпечують роботу з генетичним матеріалом біологічних об'єктів. До її складу входять: кімната для генетичних досліджень, або навчальна лабораторія, стерилізаційна, посівна (бокс), мийка і лаборантська кімната. Всі приміщення повинні бути добре освітлені і вентилязовані, стіни на висоту до 170 см від підлоги пофарбовані масляною фарбою або викладені плиткою (для вологого прибирання із застосуванням дезінфікуючих розчинів). Лабораторне приміщення обладнане шафами, де зберігаються апаратура і реактиви, термостатом для вирощування організмів, біоматеріалу і лабораторними столами, покритими термо- та хімічно стійким матеріалом, лабораторними стільцями. На лабораторних столах до кожного робочого місця підведено електроенергію і газ (встановлені газові пальники Теклю).

Правила роботи у лабораторії молекулярної генетики.

Під час роботи у лабораторії молекулярної генетики необхідно дотримуватись таких правил:

1. Не заходити до лабораторії у верхньому одязі, працювати тільки в халаті.

2. Перед початком роботи переконатися в тому, що робочий стіл не зашарашений різними предметами.

3. Під час роботи уникати метушні, не відчиняти і не зачиняти двері й вікна, оскільки це спричиняє переміщення повітря і зміну температури у різних частинах приміщення.

4. Дотримуватися чистоти і порядку в лабораторії: не палити, не їсти, не торкатися обличчя немитими руками, не кидати нічого на підлогу. Реактиви слід здавати черговому лаборанту.

5. Після закінчення заняття прибрати своє робоче місце і ретельно вимити руки.

6. Студенти і викладачі повинні зробити запис у спеціальному журналі про проведення інструктажу та ознайомлення з режимом роботи в лабораторії.

Примітка: Кожен студент працює на постійному місці, виконує завдання індивідуально. На робочому місці потрібно підтримувати зразковий порядок. Особисті речі повинні зберігатися в спеціально відведеному місці.

Правила техніки безпеки у лабораторії молекулярної генетики.

У лабораторії молекулярної генетики необхідно підтримувати певний режим і дотримуватися таких застережних заходів:

1. Працювати у чистих білих халатах і шапочках або хустинках, волосся має бути підібраним. Слід мати індивідуальний рушник або серветки для витирання рук.

2. Пробірки та колби з біоматеріалом чітко підписувати чорнилом по склу. На склянках або крапельницях з реактивами і розчинами мають бути етикетки.

3. Під час роботи зі спиртівками слід остерігатись займання парів спирту. Не можна запалювати спиртівку від іншої палаючої спиртівки. Запалювати спиртівку можна лише сірниками, гасити полум'я – спеціальними ковпачками.

4. У разі займання ватних пробок на них не можна дмухати, оскільки це посилює горіння. Палаючі ватні пробки треба ввести у пробірки, колби або накрити зверху рушником (тканиною).

5. Біоматеріал не має забруднювати руки, стіл і оточуючі предмети. Петлі та голки після кожного контакту з біоматеріалом слід прожарювати у полум'ї спиртівки або газового пальника і ставити у спеціальний штатив. У разі випадкового потрапляння біоматеріалу на шкіру дослідника, або стіл чи підлогу пролиту завесь необхідно знешкодити за допомогою дезінфікувальних засобів.

6. Предметні й покривні скельця, піпетки після роботи помістити у дезінфікувальний розчин, потім ретельно промити у проточній воді. Піпетки після цього простерилізувати.

7. Поверхню твердих середовищ з мікробами у пробірках і чашках Петрі залити дезінфікувальними розчинами, через добу середовище викинути, а посуд промити і простерилізувати. Посуд мити лише в гумових рукавицях.

8. Суворо дотримуватися правил роботи з апаратами, що працюють під тиском, напругою або при високій температурі.

9. Категорично забороняється виносити мікробні культури за межі лабораторного приміщення.

10. Необхідно дотримуватися особистої гігієни: ретельно дезінфікувати і мити руки з милом перед вживанням їжі і після закінчення роботи, для цього можна використовувати 1 %-й розчин дегміну або 70 %-й розчин етилового спирту.

Залежно від призначення лабораторія молекулярної генетики (навчальна, виробнича, науково-дослідна) складається з кількох приміщень: кімнати для мікроскопічних робіт, біохімічної лабораторії, стерилізаційної, мийної та термостатної кімнат. Усі приміщення мають бути сухі, добре освітлені, оснащені вентиляцією, мати підведення газу, гарячої та холодної води.

Приміщення лабораторії молекулярної генетики має виходити вікнами на північ або північний захід, оскільки для мікроскопії потрібне рівне розсіяне

світло. Природна освітленість робочого приміщення має відповідати коефіцієнту 1:5. Стіну фарбують олійною фарбою світлих кольорів, підлогу покривають лінолеумом або кахельною плиткою, які легко миються. Стіл для мікроскопа розміщують так, щоб світло падало зліва чи спереду. Поверхню стола покривають пластиком або лінолеумом, що полегшує його миття та дезінфекцію.

У лабораторії молекулярної генетики двічі на день проводять вологе прибирання. Підлогу, стіни й меблі періодично пилють і протирають дезінфікувальними розчинами: 2 – 3 %-м розчином соди (двовуглекислого натрію), 0,5 – 3 %-м розчином дегміну, 3 – 6 %-м розчином пероксиду водню з додаванням 0,5 %-го мийного засобу та ін. Двічі на місяць рекомендується приміщення опромінювати бактерицидними переносними лампами (ОБПс-415) – від 30 хв до кількох годин.

