

**ДРОГОБИЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ імені ІВАНА ФРАНКА**

Галина Клепач, Наталія Голуб

МОЛЕКУЛЯРНА ДІАГНОСТИКА

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

Дрогобич, 2019

УДК 577.21(07)
К 48

Рекомендовано до друку вченою радою Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка посібник
(протокол № 7 від 27.06. 2019 р.)

Рецензенти:

Філь Віталій Михайлович, кандидат біологічних наук, доцент кафедри анатомії, фізіології та валеології Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка;

Лесик Ярослав Васильович, доктор ветеринарних наук, професор кафедри біології та хімії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка.

Відповідальний за випуск:

Монастирська Світлана Семенівна, кандидат біологічних наук, доцент кафедри біології та хімії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка.

Клепач Г. М.

К 48 **Молекулярна діагностика** : методичні рекомендації до практичних занять / **Галина Миколаївна Клепач, Наталія Ярославівна Голуб.** – Дрогобич : Редакційно-видавничий відділ Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка, 2019 – 96 с.

Методичні рекомендації є навчальним посібником, написаним відповідно до програми навчальної дисципліни “Молекулярна діагностика” для підготовки фахівців другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальності 091 “Біологія”, затвердженої вченою радою Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка (протокол № 3 від 19.03.2019р.). Посібник містить методичні поради до проведення практичних занять, практичні заняття з короткими теоретичними відомостями і завданнями до самостійного опрацювання, додатки.

ВСТУП

Мета молекулярної діагностики – формування у студентів знань про деякі сучасні й новітні методи, які застосовуються у діагностиці спадкових, набутих та інфекційних захворювань, наукові підходи до їх виконання та застосування на практиці.

Предметом дисципліни є науково-теоретичні засади та методологічні аспекти сучасних і новітніх методів молекулярної діагностики, які застосовуються у клінічній діагностиці спадкових і набутих захворювань, у гено-, онкодіагностиці, у науково-дослідницькій практиці молекулярної та клітинної біології. Серед новітніх молекулярно-діагностичних методів, які знаходять широке застосування у клінічних лабораторіях, – імуноцитохімічне генотипування клітин і його використання для діагностики ракових захворювань; гібридизація *in situ*, що дає змогу виявити специфічні нуклеїнові кислоти в інтактних клітинах, середовищах тканин і мазків; полімеразна ланцюгова реакція і її застосування для виявлення мінімальних кількостей вірусної ДНК у тканинах і цитологічних препаратах. Описані також молекулярно-діагностичні методи визначення відмінностей та ідентифікації ліків.

Молекулярна діагностика сформувалася у кінці 1970-х рр. завдяки відкриттям у молекулярній біології, генній і клітинній інженерії, розробці методу гібридизації на фільтрах тощо. У результаті цих відкриттів з'явилась реальна можливість виділяти ДНК і РНК з клітин організмів, здійснювати з ними різноманітні маніпуляції: секвенувати, ампліфікувати, розщеплювати, поєднувати з утворенням нових рекомбінантних поєднань, виявляти зміни, з'ясовувати функцію, отримувати великі кількості антитіл завдяки створенню гібридом. Один з напрямів – молекулярна клінічна діагностика – займається виявленням патологій, вивченням на молекулярному рівні причин їх виникнення і механізмів розвитку. Крім того, «молекулярний рівень» вміщає не тільки гени й мРНК, але й відповідні білкові продукти. Наскільки відомо, усі соматичні клітини містять однаковий набір генів, але тільки експресовані гени впливають на функціонування клітин як за норми, так і патології.

Важливі завдання курсу “Молекулярна діагностика”:

- формування знань про наукові напрями молекулярної діагностики;
- поглиблення знань про експериментальні відкриття, факти, явища, які є основою методів молекулярної діагностики;
- ознайомлення з методами молекулярної діагностики та їхнім використанням у медичній, клінічній та науково-дослідницькій практиці;
- формування уявлення про новітні методологічні підходи, які застосовуються у молекулярній діагностиці;
- одержання та узагальнення нових знань про молекулярно-діагностичні методи, скеровані на розв'язання важливих проблем сучасної

цивілізації: профілактика і лікування спадкових, інфекційних та неінфекційних захворювань, збереження фізіологічного та генетичного здоров'я;

– формування уявлення про соціально-економічні та етичні проблеми суспільства.

Мета посібника – сприяти студентам у засвоєнні навчального матеріалу з “Молекулярної діагностики”, ознайомити з важливими молекулярно-діагностичними методами, їхньою різноманітністю та застосуванням на практиці, закріпити набуті теоретичні знання, розширити і поглибити їх.

У посібнику наводяться методичні поради до виконання практичних занять та короткі теоретичні відомості до них, завдання підвищеної складності, а також словник термінів і додатки.

Значна увага у посібнику приділяється теоретичним аспектам молекулярно-генетичних, генно-інженерних, цитохімічних та імунологічних явищ, які стали основою для розробки методів молекулярної діагностики. Звертається увага на застосування новітніх розробок аналітичної біотехнології, нанобіотехнології у діагностиці захворювань, аналізі якості харчових продуктів та екології.

На запропонованих у посібнику практичних заняттях студенти ознайомлюються з методами виділення, аналізу та детекції нуклеїнових кислот, ферментами генної інженерії та деякими генно-інженерними методами, які знайшли застосування у діагностиці інфекційних і генних захворювань, генотипуванні, видовій ідентифікації, розглядаються методи секвенування ДНК, ознайомлюються з базами геномних і протеомних даних, учаться розв'язувати задачі й інпрентувати результати діагностики.

Матеріал посібника базується на отриманих раніше студентами знаннях із “Мікробіології і вірусології”, де вони ознайомилися із збудниками інфекційних захворювань людини, особливостями їхнього розмноження, “Біохімії”, де опанували перебіг метаболічних процесів у клітині, “Генетиці з основами селекції”, де вивчили механізми передачі та реалізації генетичної інформації на клітинному й організменому рівнях, “Біотехнології”, де ознайомились із досягненнями, методиками та інструментарієм генної і клітинної інженерії.

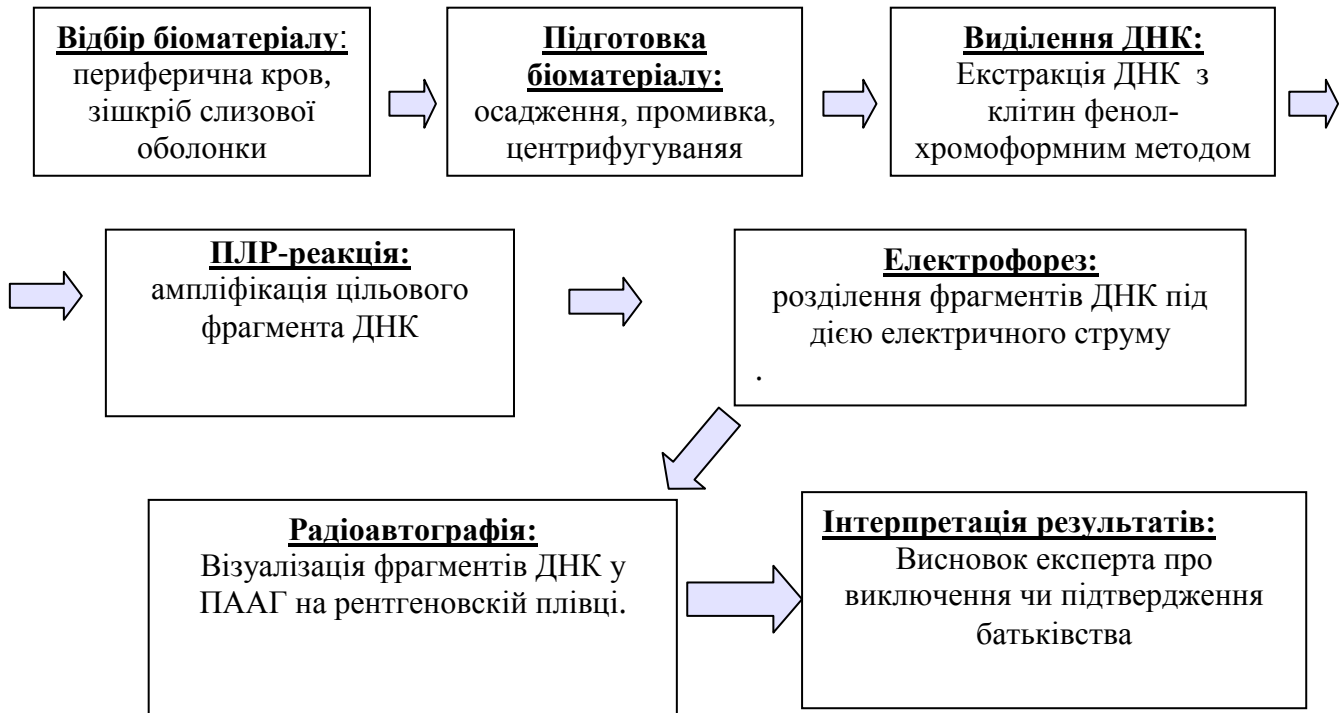
Для кращого засвоєння матеріалу після кожного практичного заняття наводяться питання для самоперевірки і самоаналізу.

Автор висловлює подяку за консультування при підготовці цього посібника викладачам та завідувачу кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка професору, доктору біологічних наук В.О. Федоренко.

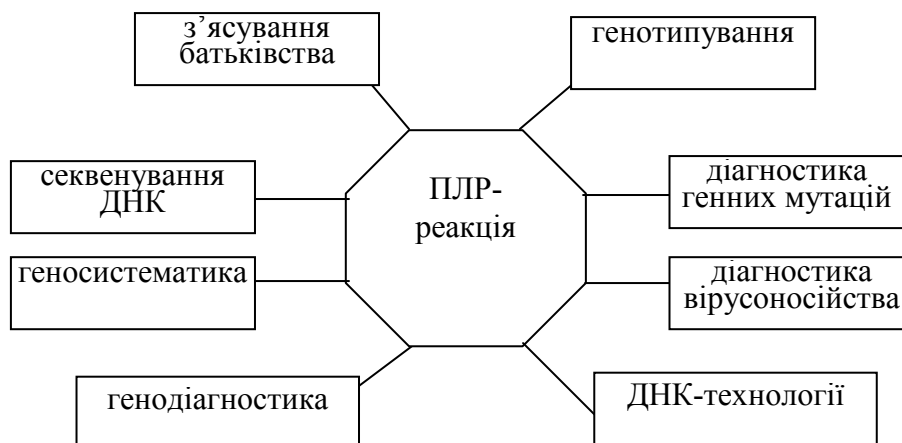
МЕТОДИЧНІ ПОРАДИ ДО ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

Кожне практичне заняття передбачає глибоке і різнобічне знання матеріалу, відповідно до якого укладені завдання різних типів.

У завданнях одного типу потрібно зобразити етапи проведення певної методики (наприклад, визначення батьківства). Для цього студент має попередньо ознайомитися з відповідним теоретичним матеріалом та подати відповідь у такому вигляді:



Завдання іншого типу потребують від студента заповнити таблицю чи схему на основі вивченої та опрацьованої самостійно теми. Наприклад, у наведеній схемі треба вписати напрями науки та медицини, у яких використовується ПЛР-реакція:



чи необхідно заповнити таблицю, у якій вказати методи, принцип й особливості застосування. Наприклад:

Методи виділення ДНК	Принцип методу
Метод екстракції за допомогою органічних розчинників	Обробка клітинної стінки лізоцимом, ЕДТА (зв'язує йони магнію). Обробка клітинної мембрани детергентом (SDS – усуває ліпідні молекули).
Метод екстракції за допомогою силіки (SiO ₂)	До клітинного екстракту додається гуанідинтіюанат (денатурують усі компоненти, окрім ДНК). Зв'язування ДНК з частинками силіки. Силіка може вноситись безпосередньо у зразок, чи зразок пропускають через колонку з силікою. Відмивка від клітинних компонентів. ДНК елюється у розчин.
Метод екстракції за допомогою гель-фільтрації	Гель-фільтрація, або хроматографія на молекулярних ситах, передбачає розділення речовин з різними молекулярними масами.
Метод екстракції за допомогою магнітних кульок	До дослідних зразів додають лізуючий розчин і магнітні кульки; виділена ДНК зв'язується з магнітними кульками; вимивання клітинних елементів у процесі відмивання; елюція ДНК за допомогою низькосольового буферу.
Метод екстракції на мікроцентрифужних колонках	Колонки є пробірками з силікагелевою мембраною, на якій адсорбується вихідний біоматеріал, лізується клітинна стінка і мембрана, вивільняється ДНК, відмивання оптимізованими буферами, що дає змогу отримати високоочищений препарат ДНК, вільний від інгібіторів і інших небажаних домішок.
Метод екстракції на паперових фільтрах	Основою методу є використання целюлозного фільтру (Ватман ВFC 180), просоченого сумішшю сильних буферів, які лізують зразки і зв'язують нуклеїнові кислоти, а білки денатурують. Нуклеїнові кислоти захищаються від дії нуклеаз і ультрафіолету. Деградує ДНК-аза.
Іонно-обмінна смола	Поміщають зразок у пробірку. Додають іоно-обмінну смолу Chelex 5% (маса/об'єм). Інкують (56 °C, 30 хв). Кип'ятять (100 °C). ДНК осаджують центрифугування. Супернатант усувають.

ПРАКТИЧНІ ЗАНЯТТЯ

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1

МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Мета: ознайомитися з методами виділення нуклеїнових кислот – ДНК та РНК з клітин організмів (бактерійних, тваринних, людини).

Теоретичні відомості

Нуклеїнові кислоти – найважливіші сполуки, що обумовлюють можливість існування і розвитку усіх живих істот. Вони відіграють основну роль у збереженні і реалізації генетичної інформації. Нуклеїнові кислоти були відкриті у середині 60-х років XIX століття швейцарським ученим Ф. Мішером. Хімічний склад нуклеїнових кислот було остаточно встановлено тільки наприкінці 30-х років XX століття, а їхню будову встановили значно пізніше вчені Дж. Уотсон і Ф. Крік, за що їх було нагороджено у 1953 р. Нобелівською премією.

Для здійснення будь-яких маніпуляцій з ДНК потрібно отримати її високоочищену форму з концентрацією не менше 0,05 мкг/мкл. За наявності виділеної ДНК, далі стає можливим її ампліфікація (методом полімеразної ланцюгової реакції – ПЛР), визначення послідовності (секвенування), рестрикційний аналіз, клонування, гібридизація тощо.

Для виділення (екстракції) ДНК використовують різні методи:

Вибір методу виділення ДНК залежить від поставленого завдання, часу аналізу і ступеня очистки та базується на таких критеріях: цільова нуклеїнова кислота (НК), організм – джерело НК; первинний матеріал (людські чи тваринні клітини, бактерії, віруси); очікувані результати (вихід, чистота, час, потрібен для очистки і н.); подальший аналіз НК (ПЛР, ПЛР у реальному часі, блот-гібридизація, клонування, введення мітки, синтез кДНК і ін.).

Загалом для виділення ДНК з клітин необхідно зруйнувати їх тим чи тим способом, а ДНК очистити від інших клітинних компонентів. У випадку еукаріотних клітин потрібно відокремити ДНК від білків, що входять до складу нуклеопротейдних комплексів хроматину. При цьому важливо захистити ДНК від дії нуклеаз (ферменти, що

розщеплюють ДНК) і максимально зберегти її цілісність, оскільки довгі лінійні молекули ДНК при їх ізоляції з клітин можуть фрагментуватися. Оцінку якості екстрагованої ДНК здійснюють на основі вимірювання оптичної густини розчину ДНК в області білкового і нуклеїнового спектрів поглинання (280 – 260 нм).

Методи виділення ДНК з клітин зазвичай містять такі етапи: 1) лізис клітин (або руйнування фізичним, механічним способом); 2) ферментативне руйнування білків протеїназами і /чи депротейнізацію клітинного лізату за допомогою фенолу і хлороформу; 3) центрифугування для усунення денатурованих білків і фрагментів клітинних органел. Потім ДНК осаджують розчином етанолу і після центрифугування розчиняють осад у буферному розчині. Водночас з ДНК частково виділяється й РНК, від якої позбавляються за допомогою ферменту РНКаз.