Деякі роботи з організмами (пересіви чистих культур, виділення мікроорганізмів та ін.) виконують у спеціальному ізольованому приміщенні – боксі площею 3 – 5 м². Його поділяють на дві частини: робоче приміщення й передбоксік, що виключає різку циркуляцію повітря та занесення мікроорганізмів ззовні. У боксі встановлюють стіл, стільці, газові пальники, підвішують або прикріплюють на висувному кронштейні бактерицидні лампи. Приміщення боксу періодично миють і дезінфікують, перед початком роботи протягом 30 – 60 хв опромінюють бактерицидними лампами. Бокси доцільно обладнувати системою припливної вентиляції повітря. Перш ніж потрапити у бокс повітря проходить через систему фільтрів для вилучення мікроорганізмів. У приміщеннях С і Д класів чистоти кратність обміну повітря становить 5 – 15 об'ємів повітря за годину, а максимальна концентрація життєздатних мікроорганізмів – 100 – 500 КУО у 1 м³. За відсутності ізольованого боксу можливе використання ламінарних боксів, обладнаних системами постачання стерильного повітря.

Біохімічну лабораторію обладнують хімічними столами, витяжними шафами, технічними та аналітичними вагами, фотоелектроколориметрами, рН-

метрами та іншими необхідними приладами, холодильниками, шафами для посуду та хімічних реактивів.

У препаративній кімнаті встановлюють робочі столи, шафи для інструментарію, стерильного посуду, центрифуги, холодильники для зберігання чистих культур, термостати.

В окремій стерилізаційній кімнаті розміщують автоклави для стерилізації поживних середовищ і посуду, сушильні шафи, стерилізатори інструментів.

Мийну кімнату обладнують зручними раковинами з підведенням гарячої та холодної води, стелажами та шафами для сушіння посуду, плитами для приготування поживних середовищ, вагами, дистильаторами води.

У термостатній кімнаті розміщують стелажі для встановлення засіяних колб і пробірок, на спеціальних фундаментах – ротаційні качалки.

У лабораторії молекулярної генетики мають бути такі прилади, посуд, матеріали та інвентар:

1. термостати сухоповітряні або водяні для вирощування організмів при постійній заданій температурі;

2. автоклави для стерилізації посуду, поживних середовищ та інших матеріалів насиченою парою під тиском;

3. сушильні шафи з терморегулятором для сушіння і стерилізації лабораторного посуду, для висушування різних матеріалів до постійної маси;

4. холодильники для зберігання музейних і робочих культур організмів, поживних середовищ, реактивів і розчинів;

5. центрифуги, рН-метри, рефрактометри, фотоелектроколориметри, спектрофотометри, фільтри Зейтца та інші бактеріальні фільтри, скляний посуд (пробірки біологічні, чашки Петрі, колби Ерленмейера, плоскодонні, конічні, мірні; піпетки градуйовані, піпетки Мора, пастерівські піпетки з відтягнутим капіляром, крапельниці, бюретки, лійки, циліндри, бюкси, склянки та ін.), інвентар (бактеріологічні петлі та голки, пінцети, ножиці, свердла для пробок,

металічні циліндри для піпеток, штативи, вата, марля для виконання різних мікробіологічних робіт).

Завдання до теми

1. Зобразити будову мікроскопа.
2. Зобразити комплектацію робочого місця з дотримання правил безпеки у лабораторії з використанням ДНК-технологій та без дотримання цих правил.
3. Замалювати спецодяг для працюючого у лабораторії молекулярної генетики.

Контрольні питання

1. Що таке сучасна лабораторія ДНК-технологій?
2. Назвати правила роботи з мікроскопом?
3. Які існують правила роботи з предметними стеклами?
4. Яких правил безпеки слід дотримуватися при роботі у лабораторії молекулярної генетики?

Література: [1–31].

Практичне заняття № 2

Тема. Ферменти – «інструменти» ДНК-технологій

Мета: розглянути ферменти, що використовуються в генно-інженерних дослідках.

Навчальні елементи: ферменти, ДНК, РНК, генна інженерія, зворотна транскрипція, синтез.

Короткі теоритичні відомості

Генна інженерія – галузь молекулярної генетики, завдання якої – конструювати генетичні структури за заздалегідь наміченим планом, створювати організми з новою генетичною програмою. Виникнення генної інженерії стало можливим завдяки синтезу ідей і методів молекулярної біології, генетики, біохімії і мікробіології. Основні принципи генної інженерії були розроблені в 60–70-х роках ХХ ст. Вони включали три основних етапи:

а) отримання генетичного матеріалу (штучний синтез або виділення природних генів);

б) включення цих генів у генетичну структуру, яка реплікується автономно (векторну молекулу ДНК), тобто створення рекомбінантної молекули ДНК;

в) введення векторної молекули (із включенням у неї генома) у клітину-реципієнта, де вона вмонтовується в хромосомних апаратах.

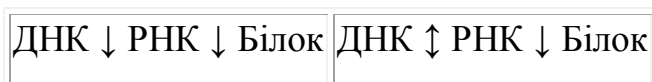
Експериментальне перенесення генів в інший геном називається трансгенезом. Він ґрунтується на технології рекомбінантної ДНК. В основі генної інженерії лежать різні методи маніпуляцій із молекулами ДНК.

У сучасній генетиці використовують два способи синтезу генів поза організмом – хімічний і ферментативний.

Ферменти (від лат. fermentum – бродіння), або ензими (від грец. ep – всередині, sume – закваска) – білкові сполуки, які є біологічними каталізаторами.

Для хімічно-го синтезу необхідно мати повністю розшифровану послідовність нуклеотидів ДНК.

Ферментативний синтез генів здійснюють за допомогою процесу зворотної транскрипції. Відкриття цього процесу зроблено на пухлиноутворювальних РНК-умісних вірусах. Проте згодом виявилось, що передавання генетичної інформації з іРНК на ДНК може відбуватися в умовах експерименту і з іншими РНК. Саме це лежить в основі ферментативного синтезу гена. Спрощено це можна подати так: у пробірці на матриці іРНК за допомогою ферменту зворотної транскриптази (ревертази) синтезується комплементарна до неї нитка ДНК, потім утворюється двониткова молекула ДНК. Після цього іРНК руйнується ферментом рибонуклеазою, отриману ДНК називають ДНК-копією (кДНК). Така кДНК не має вставок-інтронів, тобто схема її будови не відрізняється від бактеріального гена.



Ферментативний синтез генів має велике значення, тому що принципово можливо проводити штучний синтез будь-яких індивідуальних генів шляхом транскрипції їх із відповідних матричних РНК. Основною перешкодою є синтез не структурних, а регуляторних частин генів, необхідних для їх нормальної роботи. Це здебільшого обмежує використання штучно синтезованих генів. У генній інженерії широко використовують так само і виділення природних генів з метою створення рекомбінативних молекул ДНК.

Ферменти - основний інструмент технології рекомбінантних ДНК, поділяються на групи:

- 1) Ферменти які синтезують фрагменти ДНК на матриці РНК.
- 2) Ферменти за допомогою яких здійснюється об'єднання фрагментів ДНК.
- 3) Ферменти, які використовують для одержання фрагментів ДНК.
- 4) Ферменти, які дозволяють здійснити зміни структури кінців фрагментів ДНК.
- 5) Ферменти, які застосовуються для приготування гібридизаційних проб.

1. ***РНК-залежна ДНК-полімераза (зворотна транскриптаза)*** – фермент класу трансфераз, що здійснює ДНК-ДНК-залежний синтез ДНК і синтез ДНК на матриці РНК (зворотна транскрипція). Ця реакція вимагає затравки (праймера), в якості якого використовується полідезоксиріботімідинова кислота [poly (dT)]. В результаті дії ферменту на матриці РНК із виникненням poly (dT) затравки утвориться комплекс ДНК-ДНК. Далі за допомогою РНК-аз або лужного гідролізу виділяють РНК ланцюг. ДНК, що залишилася, є копією РНК і називається кДНК. кДНК може бути перетворена в 2-ланцюгову ДНК за допомогою РНКазі Н або лужного гідролізу (для видалення мРНК), а також ДНК-полімерази І, що каталізує реакцію синтезу комплементарного ланцюга ДНК. Крім того, зворотна транскриптаза сама має активність РНКазі Н (тобто руйнує ланцюг РНК, що входить до складу ДНК-РНК-дуплекса). Подібно всім ДНК-полімеразам, зворотна транскриптаза здатна функціонувати тільки при

наявності затравки. In vivo зворотна транскриптаза синтезує двуланцюгову ДНК на матриці геномної РНК ретровірусів, підготовляючи її для інтеграції в геном клітини-хазяїна. Зворотна транскриптаза широко використовується в генній інженерії для клонування послідовностей нуклеотидів мРНК еукаріот. Вперше виявлена в 1970.

2. **ДНК-лігаза** – фермент, що каталізує утворення фосфодіефірних зв'язків між сусідніми нуклеотидами в молекулі ДНК. В технології рекомбінантних ДНК використовуються в основному дві ДНК-лігази: E. coli і T4. Обидві лігази служать для репарації одноланцюгових розривів у дуплексній молекулі ДНК і для з'єднання двох молекул ДНК шляхом лігування тупих або липких кінців. ДНК-лігаза вперше виділена Б.Вейсом і К.Річардсоном в 1966 р.

Також використовується РНК-лігаза фага T4. Цей фермент бере участь у синтезі олігорибо- і олігодезоксирибонуклеотидів без виникнення матриці, а також поєднує розриви в ланцюгах ДНК. Також РНК-лігазу використовують для введення радіоактивної мітки в 3'-кінець РНК.

3. **Ендонуклеази рестрикції** (рестриктази) поділяють на три класи:

а) ферменти, які впізнають певну послідовність і розрізають ДНК недалеко від цієї послідовності, але не в специфічній ділянці (I);

б) ферменти, що впізнають певну послідовність і розрізають подвійну спіраль ДНК в строго фіксованому місці всередині цієї послідовності (II);

в) ферменти, що впізнають певну послідовність і розрізають спіраль ДНК, відступаючи певну кількість нуклеотидів від кінця цієї послідовності (III).

Рестриктази II класу є основним інструментом при конструюванні рекомбінантних молекул ДНК і при аналізі структури ДНК.

По способу розрізання рестриктази поділяються на:

– ферменти, що розріжуть зі зміщенням;

– ферменти, що розріжуть точно в сайті рестрикції.

4. **До четвертої групи** входить велика кількість ферментів. Найбільш широко використовуються декілька груп:

1. Нуклеази, які специфічні у відношенні до одноланцюгових ДНК.
2. Нуклеази, специфічні стосовно 2-ланцюгової ДНК.

Завдання до теми

1. Навести схему виділення генів з природного матеріалу ферментативним способом.
2. Записати процес одержання рекомбінантних ДНК.
3. Привести приклади генів ссавців, виражених у *E. coli* (див. додаток А).

Ген	Метод створення

Контрольні питання

1. Що означають терміни реплікон, реплікація?
2. Як відбувається реплікація ДНК в еукаріотів?
3. Що таке помірні фаги? Яка різниця між фагами, що викликають специфічну та загальну трансдукцію?
4. Яку роль виконують плазміди у життєдіяльності бактеріальних клітин? З якою метою їх використовують в генетичній інженерії?