Для лізису клітин і денатурації білків часто використовується детергент натрій додецилсульфат (SDS) або хаотропний агент гуанідинізоціанат (ГІТ). Якщо немає потреби у довгих цільних фрагментах ДНК, клітини руйнують механічним способом шляхом перетирання зі склом або річковим піском у рідкому азоті. Низка сучасних методів передбачає сорбцію ДНК на гранулах силікагелю за присутності хаотропних речовин, центрифугування і подальшу елюцію ДНК з гранул у розчин. Деякі комерційні фірми пропонують набори реактивів для виділення ДНК з використанням магнітних частинок, покритих силікою SiO_2 . Деякі комерційні набори передбачають сорбцію ДНК на мембранах або іонообмінних сорбентах. Фенол-хлороформний метод екстракції ДНК вважається стандартним.

Фенол-хлороформний метод (ФХ-метод) – це класичний метод виділення нуклеїнових кислот (НК). Він передбачає лізис біоматеріалу детергентами за присутності протеїнази К і екстракцію НК за допомогою фенолу і хлороформу. Перевагою цього методу є достатньо високий вихід ДНК, а до недоліків – тривалість, трудомісткість, використання агресивних органічних розчинників і недостатню очистку ДНК як від білків, так і від РНК.

Виділення геномної ДНК з клітин бактерій методом фенол-хлороформної екстракції. Клітини бактерій, вирощені на багатому поживному середовищі (LB, поживний бульйон БТН або МПБ), осаджують кількастадійним центрифугуванням з нашаровуванням бактерійної суспензії у епіндорфах. Отриманий осад клітин

ресуспендують у 10 мМ Трис-НСІ рН 8,0. У випадку грам-позитивних бактерій, для руйнування клітинної стінки, вносять розчин лізоциму та інкубують 20–60 хв при 37 °С. У випадку лактобацил, вносять розчин лізоциму та інкубують 1–2 год при 37 °С. Для руйнування мембрани клітин і вивільнення ДНК вносять порціями 10%-ий розчин SDS. У результаті отримують прозорий розчин ДНК, завдяки якій він стає густий і тягучий (якщо розчин не став густим, це означає, що клітини не зруйнувалися і ДНК у розчині є у недостатній кількості). Усі наступні процедури здійснюють під витяжкою і у рукавичках. До розчину ДНК вносять суміш фенолу, хлороформу й ізоамілового спирту (у співвідношенні 25: 24: 1). При цьому відбувається денатурація білків, перехід жирів і ліпідів в органічну фазу. Далі отриману суміш центрифугують для відокремлення складників. Відкидають верхню фазу та повторюють депротенізацію ДНК 2–3 рази феноло-хлороформно-ізоаміловою сумішшю для отримання високоочищеної ДНК. На наступному етапі із робочої суміші відбирають ДНК, намотуючи її на загострену скляну паличку, та переносять у 96% етанол. Потім підсушують (зазвичай, сушать на відкритому повітрі не більше півгодини, під потоком нагрітого повітря), переносять ДНК у деіонізовану воду чи ТЕ-буфер для розчинення та використовують для наступних процедур.

Виділення плазмідної ДНК із бактерійних клітин. Клітини свіжо вирощеної культури бактерій осаджують шляхом центрифугування. Отриманий осад клітин ресуспендують у відповідному розчині. Для руйнування клітинної стінки грам-позитивних бактерій вносять розчин лізоциму та інкубують 1–2 години при 37 °С. Далі клітини переносять у крижану баню і вносять свіжо приготований розчин, що містить 0,2М NaOH і 1% SDS, та обережно перемішують, перевертаючи пробірку до отримання прозорого в'язкого розчину. На даній стадії відбувається лізис клітин і вивільнення геномної ДНК у вигляді розплетеної спіралі, що й обумовлює в'язкість розчину. До отриманої суміші вносять охолоджений розчин 3 М калій ацетату у оцтовій кислоті, обережно перемішують перевертанням та інкубують при температурі –20 °С упродовж 20–30 хв. На даній стадії відбувається зміна рН розчину у кислу область і геномна ДНК випадає в осад у вигляді білих пластівців. Плазмідна ДНК, зважаючи на малі розміри, в осад не випадає. Отриману суміш центрифугують на холоді для усунення преципітату геномної ДНК. Супернатант (надосадову рідину)

переносять у чисту віалу, додають ізопропанол, перемішують і центрифугують. Супернатант виливають, осад промивають 96% етанолом, висушують при 65 °С у твердотільному термостаті і ресуспендують у деіонізованій воді або ТЕ-буфері. Далі здійснюють доочистку плазмідної ДНК (miniPrep) з бактеріальних клітин методом фенол-хлороформної екстракції.

Виділення загальної ДНК з тваринних клітин є не особливо складною процедурою, оскільки плазмалемма, ядерна та мітохондріальна мембрани “розчиняються” за присутності аніонного детергенту SDS. Вивільнити ДНК з ДНК-протеїнового комплексу можна за допомогою протеїназ або хаотропних солей. Для цього здійснюють, як і у випадку з бактеріями, фенольну екстракцію ДНК. Інші речовини при наступному осадженні ДНК спиртом залишаються у розчині, яких при подальшому очищенні позбуваються. ДНК можна виділити з будь-яких тканин, клітини яких містять ядра, але кількісний вихід з різних тканин може бути різним. Досить часто для виділення ДНК використовують кров. Лейкоцити крові, на відміну від зрілих еритроцитів, містять ядра. Загальної ДНК, виділеної з 100 мкл цільної крові, є достатньо для проведення кількох рестрикцій, ПЛР та секвенування. Мітохондріальна ДНК і РНК є також присутні у отриманому препараті ДНК. Часто для звільнення ДНК від білків використовується суміш водонасиченого розчину фенолу з хлороформом (у об’ємному співвідношенні 1:1). У суміші з хлороформом фенол працює ефективніше, а ізоаміловий спирт гасить піноутворення. Процедура виділення ДНК із лейкоцитів крові людини виглядає наступним чином:

1. До 100 мкл цільної крові додають 2 об’єми дистильованої води до кінцевого об’єму 0,3 мл. Ретельно перемішують і залишають на 15 хвилин.
2. Пробу центрифугують 10 хв при 5000 об/хв. Супернатант зливають.
3. Осад клітин відмивають подвійним об’ємом SSC-буферу, додавши в пробірку 200 мкл 1-кратного SSC-буферу. Перемішують акуратно.
4. Центрифугують отриману суміш, супернатант зливають.
5. До осаду додають 54 мкл 0,2М натрій ацетату і 6 мкл 10% SDS. Осад клітин ретельно ресуспензують за допомогою мікропіпетки або вортексу. Інкують при 37°C упродовж 0,5–1 год для лізису (руйнування) клітин.

6. Додають 2 об'єми ТЕ-буферу і здійснюють фенольну депротейнізацію зразка. Для цього вносять у пробірку рівний об'єм фенол-хлороформної суміші, добре струшують і центрифугують. Відбирають водну фазу (верхній шар) у чисту пробірку, не захоплюючи інтерфазу – білий осад на лінії розділу фаз.

7. Повторюють ту ж процедуру, що в п. 6, але з сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт для усунення залишків фенолу.

8. До очищеного від білків лізату додають 1/10 об'єму розчину, перемішують і осаджують ДНК, додавши 2,5 об'єму холодного 96% етанолу і поміщають зразок на 1–2 год у морозильну камеру при -2°C . Можна залишити ДНК під спиртом на ніч.

9. Пробу центрифугують 10 хв при максимальній швидкості мікроцентрифуги. Супернатант зливають, осад промивають 70% спиртом.

10. Висушують осад ДНК на повітрі і розчиняють у 20 мкл ТЕ-буфері. Концентрація екстрагованої ДНК таким методом рівна 2,0–2,3 мкг/мкл при чистоті $D_{260/280\text{ nm}}=1,4\text{--}2,0$.

Отримання препарату очищеної сумарної клітинної РНК є важливою, а іноді ключовою стадією у діагностиці вірусоносійства. Виділення тотальної РНК з біоматеріалу містить кілька етапів: лізис клітин, усунення білкової фракції клітинного лізату, відокремлення фракції тотальної ДНК від фракції геномної ДНК. Ефективне руйнування клітин і гомогенізація біологічного зразка є абсолютно необхідним етапом у всіх методиках очистки РНК. Гомогенізацію здійснюють у лізуючому буфері, який містить гуанідин тіоціанат (інгібує клітинні РНКаз). Монофазний водний розчин фенолу і гуанідин-тіоціанату використовують для швидкого виділення сумарної РНК високої якості з різних об'єктів: тваринні і рослинні тканини, культури клітин ссавців, бактерії, дріжджі. Доданий реагент моментально лізує клітини, водночас цілісність РНК зберігається завдяки високоефективному інгібуванню активності РНКаз. Розчин після додавання хлороформу і наступного центрифугування розділяється на водну фазу, інтерфазу і органічну фазу, водночас РНК, ДНК і білки потрапляють у різні фази. Тотальна РНК може бути використана для Нозерн-блотингу, синтезу к ДНК, *in vitro* трансляції, виділення полі (A+), ОТ-ПЛР і ін. маніпуляціях.

Виділення РНК методом фенол-хлороформної екстракції. Гуанідин-тіоціанат-фенол-хромоформний – один з найчастіше використовуваних методів виділення сумарної РНК з різних

біологічних об'єктів. У цьому методі для вивільнення РНК від білків використовуються три речовини (гуанідин тіоціанат, фенол і хлороформ), їх суміш має запатентовану назву – TRIzol (тризол). Сьогодні на ринку хімпрепаратів пропонується чимало комерційних наборів для виділення РНК, які полегшують і пришвидшують цю процедуру. На його основі розроблена низка реагентів і комерційних наборів. Типовий набір реактивів для виділення РНК методом фенол-хлороформної екстракції містить: 1) лізуючий розчин; 2) хлороформ; 3) депротейнізуючий розчин; 4) 96 % етанол; 5) 80 % етанол.

Процедура виділення РНК з біологічного матеріалу є наступною. Суспензію культури клітин біоматеріалу гомогенізують у лізуючому розчині до повного зчезання комочків клітинного матеріалу. Лізат центрифугують для усунення можливих домішок позаклітинного матеріалу, полісахаридів і ін. Прозорий супернатант відбирають та додають хлороформ, енергійно перемішують та залишають на 20 хв. У результаті відстоювання, вміст пробірки розшаровується на дві фази. Далі центрифугують та відбирають верхній шар, у якому міститься РНК. До РНК-місного супернатанту додають рівний об'єм депротейнізуючого фенолвмісного розчину і енергійно струшують на вортексі та центрифугують.

Після центрифугування відбирають верхній РНК-місний шар супернатанту, до якого вносять подвійний об'єм 96%-ого етанолу, добре перемішують вміст пробірки та відстоюють 20–30 хв при -20°C для формування осаду РНК. Далі РНК осаджують центрифугуванням, відбирають спиртовий супернатант і обережно, по стінці пробірки, до осаду РНК вносять 80%-ий етанол. Знову РНК осаджують центрифугуванням, видаляючи спиртовий супернатант. Усі подальші процедури здійснюють при температурі $+40^{\circ}\text{C}$. Розчиняють осад РНК у воді, потім відбирають аліквоту і визначають концентрацію РНК спектрофотометрично. Оцінюють нативність РНК електрофорезом в 1,2–1,5%-ій агарозі, приготованій на $\times 1$ -ному TBE, що містить 0,3 мкг / мл етидій бромистого. Препарат РНК можна зберігати замороженим у воді при температурі -20°C або нижче. Передбачається зберігання у вигляді спиртового осаду при температурі -20°C .

Для виділення РНК група російських вчених з НДІ Фізико-хімічної біології ім. Білозерського МДУ (Москва, РФ) у співробітництві з індійськими колегами з Інституту технологій біоресурсів в Гімалаях (Інститут Гімалайської Біоресурсної Технології, Індія) розробили

простий і безпечний метод виділення РНК з клітин різних організмів. Опис методу опублікований в журналі European Journal of Biotechnology. Один з авторів роботи, Ю. Дригін запропонував використати для виділення РНК не три речовини (тризол), як це робиться зазвичай, а одну – амоній трихлорацетат (АТХА), екологічно безпечну речовину на відміну фенолу. РНК, отримана за допомогою АТХА, за своїм властивостям не відрізняється від вилученої тризолом, а процес екстракції РНК при цьому стає більш безпечним в екологічному плані. Його ідею випробовували на рослинах картоплі, заражених вірусом тютюнової мозаїки або вироби картофеля. Автори сподіваються, що в найближчому часі результати їхніх досліджень будуть застосовуватися у діагностиці масових захворювань і тварин, а також у боротьбі з інфекціями.

План заняття

1. Охарактеризуйте фізико-хімічні властивості ДНК.
2. Охарактеризуйте фізико-хімічні властивості РНК.
3. Дайте характеристику методів виділення (екстракції) ДНК з клітин організмів:

за допомогою органічних розчинників;
за допомогою силіки (кремній (IV) оксиду);
на мікроцентрифужних колонках;
на паперових фільтрах;
на іонно-обмінній смолі (Chelex);
магнітних частинках;
гель-фільтрації.

4. Дайте характеристику методів виділення РНК з клітин організмів. Вкажіть особливості їхнього виконання. Наведіть приклади комерційних наборів та автоматів для виділення РНК з клітин різних організмів: бактерій, рослин, тварин, людини.

5. Заповніть пропуски у таких твердженнях:

Звична процедура лізису клітин вміщає: _____ руйнування (наприклад, подрібнення за допомогою пестика, застосування ультразвуку, гіпотонічний лізис).

_____ обробка клітин, яка веде до лізису клітин (наприклад, лізис за допомогою детергентів, хаотропних агентів, чи тіолове відновлення).

Для ферментативного розщеплення білків у методі виділення ДНК застосовують фермент _____.

Агент, який сприяє руйнуванню тримірної структури макромолекул (ДНК, РНК, білки) і їх денатурації, називають _____. До них належать сечовина (6–8 М), тіосечовина (2 М), гуанідинхлорид (6 М), гуанідинтіоціонат (6 М), літій перхлорат (4,5 М).

До хімічних методів лізису клітин належать: обробка _____: лізоцим, ЕДТА (зв'язує йони магнію), обробка _____: детергентом (SDS – усуває ліпідні молекули).

ДНК від білків і РНК відокремлюється шляхом органічної екстракції за допомогою водного розчину фенолу чи суміші _____/_____ (v:v, 1:1).

Швидкість і простота виконання, економічність, виключає наявність інгібіторів, можна автоматизувати – це переваги методу екстракції ДНК за допомогою _____.

Безпечність, простота і швидка можливість автоматизації процесу; дешевизна, зміна однієї пробірки (за мінімальних розрахункових матеріалів); виключення контрактації; можна використовувати для усіх типів об'єктів, крім кісток; придатність для будь-якої лабораторії – це переваги методу екстракції ДНК за допомогою _____.

Безпечна робота зі зразками (носії інактивують мікроби, включаючи патогени, що переносяться кров'ю), швидке виділення високоякісного зразка ДНК; тривале зберігання зразків при кімнатній температурі (носії перешкоджає росту бактерій і інших мікроорганізмів); придатність для більшості зразків живих видів (кров, слюна, сперма, свіжий кістковий мозок) – це переваги методу екстракції ДНК за допомогою _____.

Монофазний водний розчин фенолу і _____-_____ використовують для швидкого виділення сумарної РНК високої якості з різних об'єктів.

Питання для самостійного опрацювання

1. Які види нуклеїнових кислот (НК) використовують у молекулярній діагностиці? Опишіть їх організацію та фізико-хімічні властивості.

2. Методологічні підходи виділення препаратів ДНК з біоматеріалу (пробопідготовка для подальшого використання в молекулярній діагностиці).

3. Опишіть органічний (фенольний) метод виділення ДНК з біоматеріалу.

4. Опишіть неорганічний (безфенольний) метод виділення ДНК.

5. Охарактеризуйте метод твердофазного виділення ДНК.

6. Як здійснити виділення ДНК з парафінових і залитих смолою зразків?

7. Як виділити мітохондрійну ДНК з еукаріотних клітин?

8. Опишіть процедуру виділення тотальної РНК з еукаріотних клітин.

9. Дайте характеристику методу виділення поліА-РНК.

10. Виберіть правильну відповідь:

10.1. Чому ДНК, порівняно з РНК, є стійкішою до лужного гідролізу:

а) ДНК може утворювати стійкі комплекси з металами, що взаємодіють з її іонізованими фосфатними групами;

б) ДНК є дволанцюговою молекулою, структуру якої стабілізують водневі зв'язки між комплементарними парами азотистих основ;

в) ДНК містить модифіковані азотисті основи, що надають їй вищої стійкості;

г) залишки дезоксирибози у ДНК у 2'-положенні містять Гідроген замість гідроксильної групи;

д) ДНК має більшу кількість негативно заряджених хімічних груп на периферії молекул?

10.2. Завдяки чому нуклеїнові кислоти мають максимум поглинання в УФ-зоні спектру з довжиною хвилі 260–280 нм:

а) водневим зв'язкам;

б) вуглеводному компоненту;

в) фосфодиефірним зв'язкам;

г) азотистим основам;

д) ортофосфорній кислоті?

10.3. Денатурація ДНК не спостерігається за умов:

а) зниження температури;

б) нагрівання розчину;

в) присутності сечовини;

г) лужного значення рН;

д) внесення ацетону.

10.4. Наслідками денатурації ДНК є:

- а) поява оптичної активності;
- б) гіперхромний ефект;
- в) зростання густини розчину;
- г) гіпохромний ефект;
- д) зниження густини розчину.

Література

1. Федоренко В.О. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів : навч. посібник [для студентів біологічних факультетів університетів] / В.О. Федоренко, Б.О. Осташ, М.В. Гончар, Ю.В. Ребець. – Львів : Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2007. – С. 178–182.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М. : Мир, 2002. – С. 29–38.
3. Каюмов А.Р., Гимадудинов О.А. Практикум по молекулярной генетике : учебно-методическое пособие. – Казань : Казань, КФУ, 2016. – С. 5–15. Режим доступа: https://kpfu.ru/portal/ias_utils.file_download?p...id.
4. Кулмамабетова Г Пробоподготовка. Методы выделения ДНК/РНК. Режим доступа: <https://docplayer.ru/429091-Probopodgotovka-metody-vydeleniya-dnk-rnk-kulmamabetova-g.html>.
5. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. С. Херрингтона и Дж. Макги : пер. с англ. – М. : Мир, 1999. – С. 302–328.
6. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія : підручник / А.В. Сиволоб. – К. : Видав.-поліграф. центр “Київ. ун-т”, 2008. – С. 65–78. Режим доступа: biology.org.ua/files/lib/MolBiol_sivolob.pdf
7. Сыромятников М.Ю., Машкина О.С., Попов В.Н. Практикум по молекулярной генетике и бионженерии : учебно-метод. пособие. – Воронеж : Издат. дом ВГУ, 2016. – 55 с. Режим доступа: <https://rucont.ru/efd/643228>.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2

ФЕРМЕНТИ ГЕННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ, ЇХНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ

Мета: ознайомитися з різноманітністю ферментів генної інженерії, що використовуються у молекулярній діагностиці, з їхніми властивостями та функціями.

Теоретичні відомості

Усі маніпуляції з ДНК *in vitro* здійснюються за участю різноманітних ферментів. До основних ферментів, які застосовуються у ДНК-технологіях, належать різноманітні за функцією і властивостями екзо- і ендонуклеази, специфічні ендонуклеази рестрикції, ДНК-лігази, ДНК-полімерази, зворотня транскриптаза тощо.

Ендонуклеази рестрикції (син. рестриктази) – бактерійні ензими, які розщеплюють молекулу ДНК у чітко визначених сайтах з утворенням тупих чи липких кінців (див. додаток А). ЕР є основою клітинного захисту бактерій від проникнення чужерідної ДНК. Це явище рестрикції – модифікації під час внутрішньоклітинного розвитку бактеріофагів у клітинах *Escherichia coli* було відкрито на початку 50-х років ХХ ст. С. Лурієм та його співробітниками.

Рестрикційна активність ендонуклеаз може бути поєднана з метилазою. За відкриття рестриктаз та їхнє застосування у молекулярній генетиці В. Арберу, Х. Стіту і Д. Натансу у 1978 р. було присуджено Нобелівську премію. Назви рестриктаз запропоновано записувати у скороченій формі, яка складається з трьох літер: перша літера родової та дві літери видової назви мікроорганізму, з якого виділений ензим; додаткові літери відображають специфіку штаму. Наприклад, фермент HindII виділено з клітин *Haemophilus influenzae* серотипу *d*. Якщо у клітинах виявлено кілька рестриктазно-метилазних (РМ)-систем, тоді їх нумерують римськими цифрами. Рестриктази позначають літерою R, метилазу цієї системи – M (наприклад, R.EcoK, M.EcoK).

За основними характеристиками (кількістю субодиниць, потребою у кофакторах, специфічністю сайтів розпізнавання) рестриктази поділяють на чотири класи.

Системи рестрикції-модифікації (РМ) Типу I складаються з кількох неідентичних субодиниць: зазвичай двох R, двох M та однієї S. Функція S-субодиниці ферменту – розпізнавання специфічної послідовності ДНК, R – її розщеплення, M – метилювання. Якщо ензими Типу I діють на неметилювані субстрати, то вони функціонують як рестриктази. Для їхньої дії необхідна енергія гідролізу АТФ та Mg^{2+} . ДНК розщеплюється у випадкових сайтах на різній віддалі від сайту розпізнавання (від 40 до 7 000 п.н). З малою ймовірністю може відбуватися метилювання. Продуктом їхнього метилювання є m6A, а донором метильних груп – S-аденозилметіонін. Якщо субстратом є ДНК, один з ланцюгів якої є метильований (наприклад, після реплікації ДНК), то ензим діє як метилтрансфераза. У 1968 р. Лінн і Арбер, а також Мезельсон і Юань виділили ензими EcoV and EcoK, які було віднесено до ER Типу I.

Системи РМ Типу III. Ферменти Типу III складаються з двох субодиниць – Mod, яка виконує функції розпізнавання специфічної послідовності ДНК та її метилювання і Res, яка каталізує розщеплення ДНК. Обидві субодиниці потрібні для розщеплення ДНК. Для розщеплення ДНК необхідний гідроліз АТФ, Mg^{2+} . Розриви вносяться на віддалі приблизно 25 п.н. від сайту розпізнавання. Наприклад, EcoP1I, EcoP15I.

Системи РМ IV діють тільки на модифіковану ДНК з метильованими, гідроксиметильованими та глікозил-гідроксильованими азотистими основами. Наприклад, ензим EcoKMcgBC розпізнає два динуклеотиди Pu mC, які розділені будь-якими послідовностями довжиною від 40 до 3000 п.н. Розщеплення відбувається на віддалі приблизно 30 п.н. від одного з сайтів.

У зв'язку з неспецифічністю дії рестриктази класів I, III та IV практично не використовують у ДНК-технологіях.

У ДНК-технологіях широко використовують **ендонуклеази рестрикції (ER) II типу**. Вони розповсюджені серед бактерій. Їх кодують геноми архебактерій, фагів та віруси водоростей. Відомо понад 3500 ER типу II, які розпізнають понад 240 різних послідовностей ДНК. Першу ER типу II – HindII було відкрито у 1970 р. Смітом і Вількоксом.

Системи РМ типу II є простими і найкраще вивченими. Рестрикційні ферменти зазвичай є гомодимерами і співіснують у клітинах з окремими білками – метилтрансферазами. Для вияву активності RE потребують лише йони Mg^{2+} . Відповідні

метилтрансферази (МТ) потребують для своєї активності як кофактор S-аденозилметіонін, метилують обидва ланцюги ДНК, формуючи залишки N6-метиладеніну, 5-метилцитозину або N4-метилцитозину. Розпізнають паліндромні послідовності по 4 – 8 п.н., паліндромні послідовності, які перервані неспецифічними нуклеотидами або частково паліндромні, чи несиметричні послідовності. РЕ типу II розпізнають специфічні послідовності ДНК і розщеплюють її в постійних позиціях – у цих послідовностях або на певній короткій віддалі від них. Утворюють фрагменти з 5'-фосфатами та 3'-гідроксилами на кінцях. Наприклад, ЕР *EcoRI* розпізнає та розщеплює у ДНК гексануклеотидну послідовність, утворюючи фрагменти з тетра-нуклеотидними 5'-липкими кінцями (див. додаток А).

Рестриктази використовують для побудови рестрикційних карт геномів та виявлення поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (див. додаток Б). У генній інженерії РЕ типу II використовують для отримання певних фрагментів ДНК з певною структурою кінців. Із цією метою фрагменти фракціонують за розмірами за допомогою гелю-електрофорезу та піддають іншим маніпуляціям, наприклад, з'єднують їх з іншими фрагментами. Далі визначають розміри фрагментів ДНК, порівнюючи їхню електрофоретичну рухливість із рухливістю маркерних фрагментів, розміри яких відомі. Розміщення сайтів розщеплення ЕР є постійною характеристикою молекули ДНК – її “молекулярним маркером”. Це дає змогу будувати фізичні (рестрикційні) карти геномів – схеми розміщення сайтів розщеплення ЕР. Віддаль між сайтами на картах визначають у парах нуклеотидів. Побудова рестрикційних карт є важливим методом вивчення організації геномів і передумовою дальших генно-інженерних процедур.

Серед інших нуклеаз, які використовуються у генній інженерії та ДНК-технологіях, належать екзонуклеаза VII *E. coli* (розщеплює одноланцюгову ДНК з 5'- та 3'- кінців), λ -екзонуклеаза *E. coli* (розщеплює дволанцюгову ДНК з 5'- кінців), екзонуклеаза III *E. coli* (розщеплює дволанцюгову ДНК з 3'- кінців), нуклеаза Bal *Alteromonas espejana* (розщеплює дволанцюгову ДНК 5'- та 3'- кінців), нуклеаза S1 з *Aspergillus oryzae* (розщеплює одониткову ДНК та РНК, руйнуючи одониткові кінці, що виступають одониткові петлі та одониткові ділянки навпроти прогалин, “шпилькові” структури) (див. додаток В).

Лігази (підклас 6.5) належать до класу ферментів ЕС 6. Їх поділяють на дві великі групи РНК-лігази і ДНК-лігази.

ДНК-лігази – ферменти, що каталізують утворення фосфодиефірного зв'язку між 3'-ОН гідроксилем дезоксирибози і 5'-фосфатом сусідніх нуклеотидів у одноланцюговому розриві полінуклеотидного ланцюга ДНК. Уперше ДНК-лігазу було виділено у 1966 р. Б. Вейссоном і К. Річардсоном. У генній інженерії використовуються 2 типи ДНК-лігаз, що відрізняються потребами у кофакторах і способом дії. ДНК-лігаза *E. coli* як кофактор використовує дифосфопіридиннуклеотид, а лігаза фага Т4 – АТФ за наявності Mg^{2+} . Лігаза фага Т4 більш універсальна, а тому використовується частіше. Вона здатна поєднувати фрагменти ДНК і з “тупими” кінцями, тобто повністю дволанцюгові.

Полімерази – ферменти бактерійного походження, що здатні синтезувати нуклеїнові кислоти у напрямку 5'→3'. Серед полімераз найчастіше використовуються: ДНК-полімераза І *E. coli*, Фрагмент Кленова, ДНК-полімераза бактеріофага Т4 *E. coli*, ДНК-полімераза бактеріофага Т7 *E. coli*, ДНК-полімераза з термофільних бактерій (Taq-, Pwo- та ін.), РНК-залежна ДНК-полімераза (зворотна транскриптаза).

ДНК-полімераза І *E. coli* характеризується 5'→3'-полімеразною, 5'→3' та 3'→5'-екзонуклеазною активностями. Вона каталізує приєднання нуклеотидів, які комплементарні нуклеотидам матриці до 3'ОН-кінця уже існуючого полінуклеотидного ланцюга (праймера). ДНК-полімераза І не може ініціювати синтезу нового ланцюга.

Фрагмент Кленова – великий (76 кДа) С-кінцевий субфрагмент ДНК-полімерази І *E. coli*, має полімеразну та 3'→5'-екзонуклеазу активності. Цей фрагмент називають Кленов (Klenow)-фрагмент на честь Ганса Кленова, який вперше виділив його.

У 1970 р. Г. Темін і Д. Балтімор незалежно один від одного відкрили явище зворотної транскрипції – процес переписування генетичної інформації з РНК на ДНК та фермент, який здійснює цей процес – РНК-залежну ДНК-полімеразу (**зворотну транскриптазу**, чи **ревертазу**). Цей фермент володіє: РНК-залежною ДНК-полімеразною активністю, активністю РНК-ази Н (руйнує РНК у гібриді РНК-ДНК), низькою ДНК-залежною-ДНК-полімеразною активністю. Матрицею для зворотної транскриптази слугують зрілі мРНК певних генів. Це дало змогу синтезувати ДНК-копії екзонних

послідовностей генів *in vitro*, використовуючи РНК як матрицю. У 1975 році Г. Темін і Д. Балтімор за це відкриття були удостоєні Нобелівської премії у галузі фізіології та медицини.

Усі зазначені ферменти відрізняються за ферментативними активностями, темпом, з яким проходить полімеризація ланцюга та процесивністю – здатністю ферменту безперервно приєднувати нуклеотиди до ланцюга, що росте, не від'єднуючись від матриці. Синтез ДНК *in vitro* за допомогою ДНК-полімераз найчастіше використовують для: перетворення фрагментів ДНК з “липкими” кінцями у фрагменти з “тупими” кінцями, отримання послідовностей ДНК, які мічені радіоактивними ізотопами та нерадіоактивними мітками, синтезу кДНК на матрицях РНК, синтезу копій ДНК під час секвенування ДНК методом полімеразного копіювання (методом Сенджера), селективної ампліфікації певних послідовностей ДНК – у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР).

Окрім зазначених ферментів, у ДНК-технологіях можуть використовуватися різноманітні нуклеази з ендо- та екзонуклеазними активностями, термінальна дезоксинуклеотидил-трансфераза з тимусу теляти, лужні фосфатази, полінуклеотидкіназа фага та ін. Багато ферментів, що застосовуються у ДНК-технологіях, позбавлені видової специфічності, тому з їхньою допомогою можна поєднувати в єдине ціле фрагменти ДНК будь-якого походження у заданій послідовності. Це дає змогу долати встановлені природою видові бар'єри й отримувати молекули ДНК будь-якої послідовності.

ДНК-технології базуються на таких важливих фізико-хімічних властивостях нуклеїнових кислот:

- принцип комплементарності: аденін (А) відповідає тиміну (Т) (А відповідає урацилу (У) у разі РНК), гуанін (Г) відповідає цитозину (Ц);
- здатність до денатурації – при підвищенні температури до 70 – 80°C полінуклеотидні ланцюги ДНК розходяться (плавлення ДНК),
- здатність до ренатурації – при поступовому охолодженні можливе відновлення двоспіральної структури ДНК за наявності комплементарних полінуклеотидних ланцюгів (відпал ДНК);
- здатність до гібридизації (базується на принципі комплементарності) – утворення гібридів ДНК-ДНК і ДНК-РНК;
- здатність до розщеплення – ендо- і екзонуклеази гідролізують ДНК у певних специфічних сайтах, які містять паліндромні ділянки.

Найважливішими методами, які застосовуються у ДНК-технологіях, є (за Т.А. Єгоровою та співавт., 2003):

- 1) специфічне розщеплення ДНК рестриктазами, що прискорює виділення різних генів і маніпуляції з ними;
- 2) швидке секвенування усіх нуклеотидів в очищених фрагментах ДНК, що дає змогу визначити точні межі гена і кодованих ним амінокислотних послідовностей поліпептиду;
- 3) гібридизація нуклеїнових кислот, що дає змогу з великою точністю виявити специфічні нуклеотидні послідовності на основі їхньої здатності зв'язувати комплементарні основи;
- 4) клонування ДНК, суть якого полягає у введенні ДНК-фрагмента в самореplikативний генетичний апарат (плазмиду або вірус), який використовують для трансформації бактерій. Бактерійна клітина після трансформації здатна відтворювати цей фрагмент у багатьох ідентичних копіях;
- 5) генна інженерія дає змогу отримувати модифіковані версії генів, а потім їх вносити у клітини або організми.