Література: [1–31].

Практичне заняття № 3

Тема. Полімеразна ланцюгова реакція. ПЛР-лабораторія

Мета: розібрати метод ПЛР; розшифрувати діагностику інфекційних захворювань.

Навчальні елементи: ПЛР, ампліфікатор, праймер, буферний розчин, «in vivo», «in vitro».

Короткі теоритичні відомості

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР або PCR) – експериментальний метод молекулярної біології, спосіб значного збільшення малих концентрацій бажаних фрагментів ДНК в біологічному матеріалі (пробі). Крім простого збільшення числа копій ДНК (цей процес називається ампліфікацією), ПЛР

дозволяє проводити безліч інших маніпуляцій з генетичним матеріалом (введення мутацій, зрощення фрагментів ДНК), і широко використовується в біологічній і медичній практиці, наприклад для клонування генів, введення мутацій, виділення нових генів, секвенування, для створення генетично модифікованих організмів, діагностики захворювань (спадкових, інфекційних), ідентифікації малих кількостей ДНК, встановлення батьківства.

Метод заснований на багатократному виборчому копіюванні певної ділянки ДНК за допомогою ферментів *in vitro* (в штучних умовах). При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка задовольняє заданим умовам, і лише в тому випадку, якщо він присутній в досліджуваному зразку.

За допомогою ПЛР зазвичай можуть бути ампліфіковані відносно короткі (до 10 kbp) ділянки ДНК з відомими кінцями, у окремих випадках можуть використовуватися ділянки до 40kbp.

Для проведення ПЛР в найпростішому випадку потрібні наступні компоненти:

1. ДНК-матриця, тобто фрагмент ДНК, що містить ту ділянку, яку потрібно

ампліфікувати.

2. Два праймера, комплементарні кінцям необхідного фрагменту.
3. Термостабільна ДНК-полімераза.
4. Дезоксинуклеотидтрифосфати (A, G, C, T).
5. Буферний розчин.

ПЛР проводять в ампліфікаторі – приладі, що забезпечує періодичне охолодження і нагрівання тестових трубочок з розчином, зазвичай з точністю не менше 0,1 °С.

Різновіди ПЛР:

- Вкладена ПЛР (англ. Nested PCR) – застосовується для зменшення частки побічних продуктів реакції. Використовують дві пари праймерів і

проводять дві послідовні реакції. Друга пара праймерів ампліфікує ділянку ДНК усередині продукту першої реакції.

- Інвертована ПЛР (англ. Inverse PCR) – використовується в тому випадку, якщо відома лише невелика ділянка усередині потрібної послідовності. Цей метод особливо корисний, коли потрібно визначити фланкуючі послідовності після вставки ДНК в геном. Для здійснення інвертованої ПЛР проводять ряд розрізів ДНК рестриктазами з подальшим лігуванням. В результаті відомі фрагменти утворюються на обох кінцях невідомої ділянки, після чого можна проводити ПЛР як завжди.

- ПЛР із зворотною транскрипцією (або ЗТ-ПЛР, англ. Reverse Transcription PCR, RT PCR) – використовується для ампліфікації, виділення або ідентифікації відомої послідовності з бібліотеки РНК. Перед звичайною ПЛР проводять транскрипцію молекули РНК за допомогою зворотної транскриптази і отримують комплементарну ДНК (кДНК). Цим методом часто визначають, де і коли експресуються дані гени.

- Асиметрична ПЛР (англ. Assymetric PCR) – проводиться тоді, коли потрібне ампліфікувати переважно один з ланцюжків початкової ДНК. Використовується в деяких методиках секвенування і гібридаційного аналізу. ПЛР проводиться як завжди, за винятком того, що один з праймерів береться у великому надлишку.

- Кількісна ПЛР (англ. Quantitative PCR, Q-PCR) – використовується для швидкого вимірювання кількості певної ДНК, кДНК або РНК в пробі.

- Кількісна ПЛР в реальному часі – в цьому методі використовують флуоресцентні мічені реагенти для точного вимірювання кількості продукту реакції у міру його накопичення.

- Touchdown ПЛР (англ. Touchdown PCR) – за допомогою цього методу зменшують вплив неспецифічного скріплення праймерів на утворення продукту.

In vivo ПЛР включає кілька стадій:

- 1.) Денатурація ДНК.
- 2.) Освіта коротких дволанцюгових ділянок ДНК.
- 3.) Синтез ланцюга ДНК.

1-й етап. Денатурація ДНК – розплітання подвійної спіралі при температурі 93-95°C протягом 30-40 с.

Одна з ланцюгів (+) використовується в якості основної матриці. Її п'ять штрих-решт фіксуються ферментом ДНК-полімеразою, що забезпечує побудову з окремих нуклеотидів другого ланцюга ДНК, комплементарної першої. Те ж саме, тільки в зворотному напрямку, відбувається та другої нитки ДНК, проте, оскільки розплітання молекули ДНК йде у зворотному порядку, нова ланцюг будується невеликими фрагментами, які потім зшиваються. Для того щоб фермент ДНК-полімераза почав свою роботу, потрібна наявність затравки або праймера — невеликого одноцепочечного фрагмента ДНК, який, з'єднуючись з комплементарним ділянкою одного з ланцюгів батьківського ДНК, утворює стартовий блок для нарощування дочірньої нитки.

2-й етап. Відпал – приєднання праймерів при температурі 50-65°C протягом 20-60 с.