План заняття

1. Дайте ензимологічну характеристику ендонуклеазів рестрикції II типу. Наведіть приклади кількох рестриктаз.

2. Охарактеризуйте методи, у яких застосовують ендонуклеази рестрикції: рестриктазний, рестриктазно-лігазний, фізичне картування ДНК, геномний фінгерпринт.

3. Охарактеризуйте ДНК-полімерази, які використовуються у генно-інженерних маніпуляціях: фрагмент Кленова, ДНК-полімераза бактеріофага T4, ДНК-полімераза бактеріофага T7, ДНК-полімерази з термофільних бактерій (Taq-, Pwo- та ін.), РНК-залежну ДНК-полімеразу.

4. Вкажіть функції та особливості застосування ДНК-полімераз у наступних методах: синтез кДНК на матрицях РНК, метод нік-трансляції, випадкових гексануклеотидних праймерів, полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР).

5. Заповніть пропуски у таких твердженнях:

5.1. _____ гідролізують дволанцюгову спіраль ДНК за специфічними послідовностями, які складаються із чотирьох — восьми нуклеотидів (паліндроми), розділяючи її на фрагменти чітких розмірів, які називаються _____.

5.2. У 1970 р. – _____ відкрили зворотну транскрипцію – процес переписування генетичної інформації з РНК на ДНК та РНК-залежну ДНК-полімеразу (зворотну транскриптазу).

5.3. Рестриктази, які розпізнають однакові послідовності, але по-різному їх розщеплюють, називають _____.

5.4. Дволанцюгові ДНК-копії еукаріотичних мРНК, отримані за допомогою зворотної транскриптази, можуть бути вбудовані у вектори клонування для створення _____, яка може використовуватися для виявлення окремих клонів, що відповідають окремим мРНК.

5.5. ДНК кожного виду після розщеплення рестриктазами має відмінний набір фрагментів різної довжини і, відповідно, індивідуальну картину розподілу фрагментів після електрофорезу – названий _____. Цей метод використовують для встановлення видової належності певного організму.

6. Виберіть правильну відповідь:

6.1. У генно-інженерних експериментах ДНК-лігазу застосовують для:

- а) каталізу утворення водневих зв'язків у дуплексах ДНК;
- б) об'єднання хімічно синтезованих фрагментів ДНК;
- в) об'єднання вектора та фрагмента ДНК в єдину молекулу ;
- г) з'єднання одно- з дволанцюговими фрагментами ДНК;
- д) з'єднання одноланцюгових фрагментів ДНК.

Правильна відповідь: _____.

6.2. Фермент генної інженерії нуклеаза S1:

- а) здійснює полімеризацію нуклеотидів;
- б) руйнує ділянки у 2SDНК навпроти прогалин;
- в) розпізнає паліндромні послідовності у ДНК і гідролізує їх;
- г) гідролізує “шпилькові” структури у складі ДНК та РНК;
- д) розщеплює 2SDНК з 5'- та 3'-кінців.

Правильна відповідь: _____.

6.3. Скільки фрагментів утвориться після дії ендонуклеази рестрикції на лінійну молекулу ДНК, яка містить три сайти рестрикції:

- а) 1;
- б) 2;
- в) 3;
- г) 4?

Правильна відповідь: _____.

6.4. Визначте, яку каталітичну активність має Кленов-фрагмент ДНК-полімерази I:

- а) полімеразну та 3'-екзонуклеазну;
- б) 3'- та 5'-екзонуклеазну;
- в) полімеразну та 5'-екзонуклеазну;
- г) усі зазначені.

Правильна відповідь: _____

6.5. Визначте, що залишається на кінцях молекули ДНК після дії на неї рестриктазою? Це:

- а) вільні одноланцюгові 5'-кінці;
- б) вільні одноланцюгові 3'-кінці;
- в) не залишається вільних одноланцюгових кінців;
- г) реалізуються усі можливості залежно від типу рестриктази.

Правильна відповідь: _____.

6.6. Визначте специфічність дії нуклеази S1:

- а) гідролізує дволанцюгові нуклеїнові кислоти;
- б) гідролізує одноланцюгові нуклеїнові кислоти;
- в) гідролізує гібриди РНК-ДНК;
- г) гідролізує один із фосфодієфірних зв'язків всередині ланцюга;
- д) руйнує одониткові петлі та одониткові ділянки проти прогалин у дволанцюгових ДНК.

6.7. Визначте групи, між якими T4-лігаза каталізує фосфодієфірний зв'язок:

- а) 5'-фосфатом і 3'-гідроксилом дезоксирибози;
- б) 3'-фосфатом і 5'-гідроксилом дезоксирибози;
- в) 5'- і 3'-фосфатом;
- г) 5'- і 3'-гідроксильними групами.

6.8. Якими будуть кінці дволанцюгової ДНК після розрізання її рестриктазою:

- а) вільні одноланцюгові 5'-кінці;
- б) вільні одноланцюгові 3'-кінці;
- в) не залишається вільних одноланцюгових кінців;
- г) реалізуються усі можливості залежно від типу рестриктази.

6.9. Рестриктази – це:

- а) ендонуклеази, специфічні до короткої послідовності нуклеотидів;
- б) рестриктні топоізомерази;
- в) рестриктні ДНК-полімерази.

6.10. Сполуки, необхідні для активності рестриктаз:

а) АТФ;

б) ГТФ;

в) усі чотири нуклеозидтрифосфати;

г) не потребують нуклеозидтрифосфатів.

7. Розв'яжіть задачі.

7.1. Для характеристики нововиділеної плазмід, яка визначала стійкість актиноміцетів до антибіотиків, її обробили ендонуклеазами рестрикції (рестриктазами) *Bam*HI та *Eco*RI. Довжину цих фрагментів визначили за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Було отримано такі результати:

рестриктаза <i>Bam</i> HI, п.н.	рестриктаза <i>Eco</i> RI, п.н.	суміш рестриктаз <i>Bam</i> HI та <i>Eco</i> RI, п.н.
3300	4000	3100
3000	3900	2200
1600		1600
		800
		200

Визначте розмір (довжину ДНК) нової плазмід та побудуйте її рестрикційну карту. Скільки сайтів для рестриктаз *Bam*HI та *Eco*RI міститься у даній плазміді?

7.2. Ендонуклеаза рестрикції *Hind*III розщеплює ДНК у послідовності ААГСТТ, тоді як *Hpa*II – ССГГ. Якою є середня відстань (у т.п.н.) між сайтами розщеплення ДНК цими ендонуклеазами розщеплення?

7.3. Ендонуклеаза рестрикції *Eco*RI діє на послідовність 5'GAATССЗ', а *Pst*I – на послідовність 5'СТГСАГЗ'. Визначте ймовірну кількість сайтів дії цих ензимів у хромосомі фага, яка має розмір 48,5 т.п.н. Насправді у цій хромосомі є 5 *Eco*RI- і 28 *Pst*I- сайтів. Як це пояснити?

Питання для самостійного опрацювання

1. Визначте суть явища рестрикції-модифікації.

2. Чи ендонуклеази рестрикції II типу є важливими для технології рекомбінантних ДНК?

3. Що таке фізичне картування геномів? Які є способи фізичного картування геномів?

4. Що таке бібліотеки геномів? Як їх конструюють та застосовують?

5. Охарактеризуйте метод отримання клонотек (бібліотек) генів, у якому застосовують рестриктази.

6. Характеристика будови і властивостей ДНК-полімераз, які використовуються у ДНК-технологіях.

7. Розв'яжіть задачі:

7.1. Ділянка ДНК 5'CGAACATATGGAGT3' (наведено послідовність одного з ланцюгів) містить сайт ендонуклеази рестрикції класу II, яка розпізнає послідовність із шести нуклеотидів. Яка найбільш ймовірна послідовність цього сайту?

7.2. Препарат лінійної вірусної ДНК обробили вказаними у таблиці ендонуклеазами рестрикції та їхніми комбінаціями.

Фермент	Розміри фрагментів (т.п.н.)
BglII	5 та 10
HpaII	5 та 10
SmaI	2 та 13
BglII, HpaII	5
BglII, SmaI	2,5 та 8
HpaII, SmaI	2,3 та 10

Отримані набори фрагментів піддали електрофорезу і визначили їхні розміри. Використавши наведені у таблиці дані, побудуйте рестрикційну карту вірусної ДНК.

7.3. Препарат кільцевої плазмідної ДНК обробили ендонуклеазами рестрикції та їхньою комбінацією (див. нижче таблицю), а потім проаналізували фрагменти за допомогою електрофорезу у гелі:

Фермент	Розміри фрагментів (т.п.н.)
XmaI	20
MboI	10
XmaI, MboI	3,7 та 10

Використовуючи наведені дані, побудуйте рестрикційну карту плазміди.

Література

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М. : Мир, 2002. С. 50–77, 88–102.
2. Задачі та вправи з генетики : навч. посіб. / В.О. Федоренко, Я.І. Черник, Д.В. Максимів, Л.С. Боднар. – Львів : Оріяна-Нова, 2008. – С. –523568.
3. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. С. 163–187.
4. Федоренко В.О. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів : навч. посіб. [для студентів біологічних факультетів університетів] / В.О. Федоренко, Б.О. Осташ, М.В. Гончар, Ю.В. Ребець. – Львів : Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2007. – С. 178–182.
5. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія : підручник / А.В. Сиволоб. – К. : Видав.-поліграф. центр “Київський університет”, 2008. – С. 65–70; 331–343. Режим доступу : biology.org.ua/files/lib/MolBiol_sivolob.pdf
6. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004. – С. 12–28.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 3

МЕТОДИ АНАЛІЗУ ТА ДЕТЕКЦІЇ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Мета: ознайомитися з методами аналізу та детекції нуклеїнових кислот – ДНК та РНК, які використовуються у молекулярній діагностиці.

Теоретичні відомості

У генно-інженерних маніпуляціях, геноміці, молекулярній діагностиці важливим є аналіз та детекція цільової ДНК, конкретного фрагмента, гена, РНК. Для якісного та кількісного визначення нуклеїнових кислот (НК) у біологічних зразках застосовують електрофорез, спектрофотометрію, флюорометрію, які базуються на здатності нуклеїнових кислот до денатурації і ренатурації, гідролізуватися і лігуватися, а також принципи комплементарності.

Аналіз та детекцію нуклеїнових кислот (ДНК чи РНК) здійснюють за допомогою спеціальних методів і приладів. Залежно від поставленої мети, у деяких випадках, виділяють НК з біологічного матеріалу, фрагментують ДНК, розділяють методом гелі-електрофорезу, чи ампліфікують у ПЛР-реакції, а потім детектують.

Гель-електрофорез – це аналітичний метод, що застосовується для розділення фрагментів нуклеїнових кислот (ДНК, РНК) за довжиною в агарозному гелі. Базується на різній швидкості руху фрагментів різної довжини під час руху в гелі під дією зовнішнього електричного поля. Для розділення фрагментів ДНК різної довжини використовують гель з різною концентрацією агарози. Що менша довжина фрагментів ДНК, що розділяються, то більшою повинна бути концентрація агарози. Наприклад, для фрагментів ДНК довжиною 50 – 1500 п.о. концентрація агарози має бути 2 %, для 300 – 3000 п.о. – 1,5 %, 400 – 6000 п.о. – 1,2 %, 500 – 10000 п.о. – 1 %, 800 – 10000 п. о – 0,7 %, 1000 – 20000 п. о. – 0,5 %.

При проведенні електрофорезу фрагменти ДНК мігрують в гелі під впливом сил електричного поля. Оскільки цукрофосфатний остів молекул ДНК заряджений негативно, тому ланцюг ДНК рухається від катода, заряджений негативно, до позитивного анода. Довші молекули ДНК мігрують повільніше, оскільки затримуються в гелі, коротші молекули рухаються швидше. Перед початком

електрофорезу до зразків прийнято додавати два різних барвники з кислим значенням рН (ксиленовий голубий і бромфеноловий синій), щоб візуалізувати хід електрофорезу і обтяжувати зразки ДНК гліцерином (до 20 % у зразку). Барвник також необхідний для вчасної зупинки процесу. Електрофорез проводиться в камері, заповненій буферним розчином. Найчастіше використовуються буфери, що містять ЕДТА, трис, а також борну чи оцтову кислоти. Відповідно, буфер, що містить борну кислоту, називається ТВЕ (tris-borate-EDTA), а буфер, що містить оцтову кислоту, – ТАЕ (tris-acetate-EDTA). Концентрації вихідних розчинів ТВЕ і ТАЕ складають 6х і 50х відповідно, якщо порівнювати з їхніми робочими концентраціями. Буфер необхідний для підвищення йонної сили розчину, в якому буде відбуватися розділення молекул ДНК під дією прикладеного електричного поля.

Після розділення (іноді барвник вносять у розплавлену агарозу) фрагменти ДНК різної довжини візуалізують за допомогою флюоресцентних барвників, що специфічно взаємодіють з ДНК, наприклад, агарозні гелі зазвичай фарбують бромистим етидієм, який інтеркалює між азотистими основами дуплексу і флюоресціює в УФ-променях.

Електрофоретичне визначення відносної молекулярної маси нуклеїнових кислот. Молекулярну масу НК вимірюють у дальтонах (Да) або виражають кількістю пар нуклеотидів (для дволанцюгових) і кількістю нуклеотидів (для одноланцюгових). Зокрема, 1 kilobase (kb) = 1000 п.н. 2S ДНК рівний $6,6 \times 10^5$ Да; 1 kb (1000 н. 1S ДНК) – $3,3 \times 10^5$ Да; 1 kb (1000 н. 1S РНК) – $3,4 \times 10^5$ Да.

Визначення розмірів (відносної молекулярної маси) НК здійснюють шляхом порівняння наборів комерційних фрагментів ДНК відомої довжини (“DNA ladder”, “лінійка”, “маркери ДНК”) і ДНК у дослідних зразках. Зазвичай в комерційних маркерах НК вказують і вміст окремих фрагментів, щоб можна було, зіставивши інтенсивність смуг, оцінити концентрацію ДНК у дослідних зразках (метод електрофоретичного визначення концентрації НК). Якщо зразок містить дискретний набір молекул ДНК та РНК різного розміру, то після електрофорезу отримують кілька чітких смуг. Для приблизної оцінки концентрації досліджуваних молекул НК порівнюють інтенсивність флюоресценції зразка та стандартних маркерів з відомою концентрацією. Зазвичай на гель наносять різні кількості маркерних НК. Важливо, щоб зразки ДНК та РНК

порівнювали з відповідними маркерами, оскільки за однакової кількості інтенсивність флуоресценції ДНК та РНК в УФ-світлі після забарвлення етидій бромистим (EtBr) буде відрізнятися. Цей підхід використовують, якщо загальний вміст НК у зразку є невеликий.

Зазвичай для електрофоретичного аналізу ДНК використовують агарозні гелі. Якщо фрагменти ДНК мають довжину усього кілька десятків нуклеотидних пар, тоді використовують поліакриламідний (ПАА) гель.

Електрофоретичний метод визначення молекулярної маси ДНК і РНК ґрунтується на тому, що відстань, на яку мігрують молекули НК у гелі, обернено пропорційно залежить від десяткового логарифма їхніх молекулярних мас. Оцінку молекулярних мас розділених фрагментів НК здійснюють відносно відомих молекулярних мас маркерних молекул, які одночасно тестують з дослідними зразками. Набір маркерів має включати увесь діапазон досліджуваних молекулярних мас. Оскільки логарифм молекулярної маси маркера лінійно зв'язаний з його електрофоретичною рухливістю (R_f – показник, рівний відношенню відстаней, пройдених маркерною молекулою та барвником), будують графік залежності десяткового логарифма молекулярних мас маркерів (вісь ординат) від R_f (вісь абсцис). З його допомогою знаходять молекулярну масу кожного фрагмента ДНК досліджуваного зразка.

Описано альтернативний варіант електрофоретичної оцінки молекулярної маси НК. Оскільки молекулярна маса молекул НК пропорційна до довжини їхнього пробігу, будують стандартну криву залежності відстані, яку проходить маркер, від десяткового логарифма довжини цього фрагмента (кількість пар нуклеотидів), а потім визначати розміри фрагментів НК у препараті за відстанню, на яку вони перемістилися.

Капілярний електрофорез, відомий також як капілярний зональний електрофорез (англ. CZE), використовується для розділення йонів за зарядом. У разі звичайного електрофорезу заряджені молекули переміщуються у провідній рідині під дією електричного поля. У 1960-х роках була запропонована методика капілярного електрофорезу для розділення молекул за зарядом і розміром у тонкому капілярі, заповненому електролітом.

Для проведення капілярного електрофорезу потрібно відносно просте обладнання. Основні компоненти системи – флакон для нанесення зразка, стартовий флакон, кінцевий флакон, капіляр,

електроди, потужне джерело живлення, детектор і пристрій для обробки даних. Флакони для нанесення зразка, стартовий і кінцевий флакони заповнені електролітом, наприклад, водним буферним розчином. Для нанесення зразка кінець капіляра опускають у флакон із зразком, а потім переміщують у стартовий флакон. Переміщення аналізованих речовин здійснюється під дією електричного поля. Усі йони рухаються по капіляру в одному напрямі під дією електроосмотичного струму. Аналізовані речовини розділяються за електрофоретичною мобільністю і детектуються близько кінця капіляра.

Детекція розділених молекул у капілярному електрофорезі може здійснюватися різними приладами. Найпоширеніші детектують зміну поглинання випромінювання в УФ-області або області видимого світла. Зазвичай, у таких системах як комірку використовують ділянку капіляра. Довжина шляху світла, що проходить у капілярному електрофорезі, є приблизно 50 мкм, що набагато менше, ніж у випадку звичайних ультрафіолетових комірок, у яких довжина шляху світла близько 1 см.

Детекція шляхом флуоресценції може бути використана при капілярному електрофорезі зразків, що мають природну флуоресценцію, або хімічні модифікації, які містять флуоресцентні мітки. Такий спосіб детекції забезпечує високу чутливість, проте не може бути використаний для визначення нефлуоресцентних зразків. Також використовують детекцію флуоресценції, викликану лазером, такі системи капілярного електрофорезу можуть детектувати в межах 10^{-18} – 10^{-21} моль.

Для того, щоб відрізнити схожі зразки, системи розділення капілярним електрофорезом можуть бути безпосередньо пов'язані з мас-спектрометрами. У більшості таких систем кінець капіляра поміщають у прилад для електроаерозольної іонізації. Іонізовані частинки далі аналізують мас-спектрометрією.

Розділення за допомогою капілярного електрофорезу ґрунтується на відмінностях у електрофоретичній рухливості розділюваних молекул. Однак деякі класи молекул не можуть бути розділені, оскільки є незарядженими або незначно відрізняються електрофоретичною рухливістю. Додавання поверхнево-активних речовин полегшує розділення незаряджених молекул. Заряджені полімери, наприклад, ДНК, можуть бути розділені у капілярах, заповнених гелем; гель сильніше сповільнює довші молекули, ніж

коротші. Такий варіант капілярного електрофорезу називають **капілярним гель-електрофорезом**. Деякі системи капілярного електрофорезу можуть бути використані для мікромасштабної хроматографії. Також системи капілярного електрофорезу можуть бути використані для **ізотахофорезу, ізоелектричного фокусування і афінного електрофорезу**.

Після електрофоретичного розділення фрагментів ДНК для їхньої подальшої детекції застосовують перенесення (блоттинг). **Блоттинг** (від англ. Blot) – загальна назва методів молекулярної біології з перенесення певних білків або нуклеїнових кислот з розчину, що містить безліч інших молекул, на будь-який носій (мембрану з нітроцелюлози, PVDF чи нейлону) з метою подальшого аналізу.

Залежно від типу досліджуваної речовини, способів її попередньої обробки та перенесення (блоттингу) розрізняють кілька різновидів цього методу. **Саузерн-блот**, чи блот-гібридизація за Саузерном, – найефективніший метод ідентифікації певних молекул ДНК серед електрофоретично розділених фрагментів, запропонований у 1975 р. Е. Саузерном. Геномну ДНК обробляють однією або кількома рестриктазами, а утворені фрагменти розділяють за відносною молекулярною масою в агарозному або акриламідному гелі. Далі фрагменти ДНК піддають денатурації *in situ* і переносять з гелю на щільний носій. У цьому випадку блоттинг (перенос) здійснюється за рахунок дії капілярних сил, електричного поля або вакууму. Методи **дот-** і **слот-гібридизації** отримали свої назви залежно від форми аналізованої плями ДНК на фільтрі – округлої, або подовгастої, відповідно. На тверду матрицю препарати ДНК і РНК наносяться крапельно. Принципова відмінність цих методів полягає у тому, що з міченим ДНК-зондом гібридизуються молекули ДНК або РНК без попередньої обробки рестриктазами та електрофорезу. **Нозерн-блот** (Northern-blot) – метод гібридизації ДНК-зондів із електрофоретично розділеними молекулами РНК. **Вестерн-блот** (Western-blot), чи імуноблот, – це зв'язування електрофоретично розділених білків, фіксованих на фільтрах, з міченими антитілами.

Після блоттингу молекули візуалізують за допомогою різних методів.

Метод радіоавтографії є способом реєстрації радіоактивності, основою якого є фотохімічна реакція. Останнім часом у біохімічних дослідженнях радіоавтографія щоразу частіше стає доповненням до інших методів виявлення радіоактивності. Це пояснюється здатністю

методу радіоавтографії точно локалізувати включення попередника, міченого радіоактивними ізотопами, в абсолютно певні компоненти даної тканини, можливе спостереження переміщення мітки всередині системи тканин; деякі ізотопи дають можливість локалізувати включення метаболіту в окремі компоненти клітини – ядро або цитоплазму, ядерця, окремі хромосоми і навіть певні ділянки хромосом. Радіографія робить можливим реєстрацію незначної кількості інкорпорованих радіоактивних елементів, які не можливо виявити типовими фізичними приладами. Радіоавтографія дає можливість виявляти включення міченого попередника в об'єкти мікроскопічних розмірів і порівнювати інтенсивність цих включень.

Методика виявлення нуклеїнових кислот за допомогою гібридизації *in situ* – метод прямого виявлення нуклеїнових кислот у клітинних структурах (метод М. Пардю і Дж. Голла). У перших роботах (Ф. Рітосса і С. Спігельман, 1966, США; М. Пардю і Дж. Голла, (США); В. Хенніг і інших, 1969 – 75 рр., ФРН) і аж до кінця 1980-х років використовували радіоактивну мітку, зокрема ^3H -тимідин, яку виявляли за допомогою авторадіографії. Сьогодні цей метод базується на використанні P^{32} -мічених зондів, які гібридизуються за певних умов із цільовою ДНК (див. додаток Е). Якщо у ДНК-мішені є послідовності, комплементарні до ДНК-зонду, то утворюються молекулярні гібриди, які далі детектують радіоавтографічно завдяки мітці. Використовують цей метод для: картування геномів, виявлення хромосомних перебудов, поліморфізму ДНК, визначення статі, внутрішньоклітинної локалізації мРНК, хромосомної локалізації унікальних генів (див. додаток Ж).

У 1990-ті роки як мітку почали використовувати кольорові флюорохроми, які візуалізуються за допомогою флюоресцентної мікроскопії з комп'ютерним посиленням і комп'ютерною реєстрацією «сигналу» (флюоресцентної мітки) у місцях «гібридизації» зонду на хромосомах. Метод назвали флюоресцентною *in situ* гібридизацією (**FISH-метод**). Він істотно полегшив картування і дослідження хромосомних перебудов і вирішення інших завдань.

У FISH-методі застосовуються такі флюоресцентні барвники: Alexa488 (зелений), AMCA (голубий), CY3 (червоний), CY5 (червоний), CY7 (фіолетовий), DAPI (голубий), Флуоресцеїн (зелений), Родамін (червоний), Техаський червоний (червоний), TRITC (червоно-оранжевий). FISH-метод використовується для

виявлення ДНК, РНК та білків у клітині або *in situ*. За допомогою FISH-методу виявляють делеції та дуплікації хромосом (проявляється менша чи більша кількість міток, порівняно з контролем). У молекулярній діагностиці FISH-метод використовується для визначення змін кількості хромосом; визначення статі майбутньої дитини; для діагностики захворювань та підтвердження діагнозу; для детекції перебудов хромосом: делецій, дуплікацій, транслокацій, мікроперебудов. Розроблено різні модифікації FISH-методу спеціального призначення: метод порівняльної геномної гібридизації (CGH – comparative genomic hybridization), спектральне каріотипування (SKY).

Для аналізу походження гібридних або аллополіплоїдних геномів як молекулярні зонди використовують мічену тотальну ДНК усіх хромосом передбачуваного спорідненого виду. При цьому на кольоровому цитологічному препараті візуалізуються хромосоми, отримані видом “реципієнтом” від виду “донора” (метод геномної *in situ* гібридизації – GISH). Метод порівняльної геномної гібридизації дає змогу визначити наявність анеуплоїдії у геномах організмів, в тому числі й у людини. Хромосомний дисбаланс оцінюють за різницею в інтенсивності флуоресценції двох різних флуорохромів.

Для детекції цільової ДНК у діагностиці та генно-інженерних маніпуляціях застосовують підходи, які базуються на використанні міток іншої фізико-хімічної природи (див. додаток 3). Наприклад, у колориметричному виявленні DIG-міченої ДНК використовують як молекулярний зонд DIG-мітку. Для детекції цієї мітки за її позитивного зв’язування з цільовою ДНК використовують систему, яка базується на розвитку позитивної реакції, каталізованою лужною фосфатазою. Остання є кон’югатом з анти-DIG-антитілом, що зв’язується з DIG-міткою.

У іншому підході виявляють цільову ДНК за гібридизацією з зондом, міченим біотиновою міткою (див. додаток І). У цьому методі застосовують авідин (стрептавідин), який зв’язується з біотином, кон’югат біотину з лужною фосфатазою та відповідний субстрат ферменту (незабарвлений хромоген). Візуалізацію здійснюють за розвитком позитивної реакції (зміною кольору хромогену), каталізованою лужною фосфатазою, перебіг якої здійснюється у місці з’єднання кон’югату з міткою, змінюючи забарвлення внесеної реагуючої суміші.

Геномна дактилоскопія (ДНК-фінгерпринт) базується на рестрикційному аналізі ДНК із застосуванням специфічних зондів. Цим методом досліджують поліморфізм множинних повторюваних локусів (мультилокусний аналіз) ДНК різних організмів. ДНК-фінгерпринтом можна виявити у геномі ссавців більш як 30 високополіморфних локусів, що є достатньо для індивідуальної ідентифікації тварин і людини, рослин.

ДНК-ідентифікація, або типування ДНК, встановлення генетичної індивідуальності будь-якого організму на основі аналізу особливостей його ДНК. Отриманий при типуванні “профіль” ДНК, як і відбитки пальців, можна використати для ідентифікації особи.

Основою типування є дві характеристики ДНК як носія генетичної інформації: 1) послідовність нуклеотидів ДНК має індивідуальні особливості у кожної окремого організму, крім ідентичних (однойцевих) близнюків або клонованих організмів; 2) у кожної особини ДНК усіх соматичних клітин (клітин тіла) абсолютно однакова.

Для ДНК-ідентифікації можна використовувати будь-який біологічний матеріал живого чи мертвого організму, наприклад кров, сперму, слину, коріння волосся, шкіру або ж листя або насіння рослин. Важливо тільки, щоб ДНК не була зруйнована. На практиці при проведенні генетичного типування з метою ідентифікації особистості або ступеня генетичного споріднення (близькості або віддаленості) порівнюють профілі ДНК з кількох біологічних зразків і оцінюють отриманий результат, використовуючи імовірнісний і статистичний аналіз.

Процедура типування складається з таких основних етапів: виділення (екстракція) ДНК з біологічного матеріалу; “розщеплення” отриманої ДНК на фрагменти різної довжини за допомогою спеціального набору ферментів – рестриктаз; електрофоретичне розділення фрагментів за розмірами; гібридизація (зв’язування) отриманих фрагментів ДНК з радіоактивними зондами; фіксація електрофоретичного розподілу фрагментів методом радіоавтографії, тобто на рентгенівській плівці. Зв’язані з радіоактивними зондами фрагменти досліджуваної ДНК засвічують рентгенівську плівку у вигляді розташованих одна за одною чорних смуг.

Типування ДНК має різноманітне застосування: у генетичних дослідженнях для визначення походження популяцій людей,

тварин або рослин; у практиці судової медицини для аналізу біологічних доказів; для визначення батьківства або ступеня споріднення; для генетичного аналізу клітин кісткового мозку для його трансплантації від донора реципієнту; для визначення походження мисливських трофеїв або м'яса у випадках бракон'єрства; у селекційній роботі для зменшення ймовірності інбридингу при розведенні вимираючих видів; для підбору генетичних маркерів у тварин і рослин, що дають змогу простежити успадкування батьківських ознак у поколіннях; для вирішення спірних питань авторства при патентуванні штамів мікроорганізмів і рослин; для аналізу еволюційного походження біологічних видів.

Завдяки розробці **методів генного картування** можна, використовуючи специфічний хромосомний сайт як маркер, локалізувати на хромосомі людини ген, асоційований з цим захворюванням, нічого не знаючи про механізм дії цього гена, а потім, використовуючи клонувану послідовність, яка розпізнає цей маркерний сайт, спробувати ідентифікувати дефектний ген. За допомогою цього підходу охарактеризовані гени деяких хвороб людини. Далі методами функціональної геноміки досліджують механізм дії нормальних і дефектних генів та розробляють ефективні методи лікування.

Медична геноміка займається вивченням генних дефектів при спадкових та інших захворюваннях, вивченням експресії мутантних генів та розробкою нових методів діагностики, лікування та профілактики. У зв'язку з цим виник новий напрям – генна терапія, орієнтована на виправлення дефектів, викликаних мутаціями (змінами) у структурі ДНК, або додання клітинам нових функцій.

План заняття

1. Характеристика електрофорезу як фізико-хімічному методу, який використовується для розділення біологічних макромолекул.

2. Назвіть та визначте основні параметри (щонайменше п'ять), які впливають на швидкість та ефективність електрофоретичного розділення НК в агарозному гелі.

3. Наведіть характеристику видів електрофорезу, які використовуються для розділення ДНК:

а) гель-електрофорез;

б) пульс-електрофорез (або електрофорез у пульсуючому полі);

в) капілярний електрофорез.

4. Опишіть техніку проведення електрофорезу, приготування гелів і їхній склад, які використовуються для розділення ДНК.

5. Які методи візуалізації нуклеїнових кислот використовуються у агарозних гелях після їхнього електрофоретичного розділення?

6. Ознайомтесь з методами блоттингу та дайте відповіді на питання:

а) з якою метою застосовують блот-гібридизація за Саузерном?

б) у чому різниця між дот- і слот-гібридизаціями?

в) у яких випадках застосовують Нозерн-блот гібридизацію?

г) для чого застосовують Вестерн-блот, чи імуноблот гібридизацію?

7. Наведіть приклади застосування методу ДНК-фінгерпринту у молекулярній діагностиці.

8. Виберіть правильну відповідь:

8.1 Саузерн-блоттинг – це метод, у якому:

а) рестрикують ДНК та аналізують розміри рестриктів;

б) фрагменти, електрофоретично розподіленої ДНК, з агарозного гелю переносять на нейлонову мембрану;

в) використовують рестриктази та лігази для побудови генетичних карт векторів;

г) за допомогою міченого зонда визначають цільову нуклеотидну послідовність у зразку.

Правильна відповідь: _____.

8.2. Нозерн-блоттинг – це метод, у якому:

а) фрагменти, електрофоретично розділеної ДНК, з агарозного гелю переносять на нейлонову мембрану;

б) за допомогою міченого зонда визначають цільову нуклеотидну послідовність у дослідному зразку;

в) електрофоретично розподілені білки з гелю переносять на нейлонову мембрану;

г) електрофоретично розділену РНК з гелю переносять на нейлонову мембрану.

8.3. Гель-електрофорезом називають метод:

а) електрофоретичного розподілу фрагментів ДНК в агарозному гелі під дією електричного струму;

б) за допомогою міченого зонда визначають цільову нуклеотидну послідовність у зразку;

в) електрофоретично розподілені білки з гелю переносять на нейлонову мембрану;

г) електрофоретично розподілену РНК з агарозного гелю переносять на нейлонову мембрану.