Праймер – це хімічно синтезовані затравки олигонуклеотидної природи для полімеразної ланцюгової реакції, що визначають межі ампліфікованого ділянки ДНК-матриці і комплементарні протилежним їй ланцюгів. При його розробці необхідно знайти фрагмент молекули ДНК, який відрізнявся б генетичної консервативністю і був би присутній тільки у нас цікавить виду мікроорганізмів, при цьому довжина фрагмента повинна становити приблизно 20 п.н. Підбір праймерів визначає специфічність: чим довше праймер, тим вище специфічність реакції. Виконати цю роботу допомагають спеціальні комп'ютерні програми. Відповідно до знайденої послідовності нуклеотидів синтезується праймер.

3-й етап. Елонгація – добудовування ланцюгів ДНК при температурі 70-72°C протягом 20-40 с.

Механізм копіювання такої, що комплементарне добудовування ниток може початися не в будь-якій точці послідовності ДНК, а лише в певних стартових блоках (коротких двунитевих ділянках). Для створення стартових блоків в заданих ділянках ДНК використовують приманки, що представляють собою олигонуклеотиди довжиною близько 20 п. н. також звані праймерами. Вони комплементарні послідовності ДНК на лівій і правій межах специфічного фрагмента і орієнтовані таким чином, що синтез ДНК, здійснюваний ДНК-полімеразою, протікає тільки між ними.

За допомогою ПЛР знаходять:

- вірус гепатиту (А, В, С);
- уреплазму уреалитикум;
- уреплазму парвум;
- хламідію трахоматіс;
- кандіду;
- мікоплазму хоминіс;
- мікоплазму гениталиум;
- гарганеллу вагіналіс;
- трихомоназ;
- мікобактерію туберкульозу;
- вірус простого герпесу 1 і 2 типу;
- вірус папіломи;
- вірус Епштейна-Барра;
- хелікобактер пілорі;
- вірус імунодефіциту.

Розшифровка результатів ПЛР.

Трактування виявлених показників однакова що у чоловіків, що і у жінок. В результаті аналізів ПЛР так і вказується: виявлено (позитивно) або не виявлено (негативно) .

Якщо нічого не виявлено, то значить це норма і пацієнт здоровий або вийшов псевдонегативну результат, а особливо про це свідчить той факт, коли у людини яскраво виражена симптоматика. Найчастіше так відбувається з статевими інфекціями, так як дослідження вимагає серйозної підготовки. Перед аналізом не можна мочитися хоча б 2 години, займатися спринцеваниєм, а жінкам потрібно чекати закінчення менструації і не вставляти вагінальні свічки перед дослідженням.

Кров треба здавати на голодний шлунок, а інші дослідження не вимагають спеціальної підготовки. В іншому випадку результати вийдуть помилковими, а лікар не зможе діагностувати захворювання і зрозуміти, як лікувати пацієнта.

Якщо в аналізі написано « виявлено », то це точно говорить про наявність інфекції і про супутньому збудника захворювання. У нормі інфекції та віруси повинні бути відсутніми.

Завдання до теми

1. Зобразити схему стадій реалізації ПЛР.
2. Записати переваги та недоліки методу ПЛР.
3. Замалювати техніку «in vitro», «in vivo» та «in situ».

Контрольні питання

1. Що таке полімеразна ланцюгова реакція?
2. Які компоненти потрібні для проведення ПЛР?
3. Які є різновиди ПЛР?
4. Які хвороби знаходять за допомогою ПЛР?
5. Як розшифрувати результати ПЛР?

Література: [1–31].

Практичне заняття № 4

Тема. Секвенування ДНК

Мета: розібрати етапи секвенування ДНК.

Навчальні елементи: секвенування, аденін, гуанін, цитозин, тимін.

Короткі теоретичні відомості

Клонований або ампліфікований фрагмент ДНК можна дослідити різними способами, однак найвичерпнішу інформацію дає встановлення нуклеотидної послідовності (sequence) фрагмента – секвенування.

Секвенування – останній етап молекулярного аналізу попередньо відібраного, клонованого і протестованого більш простими методами фрагмента ДНК. Секвенування являє собою визначення нуклеотидної послідовності фрагмента ДНК шляхом отримання серії молекул комплементарних ДНК, що розрізняються справжні одну підставу.

На рис. 1 показано схему найбільш популярного сьогодні методу Сангера (Frederick Sanger). До одноланцюгової ДНК-матриці додається радіоактивно-мічений праймер, повний набір дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP), ДНК-полімераза та невелика кількість дидезоксинуклеозидтрифосфату одного із чотирьох типів (наприклад, ddATP). Дидезоксинуклеотид відрізняється тим, що містить атом Н замість ОН-групи не тільки при 2', а також і при 3' атомі пентози. Включення такого нуклеотиду в ланцюг, що синтезується, приведе до зупинки подальшого зростання ланцюга внаслідок відсутності 3' ОН-групи на його кінці. Оскільки ddATP присутній у невеликій кількості, така подія буде відбуватися в різних точках ланцюга – в усіх, де аденін розташований напроти тиміну в складі матриці. Шляхом денатурації продуктів реакції отримаємо набір мічених одноланцюгових фрагментів від праймера до кінцевого аденіну. Довжина цих фрагментів у нуклеотидах визначить порядковий номер аденіну в складі ланцюга.

З метою визначення довжини фрагментів проводять гель-електрофорез у денатуруючих умовах, на сусідні лунки гелю наносять також продукти синтезу у присутності інших дидезоксинуклеотидів.

Існує два основних метода секвенування: метод Максама-Гілберта (замість ферментативного синтезу застосовують хімічне розривання ланцюга на нуклеотиді певного типу. Отримані фрагменти різної довжини так само розділяють за допомогою електрофорезу) і метод Сангера (дидезокси-метод). Метод Сангера більш надійний і простий у виконанні, і на практиці його використовують частіше.