Питання для самостійного опрацювання

1. Вкажіть загальні принципи електрофорезу.
2. Характеристика гелів для вертикального електрофорезу: агарозні, поліакриламідні.
3. Вкажіть особливості проведення електрофорезу РНК.
4. Обладнання, необхідне для проведення горизонтального та вертикального електрофорезу.
5. Опишіть етапи підготовки зразків ДНК для електрофорезу. Методи фрагментації ДНК.
6. Вкажіть барвники, які використовуються при проведенні електрофорезу.
7. Як здійснюють оцінку якості ДНК за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.
8. Опишіть розділення електрофорезом гігантських молекул ДНК.
9. Опишіть методи визначення відносних молекулярних мас нуклеїнових кислот за їх електрофоретичним розподілом в агарозному гелі.
10. Вкажіть застосування методу радіавтографії у молекулярній діагностиці, біологічних дослідженнях.

Література

1. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. – М. : Мир, 1982. – С. 368-400.
2. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование : практическое пособие / Л.А. Остерман. – М. : Наука, 1981. – С. 120–167.
3. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія : підручник / А.В. Сиволоб. – К. : Вид.-поліграф. центр “Київський університет”, 2008. – С. 335–337; 347–349. Режим доступу : biology.org.ua/files/lib/MolBiol_sivolob.pdf
4. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. С Херрингтона и Дж. Макги : пер. с англ. – М. : Мир, 1999. – С. 374–394.
5. Федоренко В.О., Остап Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. – Львів : Вид. центр ЛНУ, 2007. – С. 185–196.
6. Электрофорез ДНК. Справочник химика. Режим доступа : <https://chem21.info/searchdata/?query>.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 4

МЕТОДИ СИНТЕЗУ ПОЛІНУКЛЕОТИДІВ

Мета: ознайомитися з хіміко-ензиматичними й ензиматичними методами синтезу полінуклеотидів, які застосовуються у лабораторній практиці та молекулярній діагностиці.

Теоретичні відомості

Синтез олігонуклеотидів – це хімічний синтез коротких фрагментів нуклеїнових кислот із заданою хімічною структурою (послідовністю). Один з найпоширеніших способів синтезу олігонуклеотидів базується на використанні амідифосфітів – будівельних блоків, які є реакційноздатними похідними дезоксирибонуклеозидів (dA, dC, dG, T) або рибонуклеозидів (A, C, G, U) і дають змогу синтезувати короткі фрагменти ДНК й РНК, відповідно. Застосовуються також й інші амідифосфіти, що дають змогу вводити в ланцюг продукту модифіковані нуклеозиди, різні мітки й функціональні групи. У ході синтезу ці реагенти у певному визначеному порядку приєднують до зростаючого на твердофазному носії ланцюга. Цей процес був повністю автоматизований у кінці 1970-х років і сьогодні виконується у спеціальних синтезаторах, керованих комп'ютерами. Після завершення синтезу олігонуклеотид відокремлюють від носія, усувають захисні групи, що використовувалися під час синтезу і очищають отриманий продукт за допомогою електрофорезу або ВЕРХ.

Синтетичні олігонуклеотиди мають значне застосування у молекулярній біології та медицині, наприклад, як антизмістові олігонуклеотиди, праймери для секвенування й ампліфікації ДНК, лінкери для з'єднання фрагментів ДНК, зонди для визначення комплементарних послідовностей ДНК і РНК, інструменти для спрямованого введення мутацій і сайтів рестрикції, а також для синтезу штучних генів.

У хімічному синтезі олігонуклеотидів використовують такі методи: 1) фосфаттриєфірний та його модифікацію – фосфіттриєфірний; 2) фосфатдієфірний метод. Назва методу походить від того, що є продуктом реакції – фосфодієфір, чи фосфотриєфір. Для уникнення небажаних побічних реакцій усі

функціональні групи нуклеотидів та нуклеозидів є блоковані (захищені). Захисту підлягають: екзоциклічні аміногрупи азотистих основ, гідроксильні групи дезоксирибози, один з двох гідроксилів залишку фосфорної кислоти (в фосфаттриєфірному методі).

Методологію хімічного синтезу генів опрацював Хар Гобінд Корана (1922–2011) – видатний американський молекулярний біолог, лауреат Нобелівської премії з медицини та фізіології 1968 р. (спільно з Робертом Голлі і Маршаллом Ніренбергом) “за розшифрування генетичного коду і його ролі у синтезі білків”.

Хіміко-ензиматичний синтез генів вміщає такі етапи: 1) синтез одониткових олігонуклеотидів, які є складовими обох ланцюгів ДНК; 2) утворення водневих зв'язків між ланцюгами ДНК, фосфорилювання їх 5'-кінців за допомогою полінуклеотидкінази; 3) з'єднання ланцюгів ДНК-лігазою *E. coli* (каталізує з'єднання фрагментів з липкими кінцями); 4) лігування фрагментів ДНК у повну послідовність гена ДНК-лігазою фага Т4, яка каталізує з'єднання фрагментів з липкими або тупими кінцями.

У 1969 р. Х. Г. Корана розробленим ним методом синтезував структурну частину гена аланінової тРНК дріжджів (77 п.н.), у 1976 р. – повний ген супресорної тРНК^{Тир} – дуплекс з 207 п.н, який, до того ж, містив промотор (51 п.н.), ділянку сигналу процесингу первинного транскрипту гена (25 п.н.) та липкі кінці, що утворює рестриктаза *EcoRI*. Функціональність синтетичного гена супресорної тРНК^{Тир} було доведено після введення у мутантні клітини *E. coli* рекомбінантної ДНК, що містила синтетичний ген.

Ензиматичний синтез генів *in vitro*, порівняно з хімічним, є простішим у виконанні. Через специфічність ензиматичних реакцій немає потреби у захисті функціональних груп нуклеотидів, однак на відміну від ензимо-хімічного, важче контролювати перебіг реакцій. Для синтезу полінуклеотидів використовують полінуклеотид-фосфорилазу та зворотну транскриптазу.

Полінуклеотидфосфорилаза – фермент, перший відкритий з-поміж ферментів синтезу НК (С. Очоа та М. Грюнберг-Маного, 1955 р.), який у клітині (*in vivo*) здійснює руйнування мРНК. У лабораторній практиці (*in vitro*) використовується для синтезу РНК – його субстратами є 5'-рибонуклеозиддифосфати (РНДФ). Реакція полімеразиції РНДФ є зворотною – за надлишку фосфату відбувається руйнування полімеру.

У ензиматичному синтезі за використання зворотної транскриптази і мРНК певного гена як матриці необов'язково знати його нуклеотидну послідовність. Синтез кДНК за допомогою зворотної транскриптази здійснюється так: на I етапі до виділеної мРНК додають олігоТ-праймер, який гібридизується з поліА-послідовністю матриці; на II етапі – вносять суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) і зворотну транскриптазу, яка, приєднуючись до 3'-кінця олігоТ-праймера синтезує кДНК на мРНК з утворенням гібриду кДНК-мРНК; на III етапі проводять лужний гідроліз мРНК, на IV – вносять Кленов-фрагмент, який, приєднуючись до “шпильки”, синтезує другий ланцюг ДНК, на V – вносять нуклеазу S для руйнування шпильки та видалення праймера. Результатом ензиматичного синтезу є подвійний ланцюг кДНК цільового гена.

Одним з найпоширеніших сьогодні методів синтезу полінуклеотидів є полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР або PCR) – метод значного збільшення (ампліфікації) цільових фрагментів ДНК (*in vitro* чи *in situ*). Метод ПЛР розроблено Кері Мюллісом у 1983 р., який на той час був працівником однієї з перших біотехнологічних корпорацій “Cetus” (м. Емерівіль, Каліфорнія) та невдовзі був нею запатентований. У 1992 р. фармацевтична компанія “Hoffmann-La Roche” придбала права на цей патент і на сьогодні має усі права на ПЛР.

ПЛР здійснюють в **ампліфікаторі** – приладі, що забезпечує періодичну та швидку зміну температури (нагрівання і охолодження) тестових проб з точністю не менше $\pm 0,1$ °C. За допомогою ПЛР ампліфікують відносно короткі (до 10 кб) ділянки ДНК з відомими кінцями, у окремих випадках – до 40 кб. Для найпростішої ПЛР потрібні такі компоненти: ДНК-матриця (фрагмент ДНК); два праймери; термостабільна ДНК-полімераза (Taq-полімераза); чотири типи дезоксинуклеотидтрифосфатів; буферний розчин.

ПЛР-метод є експрес-методом (аналіз готовий за 4 – 8 год), який є високо чутливим, специфічним, забезпечує можливість роботи практично з будь-яким видом біоматеріалу, пробами з об'єктів довкілля, включаючи харчові продукти.

При проведенні ПЛР, зазвичай виконується 20–35 циклів (іноді 40 – 50), кожен з яких складається з трьох стадій: денатурація ДНК (нагрівання розчину цільової ДНК до 94-96 °C (або до 98 °C за використання особливо термостабільної полімерази) на 0,5–10 хв для розділення ланцюгів ДНК), відпал (гібридизація праймерів з кінцями

цільової ділянки матриці) та елонгація (реплікація матриці ДНК-полімеразою, частіше Taq і Pfu-полімеразами за наявності праймерів як затравки). Якщо нуклеотидна послідовність матриці відома лише частково чи зовсім невідома, використовують вироджені праймери, послідовність яких містить вироджені позиції, у яких можуть розташовуватися будь-які нуклеотиди. Зокрема, послідовність праймера може такою: ATN..., де N є A, T чи C.

Останніми роками розроблено різні модифікації ПЛР-методу залежно від мети та об'єкту: вкладена ПЛР (англ. *Nested PCR*), інвертована ПЛР (англ. *Inverse PCR*), ПЛР із зворотною транскрипцією (або ЗТ-ПЛР, англ. *Reverse Transcription PCR, RT-PCR*), асиметрична ПЛР (англ. *Assymetric PCR*), кількісна ПЛР (англ. *Quantitative PCR, Q-PCR*), ступінчаста ПЛР (англ. *Touchdown PCR*), метод молекулярних колоній (або “ПЛР в гелі”, англ. *Polony – PCR Colony*).

ПЛР-метод застосовується у багатьох напрямках біологічних наук (насамперед, у філогенії, систематиці, у транскриптоміці – для визначення рівня експресії генів), криміналістиці, встановленні батьківства, діагностиці вірусних інфекцій.

План заняття

1. Ознайомтесь з хімічним і хіміко-ензиматичним методами синтезу полінуклеотидів, їхніми модифікаціями та дайте відповіді на запитання:

1.1. Яку методологію хімічного синтезу генів запропонував Х.Г. Корана?

1.2. Які субстрати використовують у фосфатриєфірному, фосфіттри-єфірному та фосфатдиефірному методах синтезу генів?

1.3. Які методологічні підходи застосовують у зазначених методах для уникнення небажаних продуктів реакції?

1.4. Які основні етапи хіміко-ензиматичного синтезу генів Ви знаєте? Опишіть їх.

1.5. Яка роль ДНК-лігази *E. coli* у хіміко-ензиматичному синтезі генів?

2. Дайте характеристику етапів ензиматичного синтезу генів *in vitro* та вкажіть його застосування у наукових цілях й аналітичній практиці.

3. Ознайомтесь з методом ПЛР, її модифікаціями, застосуванням на практиці та дайте відповіді на питання:

3.1. Для чого проводять денатурацію, відпал і гібридизацію у ПЛР.

3.2. Які ферменти використовуються у ПЛР зі зворотною транскрипцією ПЛР (RT-PCR) та з якою метою?

3.3. Якими перевагами володіє Real-Time PCR (ПЛР в реальному часі), порівняно з класичною ПЛР, та яке це має значення?

3.4. У яких випадках застосовують метод ПЛР довгих фрагментів (Long-range PCR)?

3.5. Який ген слугує маркером у пренатальній діагностиці статі методом ПЛР та як його ідентифікують?

4. Ознайомтесь з методами детекції ПЛР-продуктів та зазначте:

4.1) принцип роботи методу з використанням TaqMan зондів;

4.2) принцип роботи методу з використанням молекул-маяків;

4.3) принцип роботи методу за використання двох зондів з резонансним переносом енергії;

4.4) яке призначення мають інтеркалюючі агенти у детекції НК.

5. Заповніть пропуски у таких твердженнях:

5.1. _____ використовують як експрес-метод діагностики інфекційних хвороб, для здійснення епідеміологічного нагляду за інфекційними хворобами, епідемічної значимості збудника хвороби на підставі вияву його генетичних маркерів вірулентності, визначення молекулярних механізмів стійкості збудників хвороб до антимікробних засобів, для верифікації сумнівних результатів, отриманих іншими діагностичними методами, виявлення трансгенів у продуктах харчування.

5.2. На практиці, у лабораторіях, окрім ПЛР, можуть використовувати метод ідентифікації нуклеїнових кислот, що базується на одночасному застосуванні трьох ферментів: _____, РНК-ази й РНК-полімерази T7-NASBA (Nucleic Acids Sequence Based Amplification) у “реальному часі”. NASBA є ізотермічною реакцією, яка здійснюється при температурі $+41^{\circ}\text{C}$, на відміну від ампліфікації у ПЛР, яка здійснюється при _____.

5.3. Під час ампліфікації NASBA реакції відбувається збільшення кількості _____, яка транскрибується зі спеціального промотора (РНК-полімерази T7), що є складовою специфічного праймера.

5.4. У NASBA реакції після першого етапу (зворотної транскрипції) другий ланцюг ДНК синтезується ферментом

_____, яка водночас має активність РНК-ази. Завдяки цій активності усувається матрична РНК.

5.5. На третьому етапі NASBA реакції фермент _____ транскрибує за один цикл (за 5–15 хв) 10^5 копій РНК. У результаті, за 40–50 хв ізотермічної транскрипційно опосередкованої ампліфікації ДНК або РНК синтезується 10^{10} копій НК. Сьогодні принцип NASBA застосовується у діагностичних наборах “AmpliSens”, “BioMerieux”, “Organon Technika”.

6. Виберіть правильну відповідь:

6.1. Синтетичні олігонуклеотиди ДНК (праймери) можна отримати за допомогою методу:

- а) полімеразна ланцюгова реакція;
- б) молекулярного клонування;
- в) ампліфікації ДНК;
- г) секвенування;
- д) хіміко-ферментативного.

Правильна відповідь: _____.

6.2. Визначте, що таке полілінкер. Це:

- а) молекула ДНК, що використовується для рекомбінації;
- б) ділянка ДНК, що містить кілька сайтів лігування;
- в) фрагмент ДНК, що містить кілька унікальних сайтів рестрикції;
- г) білок, від якого залежить ефективність трансформації.

Правильна відповідь: _____.

6.3. Назвіть методи генно-інженерних маніпуляцій, у яких застосовують ферменти ДНК-полімерази:

- а) синтез кДНК на матрицях РНК;
- б) метод нік-трансляції,
- в) випадкових гексануклеотидних праймерів,
- г) полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР).

Правильна відповідь: _____.

6.4. Функціональність синтетичного гена (супресорної тРНК^{Тир} – дуплексу з 207 п.н.) доведено:

- а) методом полімеразно-ланцюгова реакції (ПЛР);
- б) ДНК-чипуванням,
- в) методом рестрикції – лігування;
- г) методом клонування рекомбінантної ДНК, що містила досліджуваний ген в мутантні клітини *E. coli* (містили амбер-мутацію).

*Правильна відповідь:*_____.

6.5. Для синтезу полінуклеотидів в ензиматичному методі використовують ферменти:

- а) ДНК-полімерази та ДНК-лігази;
- б) зворотну транскриптазу та ДНК-полімерази;
- в) полінуклеотидфосфорилазу та зворотну транскриптазу;
- г) зворотну транскриптазу та ДНК-лігази.

*Правильна відповідь:*_____.

6.6. Очищені ДНК-полімерази та синтетичні олігонуклеотиди ДНК можна використовувати для ампліфікації окремих ділянок геному за допомогою методу:

- а) полімеразно ланцюгової реакції;
- б) фосфаттриєфірного;
- в) фосфіттриєфірного;
- г) секвенування.

*Правильна відповідь:*_____.

6.7. Визначте метод, яким можна ідентифікувати інтегрований у геном трансген:

- а) рестриктний аналіз;
- б) гель-електрофорез;
- в) полімеразна ланцюгова реакція;
- г) фінгерпринтинг ДНК.

*Правильна відповідь:*_____.

6.8. Оберіть праймер, який використовують для конструювання бібліотеки клонів кДНК у реакції зі зворотною транскриптазою:

- а) oligoA;
- б) oligoT;
- в) oligoC;
- г) праймер не потрібен.

*Правильна відповідь:*_____.

6.9. Визначте, що відбувається на етапі охолодження у кожному циклі полімеразної ланцюгової реакції:

- а) ренатурація ДНК;
- б) ренатурація Taq-полімерази;
- в) зупинка синтезу ДНК;
- г) реасоціація праймерів із матрицею.

*Правильна відповідь:*_____.

6.10. Визначте, для чого застосовують процедуру RT-PCR:

- а) ампліфікації рестриктного фрагмента ДНК;
- б) ампліфікації кДНК;
- в) ампліфікації рекомбінантної Т-міченої ДНК;
- г) ампліфікації транспортної РНК.

Правильна відповідь: _____.

Питання для самостійного опрацювання

1. Як здійснюється хіміко-ензиматичний синтез полінуклеотидів *in vitro*? Вкажіть розробника цього методу.
2. Вкажіть етапи та умови здійснення методу ензиматичного синтезу полінуклеотидів *in vitro*?
3. Що таке лінкери? Як їх використовують у ензиматичному синтезі генів?
4. Які дві стратегії хімічного синтезу гена завдовжки 0,5 т.п.н. Ви можете запропонувати? Опишіть їх.
5. Дайте характеристику етапів та умов перебігу ПЛР, вкажіть необхідні компоненти.
6. Яких умов потрібно дотримуватись, щоб уникнути забруднення при проведенні ПЛР.
7. Які модифіковані ПЛР Вам відомі?
8. Зазначте модифікації та методологічні особливості, які застосовуються у таких ПЛР: SSR-ПЛР, ISSR-ПЛР, мультиплексній ПЛР, ЗТ-ПЛР. ПЛР у реальному часі.
9. Що таке метод ПЛР/ЛОЗ? Назвіть основні методологічні особливості цього методу.
10. Які принципи детекції продуктів НК використовуються у пробі *TaqMan*, методі молекулярних маяків та резонансного перенесення енергії?
11. Як застосовується ПЛР у клінічній діагностиці зразків тканин (нативних і фіксованих)?
12. Як застосовується ПЛР у клінічній діагностиці папілома-вірусних інфекцій?

Література

1. Божков А.И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А.И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – С. 197–202.
2. Глик Б., Пастернак Дж.. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М. : Мир, 2002. – С. 80–88, 94–102.
3. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. С. Херрингтона и Дж. Макги : пер. с англ. – М. : Мир, 1999. – С. 329–372.
4. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. С. 254–257.
5. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія: підручник. – К. : Вид.-поліграф. центр “Київський університет”, 2008. – С. 339–343. Режим доступу : biology.org.ua/files/lib/MolBiol_sivolob.pdf.
6. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004. – С. 48–79.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 5

МЕТОДИ КОНСТРУЮВАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК

Мета: ознайомитися з генно-інженерними ферментами та методами отримання рекомбінантних білків за використання прокаріотичних та еукаріотичних систем.

Теоретичні відомості

Функціонально активні рекомбінантні молекули ДНК мікроорганізмів уперше (у 1973 р.) були сконструйовані **С. Коеном, Д. Хелінським, Г.Бойєром** та їхніми співробітниками. Одночасно науковою групою С. Коена була розв'язана проблема об'єднання фрагментів ДНК різного походження з векторними молекулами ДНК (плазмід, бактеріофагів). За допомогою ферментів бактерійного походження – рестриктаз і лігаз – були сконструйовані перші **“химерні” плазмиди**, у складі яких були “зшиті” в одну кільцеву молекулу фрагменти ДНК не тільки різних видів бактерій, а й різних рослин і тварин. Відтоді створено могутню техніку генної інженерії, спеціальну апаратуру, розроблено методи виділення генів, їхньої ампліфікації, секвенування, клонування, а також підходи до їхньої експресії у гетерологічних системах – бактерійних клітинах, клітинних лініях тваринного і рослинного походження.

Генна інженерія пов'язана зі скерованим створенням нових комбінацій генетичного матеріалу. Суть цієї технології полягає у виділенні фрагментів ДНК, їхньому об'єднанні з векторними системами (див. додаток Г) *in vitro* та наступним введенням цих нових (рекомбінантних) генетичних структур до живої клітини, де новостворений генетичний матеріал здатний розмножуватися і забезпечувати синтез кінцевих продуктів (див. додаток Д). Серед багатьох біологічних об'єктів, що переважно використовуються у ролі систем для клонування чужорідних генів, – *E. coli*, одноклітинні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* і різні клітинні лінії тваринного походження (комах, рослин і ссавців). Усі вони успішно використовуються для отримання рекомбінантних білків, що кодуються клонованими генами.

Прокаріотичні системи експресії успішно використовуються для синтезу багатьох білків. Проте деякі еукаріотичні білки для

перетворення їх в активну форму зазнають специфічних посттрансляційних модифікацій – глікозилювання, фосфорилування чи ацетилювання, а бактерії до цього не здатні. Тому було розроблено нову стратегію експресії клонованих генів в еукаріотичних клітинах за допомогою спеціально сконструйованих еукаріотичних експресибельних векторів. Для цього було використано дріжджі *S. cerevisiae*, геном яких добре вивчений, і, до того ж, їх можна вирощувати у великих ферментерах. Щоб спростити очистку білків, були сконструйовані вектори, що забезпечують їхню секрецію у *S. cerevisiae*, у результаті чого отримали багато різноманітних **аутентичних білків**. Проте багато рекомбінантних білків у цій системі не зазнавали посттрансляційних модифікацій, і, крім того, їх вихід був незначним. Тому згодом було розроблено інші дріжджові системи для синтезу рекомбінантних білків, зокрема на основі **бакуловіруса AcMNPV**, який інфікує клітини багатьох комах. У результаті трансфекції клітин комах цим транспортним вектором з клонованим геном, фланкований AcMNPV-специфічними послідовностями, відбувається подвійний кросинговер між вектором і геном AcMNPV. Результатом інтеграції клонованого гена є вбудовування в ген AcMNPV і потрапляння під контроль сильного промотора, що функціонує на останніх стадіях літичного циклу. Клітини комах, інфіковані рекомбінантним бакуловірусом, синтезують гетерологічний білок.

На основі бакуловірусів розроблена більш досконала система експресії – **бакміда** – човниковий вектор *E. coli* та клітини-комахи, який дає можливість здійснювати генно-інженерні маніпуляції у клітинах *E. coli*. Для цього клітини комах трансфікують рекомбінантною бакмідою тільки для отримання гетерологічного білка. За використання експресибельної системи отримують приблизно 95 % гетерологічних білків з відповідними посттрансляційними модифікаціями.

Позахромосомні експресибельні вектори ссавців здебільшого використовують для синтезу гетерологічних білків, які використовуються для наукових і медичних потреб. Вони є човниковими векторами із сайтами ініціації реплікації вірусу тварин і *E. coli*-плазмід. Регуляторні елементи транскрипції здебільшого походять від геному вірусу тварин чи ссавців. Для відбору трансфікованих клітин використовують домінантні селективні маркерні гени. Наприклад, деякі системи добору базуються на

введенні у середовище зростаючої кількості цитотоксичної сполуки, яка забезпечує добір клітин із великою кількістю копій вектора, що збільшує вихід чужорідного білка.

Розроблено **системи експресії генів ссавців**, що дають можливість отримувати гетеродимерні білки. Для цього клітини трансфікують одразу двома векторами, кожен з яких містить ген однієї субодиниці. Альтернативний підхід полягав у використанні одного вектора, який містив ці два гени у вигляді окремих одиниць транскрипції чи у вигляді одного транскриптона з обома генами.

Розроблений арсенал підходів дає можливість створювати трансгенні організми, штами, клітинні лінії, які володіють цінними властивостями, наприклад, бактерійні штами, здатні синтезувати еукаріотичні білки. Серед білкових продуктів, отриманих генно-інженерними методами, – гормони (інсулін, соматотропін, соматостатин тощо), інтерферони, антигени, антитіла, ферменти.

Із виникненням технології рекомбінантних ДНК стало можливим створювати нові біополімери, замінювати синтетичні продукти їх біологічними аналогами, модифікувати існуючі біополімери для поліпшення їх фізичних і структурних характеристик, збільшувати ефективність деяких промислових процесів, зменшувати їх собівартість.

План заняття

1. Ознайомтеся з біологічними об'єктами й особливостями їхнього застосування для отримання рекомбінантних білків та дайте відповіді на запитання:

1.1. Які біологічні об'єкти використовуються для отримання рекомбінантних білків?

1.2. Зазначте основні властивості *E. coli*, що дають змогу проводити у її клітинах клонування генів?

1.3. Які причини визначили вибір *S. cerevisiae* як об'єкта для клонування генів?

1.4. Назвіть методи введення рекомбінантних плазмід до клітин *E. coli*.

1.5. Які вектори використовують для клонування рекомбінантних молекул у бактерійні системи (на прикладі *E. coli*)?

2. Ознайомтеся з методами та підходами, які використовуються для конструювання та клонування рекомбінантних ДНК, дайте відповіді на запитання:

2.1. Які ферменти використовуються для конструювання рекомбінантних молекул ДНК?

2.2. Які маніпуляції застосовують у конструюванні рекомбінантних молекул для уникнення небажаних (баластних) продуктів?

2.3. Як здійснюють клонування складних (мозаїчних) еукаріотичних генів у бактерійні системи?

2.4. Які умови є необхідними для проведення успішного клонування рекомбінантних ДНК?

2.5. Які переваги чи недоліки має інтеграція плазмідного вектора у ДНК клітини-господаря?

3. Ознайомтеся з методами селекції клонів клітин, що містять рекДНК та дайте відповіді на запитання:

3.1. Як здійснюють фенотипову селекцію клонів клітин, що містять рекДНК?

3.2. Як ідентифікують клони клітин з рекомбінантною ДНК за допомогою гібридизації нуклеїнових кислот та імунологічних методів.

3.3. Як застосовують радіоактивне мічення нуклеїнових кислот для ідентифікації клонів клітин з рекомбінантною ДНК. Методи ДНК-ДНК та ДНК-РНК гібридизації.

3.4. Як здійснюють конструювання та скринінг геномних бібліотек?

3.5. Чому для отримання білків, які використовуються у медицині, медичній діагностиці є кращими еукаріотичні, а не прокаріотичні системи?

4. Які переваги і недоліки мають різні типи дріжджових векторів, призначені для отримання певного рекомбінантного продукту?

5. Заповніть пропуски у таких твердженнях:

5.1. Щоб з'ясувати, чи містить цей клон ДНК, що кодує раніше охарактеризований білок, часто проводять _____, тобто клонувану ДНК використовують для того, щоб відібрати відповідну мРНК, продукт трансляції якої можна потім порівняти з відомим білком.

5.2. Новий гібридний ген, який кодує _____, може бути утворений шляхом з'єднання частин кодуючих послідовностей двох різних генів.

5.3. У клітинах зародкової лінії у _____ мишей наявні хромосоми зі стабільними змінами, які виникли у результаті інтеграції клонованої ДНК.

5.4. Колонія клітин, яка походить від однієї клітини, називається _____.

5.5. Окрема колонія бактерій, яка містить плазмиду із включеним у неї фрагментом ДНК людини, називається _____; набір таких бактерій, які містять увесь геном людини, складає _____.

6. Виберіть правильну відповідь:

6.1. Синтетичні олігонуклеотиди ДНК (праймери) можна отримати за допомогою методу:

- а) полімеразної ланцюгової реакції;
- б) молекулярного клонування;
- в) ампліфікації ДНК;
- г) секвенування;
- д) хіміко-ферментативного.

Правильна відповідь: _____.

6.2. Оберіть організми, для яких сконструйовані експресибельні вектори на основі ДНК бакуловірусів для експресії білків:

- а) бактерії;
- б) дріжджі;
- в) клітини комах;
- г) клітини ссавців.

Правильна відповідь: _____.

6.3. Імуноферментний ELISA-тест використовують для ідентифікації:

- а) мієлоїдних клітин;
- б) антитіл;
- в) ДНК;
- г) РНК;
- д) антигенів.

Правильна відповідь: _____.

6.4. Вкажіть дві найголовніші з перерахованих проблем експресії еукаріотичних білків у бактерійних клітинах:

- а) наявність у бактерій хроматинових структур;

б) наявність у бактерій еукаріотичної системи поліаденілювання мРНК;

в) відсутність у бактерій еукаріотичної системи сплайсингу мРНК;

г) відсутність у бактерій еукаріотичних систем посттрансляційних модифікацій.

Правильна відповідь: _____.

6.5. Визначте, які з перерахованих проблем експресії еукаріотичних білків притаманні бактерійним клітинам:

а) наявність у бактерій хроматинових структур;

б) наявність у бактерій еукаріотичної системи поліаденілювання мРНК;

в) відсутність у бактерій еукаріотичної системи кепування мРНК;

г) відсутність у бактерій еукаріотичних систем посттрансляційних модифікацій.

Правильна відповідь: _____.

Питання для самостійного опрацювання

1. Які вектори молекулярного клонування застосовуються для ампліфікації рекДНК у прокаріотичних системах?

2. Дайте характеристику плазмідних векторів (pBR322, pUC19), які використовуються у конструюванні і клонуванні рекДНК.

3. Зазначте структуру і властивості фагових векторів, космід і фагмід, які використовуються у конструюванні і клонуванні рекДНК.

4. Як здійснюється інтеграція чужорідної ДНК у ДНК клітини-господаря.

5. Які системи експресії рекомбінантних ДНК, оптимізовані для *S. cerevisiae* (вектори для *S. cerevisiae*; пряма експресія у *S. cerevisiae*).

6. Опишіть підходи, які застосовуються для підвищення ефективності секреції рекомбінантних білків.

7. Як забезпечують секрецію гетерологічних білків, які синтезуються у *S. cerevisiae*.

8. Дайте характеристику векторів на основі вірусів, які використовуються для конструювання і клонування рекДНК терапевтичного призначення.

9. Що таке бакуловіруси? бакміда?

10. Що таке афінна мітка? Вкажіть її призначення

Література

1. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 15–28, 50–157.
2. Компанець Т.А. Віруси як векторні системи : курс лекцій / Т.А. Компанець. – К. : В-во Фітосоціологічного центру, 2007. – С. 13–81.
3. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. – С. 161–239; 313–371.
4. Федоренко В.О. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів : навч. посіб. [для студентів біологічних факультетів університетів] / В.О. Федоренко, Б.О. Осташ, М.В. Гончар, Ю.В. Ребець. – Львів : Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2007. – С. 178–236.
5. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004. – С. 12–36, 80–166, 204–428.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 6

МЕТОДИ СЕКВЕНУВАННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ. ГЕНОМНІ БАЗИ ДАНИХ

Мета: ознайомитись з методами секвенування нуклеїнових кислот першого, другого та третього поколінь, з принципами укладання та правилами користування геномними базами даних.

Теоретичні відомості

Секвенування НК – це метод визначення послідовності мономерів (нуклеотидів, амінокислот) у молекулах біополімерів (нуклеїнових кислот, білків). Загальні підходи до визначення первинної структури біополімерів було розроблено роботами Ф. Сенджера. Основний підхід, який застосовується під час секвенування ДНК, – фракціонування нуклеїнових кислот (НК) у поліакриламідних гелях (ПААГ). Секвенування ДНК використовується для розшифровки генів і занесення цієї інформації до банку даних (Genbank) та її подальшої інтерпретації методами біоінформатики. Для секвенування ДНК застосовуються методи Едмана, Сенгера та інші; сьогодні для секвенування НК застосовується метод Сенгера з дидезоксинуклеозид-трифосфатами (ddNTP).

Секвенування відбувається у три етапи: виділення геномної ДНК, прочитка і створення бібліотеки фрагментів; збір, анотація та аналіз. Для секвенування як і для мас-спектрометрії і тих методів, які дають великий масив даних, потрібні значні кількості молекул (порядку 10^5 – 10^8). Найчастіше для секвенування використовують кілька нанограм ДНК.