Метод Сангера заснований на синтезі досліджуваної ланцюга ДНК *in vitro* з зупинкою синтезу на заданому підставі шляхом приєднання дидезоксинуклеотида. Дидезоксинуклеотид позбавлений гідроксильних груп при атомах цукрового кільця не тільки у 2'-, але і в 3'-положенні, що робить його нездатним формувати фосфодизфирну зв'язок з наступним нуклеотидом. Такі дидезоксинуклеотиди отримують шляхом синтезу.

Для проведення секвенування необхідні:

- секвенируючий праймер (штучно синтезована олигонуклеотидная послідовність, комплементарна певній ділянці вихідної молекули ДНК),

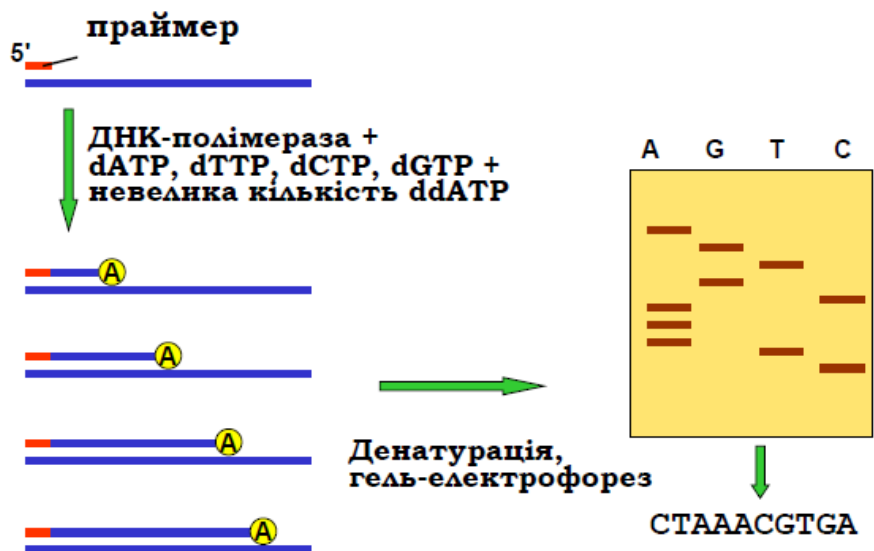


Рис. 1. Секвенування ДНК за Сенгером: схема синтезу ДНК у присутності дидезокси-АТР (ліворуч).

- чотири пробірки з набором з чотирьох дезоксинуклеотидов dATP, dCTP, dGTP і dTTP, один з яких ізотопно мічений відповідно потрібно додати

одному з чотирьох дидезоксинуклеотидов (ddATP, ddCTP, ddGTP і ddTTP), і ДНК-полімераза.

Шляхом аналогічної процедури для інших трьох дидезоксинуклеотидів отримуємо набір одноланцюгових фрагментів, що аналізуються за допомогою гель-електрофорезу в денатуруючих умовах (праворуч) – розподіл смуг дозволяє прочитати послідовність (праворуч унизу).

Метод Сенгера використовується сьогодні автоматичними секвенаторами, в яких замість радіоактивно-мічених застосовуються флуоресцентно-мічені праймери. Для кожної з чотирьох реакцій беруть чотири різні флуоресцентні мітки, котрі випромінюють світло в різних спектральних діапазонах. Продукти всіх чотирьох реакцій наносять на гель для електрофорезу разом. Сканування гелю після електрофорезу лазерним променем, що збуджує флуоресценцію, дозволяє дискримінувати продукти різних реакцій, тобто різні кінцеві нуклеотиди, і, таким чином, негайно прочитати послідовність.

Здійснення секвенування кожного із фрагментів, які містяться в геномній бібліотеці клонів, і порівняння послідовностей фрагментів, що перекриваються, дозволяє розмістити клоновані фрагменти в порядку їхньої локалізації в геномі, тобто встановити повну послідовність геному.

Сам метод включає наступні етапи:

- 1) гібридизацію досліджуваного фрагмента ДНК з праймером,
- 2) ферментативний синтез ДНК,
- 3) денатурацію отриманих продуктів формаamidом (в результаті утворюються унікальні розрізняються по довжині олігонуклеотидні послідовності, що містять праймер),
- 4) електрофорез у поліакриламідному гелі на чотирьох доріжках (за кількістю типів нуклеотидів)
- 5) аналіз результатів на радиоавтографі.

На більшості радиоавтографів можна чітко розрізнити 250-350 смуг, тобто прочитати послідовність у 250-350 п. н. Нуклеотидна послідовність на радиоавтографі зчитується знизу вгору.

Для прочитування довгих послідовностей існує ряд методів, що представляють собою різні модифікації методу Сангера. Ці методи засновані на попередньому клонуванні ДНК в векторах, сконструйованих на основі фага M13 E. coli для отримання протяжних одноланцюгових ділянок ДНК, які можуть бути безпосередньо секвенировані без денатурації і праймування. Особливість фага M13 E. coli полягає в можливості його існування у двох формах: дволанцюжкової реплікативної, що функціонує як плазміда, і одноланцюгової фагової, що використовується в якості матриці для секвенування. Виділивши після клонування одноцепочечные фаговые ДНК зі вставкою (розмір близько 500 п. н.), праймер гібридизує послідовність поблизу вставки, і проводять дидезоксисеквенирование.

Існують *швидкі методи автоматичного секвенування*. Один з них – секвенування шляхом гібридизації досліджуваної послідовності ДНК з набором олігонуклеотидів (олігонуклеотидной матрицею), що включає всі можливі варіанти перестановок з 4 стандартних нуклеотидів (А, G, С, Т) певної довжини. Найбільш зручними вважаються набори матриць (чіпи) з октануклеотидов., при цьому кількість можливих варіантів нуклеотидів складає 65536. Секвенируемый фрагмент ДНК, мічений радіоактивним фосфором, гібридується тільки з комплементарними його ділянках октануклеотидами.

У результаті визначається спектр октануклеотидов, що складають досліджуваний фрагмент ДНК. Локалізація октамеров в досліджуваному фрагменті ДНК встановлюється за допомогою спеціальної комп'ютерної програми.

Інший сучасний підхід у секвенуванні геномів (так зване *піросеквенування*), який реалізується на автоматизованих секвенаторах, дозволяє визначити послідовність значно швидше, дешевше і при цьому не потребує ані клонування ДНК, ані електрофорезу. Одноланцюгові фрагменти,

отримані з невеликої кількості геномної ДНК, пришивають 5'-кінцями до мікрокульок (один фрагмент на кульку) та ампліфікують за допомогою ПЛР. Кожну кульку із пришитими до неї ампліфікованими ідентичними фрагментами розміщують у мікрореакторі, де здійснюється ДНК-полімеразна реакція. Нуклеозидтрифосфати подаються в реакційну суміш імпульсно один за одним. Якщо нуклеотид певного типу виявляється комплементарним матриці та включається у зростаючий ланцюг, пірофосфат, що при цьому звільняється, залучається до низки хімічних реакцій, де остання реакція супроводжується випромінюванням світла (хемілюмінесценція). Світловий сигнал фіксується оптичною системою, і послідовність таких сигналів читається як нуклеотидна послідовність. Реакція здійснюється паралельно у 200 тис. Мікрореакторів (для 200 тис. фрагментів, які перекриваються), що дозволяє встановити послідовність приблизно 200 млн пар основ за 4,5 години.

Завдання до теми

1. Замалювати схему секвенування ДНК за Сенгером.
2. Зобразити обладнання для електрофорезу в поліакриламідному гелі.

Контрольні питання

1. Що таке секвенування?
2. Які методи секвенування бувають?
3. Що потрібно для проведення секвенування?
4. Які етапи включає метод секвенування?
5. У чому полягає метод автоматичного секвенування?

Література: [1–31].

Практичне заняття № 5

Тема. ДНК-діагностика. Персональна геноміка.

Мета: вивчити методи ДНК-діагностики; розібрати поняття «персональна геноміка».

Навчальні елементи: ген, геноміка, протеоміка,

Короткі теоритичні відомості

З допомогою прямих методів виявляються порушення у первинної нуклеотидної послідовності ДНК (мутації та їх типи). Прямі методи відрізняються точністю, яка досягає майже 100 %. Проте на практиці зазначені методи можуть застосовуватися при певних умовах:

- 1) відомої цитогенетической локалізації гена, відповідального за розвиток спадкового захворювання;
- 2) повинен бути клонованим ген захворювання і відома його нуклеотидна послідовність.

Метою прямої діагностики є ідентифікація мутантних алелів (порушення первинної нуклеотидної послідовності ДНК, мутації та їх типи). Висока точність методу прямої ДНК-діагностики в більшості випадків не вимагає ДНК-аналізу всіх членів сім'ї, так як виявлення мутації у відповідному гені дозволяє майже зі 100-відсотковою точністю підтвердити діагноз і визначити генотип всіх членів сім'ї хворої дитини, включаючи гетерозиготних носіїв.

Недоліком методу прямої ДНК-діагностики є необхідність знання точної локалізації гена і спектру його мутацій. Методи прямої ДНК-діагностики показані для таких захворювань, як фенілкетонурія (мутація R408W), муковісцидоз – (найбільш часта мутація delF508), хорея Гентінгтона (експансія тринуклеотидних повторів-CTG-повтори) та ін.

Непрямі методи ДНК-діагностики засновані на аналізі зчеплення з досліджуваним геном певного поліморфного локусу (маркера), за допомогою якого можна проводити маркування як мутантних, так і нормальних алелів і проаналізувати їх передачу в поколіннях, тобто серед родичів обстежуваної особи. Це особливо важливо при вирішенні питання про пренатальної (допологової) діагностики спадкового захворювання.

Мутаційна мінливість сайтів рестрикції може бути визначена по зміні довжини рестрикційних фрагментів ДНК, гібридизуючихся зі специфічними ДНК-зондами (ПДРФ-аналіз; Restriction Fragment Length Polymorphism, або RFLP-аналіз).

Метод ПДРФ-аналізу включає проведення кількох етапів дослідження:

1. виділення геномної ДНК; рестрикція виділеної ДНК з допомогою специфічних ендонуклеаз;
2. електрофоретичне розділення фрагментів ДНК;
3. ідентифікація фрагментів ДНК, що містить поліморфний сайт рестрикції за допомогою блот-гібридизації по Саузерну.

При відсутності рестрикції ДНК за даними радиоавтографії буде виявлятися великий (нерозрізаний фрагмент, або бенд).

Таким чином, непряма ДНК-діагностика проводиться в наступних випадках:

- 1) коли ген не ідентифікований, а лише картирован на певній хромосомі;
- 2) коли методи прямої ДНК-діагностики не дають результату (наприклад, в силу великої протяжності гена або широкому спектрі мутаційних змін;
- 3) при складній екзонно-интронной організації гена.

Геноміка – розділ генетики, предметом дослідження якого є організація та функціонування геномів живих організмів.

Тривалий час геномом називали гаплоїдний набір хромосом. Накопичення відомостей про інформаційну ролі позахромосомних ДНК змінило визначення терміну «геном». В даний час він означає повний склад ДНКклітини, тобто сукупність всіх генів і міжгенних ділянок. Можна вважати, що геном – повний набір інструкцій для формування та функціонування індивіда.

Методи геноміки спрямовані на розшифровку нових закономірностей біологічних систем і процесів. Геноміка людини є основою молекулярної медицини та має найважливіше значення для розробки методів діагностики, лікування і профілактики спадкових і неспадкових хвороб. Для медицини першорядне значення мають дослідження в області геноміки патогенних мікроорганізмів, оскільки вони проливають світло на природу інфекційного процесу і створення ліків, спрямованих на специфічні мішені бактерій.

Геноміка, незважаючи на її «молодий вік», підрозділяється на кілька майже самостійних напрямків: структурну, функціональну, порівняльну, еволюційну, медичну геноміку.

1. **Структурна** геноміка вивчає послідовність нуклеотидів в геномах, визначає межі і будова генів, міжгенних ділянок та інших структурних генетичних елементів (промоторів, енхансери і т.д.), тобто складає генетичні, фізичні та транскриптні карти організму.

2. **Функціональна** геноміка. Дослідження в області функціональної геноміки спрямовані на ідентифікацію функцій кожного гена і ділянки геному, їх взаємодія в клітинній системі. Очевидно, це буде здійснюватися шляхом вивчення білкових ансамблів в різних клітинах. Цю область досліджень називають протеомікою.

3. **Порівняльна** геноміка вивчає подібності та відмінності в організації геномів різних організмів з метою з'ясування загальних закономірностей їх будови та функціонування.

4. **Еволюційна** геноміка пояснює шляхи еволюції геномів, походження генетичного поліморфізму та біорізноманіття, роль горизонтального переносу генів. Еволюційний підхід до вивчення генома людини дозволяє простежити за тривалістю формування комплексів генів, окремих хромосом, стабільністю його частин, недавно виявленими елементами «мінливості» генома, процесом расообрання, еволюцією спадкової патології.

5. **Медична** геноміка вирішує прикладні питання клінічної та профілактичної медицини на основі знання геномів людини і патогенних організмів (наприклад, діагностика спадкових хвороб, генотерапія, причини вірулентності хвороботворних мікроорганізмів і т.д.).

Всі кроки еволюції живої природи, безсумнівно, повинні були закріплюватися в інформаційній системі ДНК (а для деяких істот - в НК), а також в організації її в клітці для виконання консервативної функції збереження спадковості і протилежної функції - підтримки мінливості. Таке уявлення про формування генома кожного виду найбільш обгрунтовано. Стосовно до геному

людини можна сказати, що еволюція людини - це еволюція генома. Таке уявлення підтверджується тепер численними молекулярно-генетичними дослідженнями, оскільки стало можливим зіставлення геномів різних видів ссавців, у тому числі людиноподібних мавп, а також в межах виду *Homo sapiens* геномів різних рас, етносів, популяцій людини і окремих індивідів.

Організація генома кожного еукаріотичного виду являє собою послідовну ієрархію елементів: нуклеотидів, кодонів, доменів, генів з межгенними ділянками, складних генів, плечей хромосом, хромосом, гаплоїдного набору разом з позахромосомних і позаядерної ДНК. В еволюційному перетворенні генома кожен з цих ієрархічних рівнів міг вести себе зовсім дискретно (змінюючись, комбінуючи з іншими і т.д.).

Клінічні програми відомостей про геном людини:

<i>Етапи вивчення спадкової хвороби</i>	<i>Клінічні програми</i>
Реєстрація хвороби як спадкової форми	Медико-генетичне консультування
Локалізація гена в хромосомі	Диференціальна діагностика на основі аналізу зчеплення генів
Виділення гена	Генотерапія
Визначення дефекту гена	Діагностика (ДНК-специфічна)
Виявлення первинного продукту гена	Діагностика (біохімічна). Поліпшення лікування на основі розуміння патогенезу

Систематичне вивчення генома людини фактично почалося з застосування менделєвського аналізу спадкових ознак людини (початок ХХ століття). Генеалогічний метод увійшов тоді в широку практику, і крок за кроком став накопичуватися матеріал по «інвентаризації» дискретних спадкових ознак людини, але цей процес поступово уповільнювався (за 50 років

було відкрито не більше 400 модулюючих ознак і 4 групи зчеплення), можливості клініко-генеалогічного методу в чистому вигляді були вичерпані.

Завдання до теми

1. Описати метод генотерапії.
2. Зобразити схему будови гена.
3. Намалювати малюнок геному *E. Coli*.
4. Намалювати схему геному *Homo sapiens*.

Контрольні питання

1. Що таке ДНК-діагностика?
2. Які існують методи ДНК-діагностики?
3. Які напрямки має геноміка?
4. Які є типи геномів вірусу?

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 передбаченому навчальному матеріалі; можливі суттєві помилки у передбаченому навчальному матеріалі; можливі суттєві помилки у розв'язанні лабораторних завдань, але студент спроможний усунути їх за допомогою викладача.

«Незадовільно»

Виставляється студентіві, 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.

Приклади генів ссавців, виражених в E. coli:

Ген	Метод створення
1. Редуктази дигідрофолату миші	Зворотна транскрипція
2. Інсуліну щура	Зворотна транскрипція
3. Яєчного альбуміну	Зворотна транскрипція
4. Соматостатину людини	Хімічний синтез
5. Інсуліну людини	Зворотна транскрипція
6. Гормону росту людини	Хімічний синтез і зворотна транскрипція
7. Інтерферону людини	Зворотна транскрипція
8. Урокінази людини	Зворотна транскрипція
9. α -1 тимозину людини	Зворотна транскрипція

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 практичних занять 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