Відповідно до методик, початковим етапом секвенування з використанням ПЛР, є ампліфікація цільової ділянки ДНК, послідовність якої потрібно визначити. Крім ампліфікації ДНК, ПЛР дає змогу здійснити безліч інших маніпуляцій з НК: ввести мутацію, об'єднати фрагменти ДНК тощо. Метод ПЛР широко використовується у біологічній й медичній практиці, наприклад, для встановлення батьківства, діагностики спадкових та інфекційних захворювань, клонування та виділення нових генів.

Першими секвенованими геномами були вірусні (ДНК вірусу натуральної віспи (1993), цитомегаловірусу, вірусу вісповакцини, а

також ДНК органодів еукаріот – мітохондрій і хлоропластів, зокрема хлоропластний геном еуглени *Euglena polymorpha*.

Перший секвенований геном самостійного організму належав бактерії *Haemophilus influenzae* (1995). Цей проект виконували 40 науковців з 4 дослідницьких центрів США. Далі було секвеновано геноми *Mycoplasma genitalum* (1995), архебактерії *Methanococcus jannaschii* (1996), бактерії *Methanobacterium thermoautotrophicum*, кишкової палички *Escherichia coli* (1997) та багато інших (див. додаток К)

Наступним кроком у секвенуванні – розшифровка геномів еукаріотів. У 1996 році секвеновано геном дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Над цим проектом працювала ціла мережа дослідних центрів і лабораторій у США, Західній Європі та Японії. Було визначено 12 млн 68 т.п.н. із 13389 т.п.н. повного геному, розподіленого у 16-ти хромосомах.

Одним з перших і найбільш популярних методів секвенування є метод Сенгера (Frederick Sanger) – “метод термінаторів”. У цьому методі до одноланцюгової ДНК-матриці вноситься повний набір дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP), ДНК-полімераза, невелика кількість одного з чотирьох типів дидезоксинуклеозидтрифосфату (зокрема, ddATP) та радіоактивно-мічений праймер. Дидезоксинуклеотид відмінний тим, що містить Гідроген (H) замість ОН-групи не тільки при 2’-, а й при 3’-положенні пентози. Включення такого нуклеотиду ДНК-полімеразою у новосинтезований ланцюг веде до його передчасної термінації. Оскільки ddATP присутній у малій кількості, така термінація буде спостерігатися у різних позиціях дочірнього ланцюга – в усіх, де зустрічається аденін. У результаті наступного етапу денатурації продуктів реакції отримують набір мічених одноланцюгових ДНК-фрагментів від праймера до кінцевого аденіну. Довжина цих ДНК-фрагментів у нуклеотидах визначає порядковий номер аденіну у складі матричного ланцюга.

Визначення довжини новосинтезованих ДНК-фрагментів здійснюють гель-електрофорезом (за денатуруючих умов); водночас у сусідні лунки гелю вносять продукти синтезу ДНК-фрагментів, отримані за присутності інших дидезоксинуклеотидів. Після електрофорезу та візуалізації смуг з такого гелю читають нуклеотидну послідовність ланцюга (див. додаток Л).

Метод Сенгера сьогодні використовується в автоматичних секвенаторах у модифікованому вигляді: у ньому замість

радіоактивно-мічених застосовуються флуоресцентно-мічені праймери (використовують чотири різні флуоресцентні мітки, для кожного із чотирьох ddNTP індивідуальна; вони випромінюють світло у різних спектральних діапазонах). Продукти усіх чотирьох реакцій полімеризації (ДНК-фрагменти) вносять на гель-електрофорез в одну лунку. Після електрофоретичного розділення сканують гель лазерним променем, що збуджує флуоресценцію міток – це змогу ідентифікувати продукти різних реакцій, тобто різні кінцеві нуклеотиди, і, таким чином, прочитати нуклеотидну послідовність.

В іншому методі секвенування Максама-Гілберта (Allan M. Maxam, Walter Gilbert) застосовують хімічне розрізання ланцюга на нуклеотиді певного типу. Отримані ДНК-фрагменти різної довжини розділяють за допомогою електрофорезу.

Технологія піросеквенування (секвенування шляхом синтезу) використовується сьогодні компанією Roche Diagnostics і дає змогу визначати близько 400 млн нуклеотидів за 10 годин роботи на одній установці. Кожен раунд роботи коштує близько 5 – 7 тис. доларів.

Піросеквенування (англ. *Pyrosequencing*) – метод визначення послідовності нуклеотидів ДНК, що ґрунтується на принципі “синтез через інкорпорацію”, на відміну від методу секвенування Сенгера (англ. *Sanger sequencing*), де проходить за такою схемою: 1) ампліфікація сегменту ДНК використовується капілярний електрофорез. Технологію піросеквенування розробили дослідники Пол Нюрен (швед. *Pål Nyrén*) та його PhD-студент Мостафа Ронаджі (англ. *Mostafa Ronaghi*) у Королівському Технічному Інституті (Стокгольм, Швеція) у 1996 р.

Піросеквенування методом ПЛР. У цьому методі один з праймерів є біотинильований. Після денатурації біотинильований одноланцюговий ПЛР-амплікон ізолюється та гібридизується з sequencing-праймером; 2) гібридизований праймер та одноланцюговий ПЛР-амплікон інкубуються з ферментами: ДНК-полімеразою, люциферазою, АТФ-сульфуразою, апіразою, а також з субстратами аденозин-5'-фосфосульфатом (АФС) та люциферином; 3) до реакції вноситься один з дезоксирибонуклеотид-три-фосфатів (dNTP) – dATP, dTTP, dGTP чи dCTP. ДНК-полімераза каталізує додавання певного dNTP до sequencing-праймера. Коли є комплементарність до нуклеотида в ланцюгу ПЛР-амплікона, відбувається інкорпорація. Кожна успішна інкорпорація

супроводжується вивільненням пірофосфату (PPi), в еквімолярній кількості інкорпорованих нуклеотидів; 4) АТФ-сульфураза конвертує PPi у АТФ за присутності АФС. Цей АТФ реагує з люциферином, який конвертується у оксилюциферин, що супроводжується генерацією видимого світла, кількість якого пропорційна кількості АТФ. Це світло, що продукується внаслідок люциферин-каталізуючої реакції фіксується спеціальними CCD-сенсорами, які передають сигнал до комп'ютера, програмне забезпечення якого конвертує сигнали та виводить дані у вигляді піків, з яких формується пірограма. Висота кожного піка пропорційна кількості інкорпорованих нуклеотидів; 5) завдяки апіразі відбувається деградація неінкорпорованих нуклеотидів та АТФ. Коли деградація завершується, додається другий нуклеотид; 6) додавання dNTP відбувається послідовно. Деоксиаденозин α -тіотрифосфат використовується як заміна деоксиаденозин-трифосфату дАТФ, який використовується ДНК-полімеразою, але не взаємодіє з люциферазою. Коли процес продовжується, комплементарний ланцюг ДНК елонгується та формує послідовність нуклеотидів та у вигляді сигналів (піків) відображається як пірограма.

Піросеквенування застосовують у різних напрямках науки та практиці: епігенетиці для встановлення метильованості ДНК, ветеринарії для визначення патогенності інфекції, у генетиці для визначення зиготності поліплоїних організмів, генного поліморфізму (англ. *single nucleotide polymorphism*, фармакогенетиці, судовій медицині.

У США та Великобританії, а згодом у Китаї були розроблені та впроваджені автоматичні прилади секвенування геномів – **секвенатори**, названі **геномотронами**. У них здійснюється більше 100 000 полімеразних реакцій за годину. Значну роль на цьому етапі має обчислювальна техніка та інформаційні системи. Завдяки їм розв'язуються питання нагромадження інформації з різних джерел, її зберігання та оперативного використання дослідниками різних країн.

Значний інтерес для медицини мають дослідження, пов'язані з укладанням “генної мережі” – схеми взаємодії генів між собою на рівні білкових продуктів. Ці дослідження сприяли розвитку у рамках геноміки нової науки – **протеоміки**, яка вивчає білковий пейзаж клітини у різних режимах функціонування генів. Сьогодні протеоміка є самостійною наукою, тісно пов'язаною з геномікою.

План заняття

1. Опишіть методи прямого секвенування I покоління ПЛР-ампліфікованої ДНК: метод полімеразного копіювання Сенджера (метод термінуючих аналогів нуклеотидів) та метод Максама-Гілберта (специфічного хімічного розщеплення).

2. Опишіть методи секвенування II покоління: піросеквенування, технологію Illumina/Solexa, технологія SOLiD, технологія іонного потоку.

3. Що таке флуоресцентне секвенування? Бісульфатне секвенування?

4. Дайте характеристику методів секвенування III покоління: секвенування на основі синтезу індивідуальних молекул, секвенування через нанопори.

5. Дайте порівняльну характеристику сучасним методам секвенування РНК: методу часткового розщеплення РНК-азами термінально мічених РНК; методу формамідного гідролізу з ідентифікацією новоутворених 5'-кінцевих ділянок; методу специфічного хімічного розщеплення РНК; методу непрямого секвенування РНК через синтез кДНК.

6. Виберіть правильну відповідь:

6.1. Зазначте, на чому базується метод секвенування ДНК за Сенджером? На:

- а) пірофосфорилуванні нуклеотиду певного типу;
- б) детекції вивільненого пірофосфату після приєднання нуклеотиду;
- в) зупинці синтезу ДНК після приєднання дидезоксинуклеотиду;
- г) специфічному гідролізі ДНК поряд з нуклеотидом певного типу.

Правильна відповідь: _____.

6.2. Основою методу піросеквенування ДНК є:

- а) специфічний гідроліз ДНК поряд із нуклеотидом певного типу;
- б) зупинка синтезу ДНК після приєднання певного дидезоксинуклеотиду;
- в) пірофосфорилування певного нуклеотиду;
- г) детекція вивільненого пірофосфату після приєднання певного нуклеотиду.

Правильна відповідь: _____.

6.3. Під час секвенування за методом Сенджера у реакції з використанням дидезокси-АТФ полімеризація зупиняється навпроти:

- а) залишків аденіну в матричному ланцюзі;
- б) залишків тиміну в матричному ланцюзі;
- в) залишків цитозину в матричному ланцюзі;
- г) будь-якого залишку в матричному ланцюзі, випадково.

Правильна відповідь: _____.

6.4. Під час секвенування ДНК методом Сенджера у реакції з використанням дидезокси-ГТФ полімеризація зупиняється навпроти:

- а) залишків аденіну в матричному ланцюзі;
- б) залишків тиміну в матричному ланцюзі;
- в) залишків цитозину в матричному ланцюзі;
- г) будь якого залишку в матричному ланцюзі, випадково.

6.5. У секвенуванні ДНК методом Максама-Гілберта:

- а) використовують дидезоксинуклеозидтрифосфати;
- б) читання радіоавтографу є прямим;
- в) проводять модифікацію азотистих основ;
- г) розщеплення ланцюгів ДНК відбувається по точках модифікації.

Правильна відповідь: _____.

6.6. Вкажіть метод секвенування, який ґрунтується на принципі “синтез через інкорпорацію”:

- а) методом Максама-Гілберта;
- б) метод Сенджера;
- в) піросеквенування;
- г) геномна дактилоскопія.

Правильна відповідь: _____.

6.7. Вкажіть метод секвенування, який ґрунтується на специфічному хімічному розщепленні аналізованої ДНК:

- а) флуоресцентне секвенування;
- б) метод Сенджера;
- в) піросеквенування;
- г) методом Максама-Гілберта.

Правильна відповідь: _____.

6.8. Вкажіть метод секвенування, у якому використовується ПЛР:

- а) піросеквенування;
- б) метод Сенджера;
- в) методом Максама-Гілберта;

г) нанопорове секвенування.

Правильна відповідь: _____.

6.9. Вкажіть метод секвенування, у якому використовується не використовується клонування ДНК, та гель-електрофорез:

- а) метод Сенджера;
- б) флуоресцентне секвенування;
- в) піросеквенування;
- г) методом Максама-Гілберта.

Правильна відповідь: _____.

6.10. Вкажіть науку, яка оперує геномними базами даних:

- а) біосенсорика;
- б) біоінформатика;
- в) систематика;
- г) метаболіка.

Правильна відповідь: _____.

Питання для самостійного опрацювання

1. Що таке дидезоксинуклеотиди? Як з їхньою допомогою визначити нуклеотидну послідовність ДНК?

2. Опишіть метод хімічної модифікації за використання термінуючих аналогів у секвенуванні ДНК.

3. Дайте характеристику методу секвенування ДНК: принципу “секвенуючого гелю” (“драбинки”).

4. Опишіть принципи методів секвенування ДНК нового покоління: Roche/454 Life Sciences, Illumina/Solexa, Applied Biosystems/SOLiD, одномолекулярне секвенування Helicos Biosciences, одномолекулярне секвенування у реальному часі Pacific Biosciences, Ion Torrent секвенування, нанопорове секвенування.

5. Охарактеризуйте РНКazi, що використовуються у секвенуванні РНК. З якою метою їх застосовують?

6. Дайте порівняльну характеристику методів секвенування РНК.

7. Дайте порівняльну характеристику сучасних методів секвенування ДНК III покоління, зазначаючи стратегію, швидкість секвенування та фінансові витрати.

8. Що таке геномні бази баних?

9. Як укладаються інформаційні бази даних нуклеотидних (ДНК/РНК) та білкових послідовностей, яка пропонується

Національним центром біотехнологічної інформації NCBI (англ. *National Center for Biotechnological Information*).

10. Що вивчає геноміка? протеоміка?

Література

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 88–94.

2. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. С Херрингтона и Дж. Макги : пер. с англ. – М. : Мир, 1999. – С. 428–447.

3. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. С. 268–313.

4. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія : підручник / А.В. Сиволоб. – К. : Видав.-поліграф. центр “Київський університет”, 2008. – С. 341–344. Режим доступу : biology.org.ua/files/lib/MolBiol_sivolob.pdf

5. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004. – С. 36–48.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 7

АНАЛІТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ. БІОСЕНСОРИКА

Мета: ознайомитися з різними напрямками аналітичної біотехнології, з методами конструювання та основними принципами роботи біосенсорів, їхнім застосуванням у молекулярній діагностиці.

Теоретичні відомості

Аналітична біотехнологія (АБТ) – це галузь біотехнології, яка пов'язана з використанням тканин, клітин, органел, біомолекул або принципів їхнього функціонування для аналітичних цілей.

АБТ є різновидністю **інформаційних технологій**, оскільки вона, в результаті, ставить на меті отримання **інформації** про якісний та кількісний склад аналізованих об'єктів.

АБТ включає розробку ензиматичних наборів (кітів), ДНК-аналітичних наборів, біосенсорів.

Біосенсорика – це новітня галузь аналітичної біотехнології, одним з основних напрямів якої є розробка електрохімічних біосенсорів.

Біосенсор – найновіше досягнення біоаналітичної хімії, основною особливістю якого є просторово-функціональне поєднання біоелемента з фізичним або фізико-хімічним перетворювачем первинного сигналу, генерованого при біоселективній взаємодії біоелемента (біоселективна мембрана) з аналітом. Згідно з класифікацією IUPAC, біосенсор – це автономний інтегральний аналітичний прилад, який забезпечує кількісний чи напівкількісний аналіз, за використання біологічного розпізнавального елемента, що перебуває у прямому контакті з фізичним перетворювачем. Біосенсор перетворює зміну фізико-хімічних характеристик біоматриці на електричний чи оптичний сигнал з амплітудою, яка залежить від концентрації певної речовини у розчині. Функціонально біосенсор складається з двох частин: біоматриці – детектувального шару імібілізованого біоматеріалу та перетворювача. Біоелементами можуть слугувати інтактні органи, шматочки тканин, мікроорганізми, органели, природні біомембрани, ферменти, антитіла й антигени, нуклеїнові кислоти та інші біомолекули, а також біоміметики, які імітують структурно-функціональні особливості природного біоелемента (див. додаток М). **Біоелемент** є аналіт-розпізнавальним

елементом, який забезпечує селективне зв'язування або біохімічне / метаболічне перетворення аналіту, що веде до зміни фізичних або фізико-хімічних характеристик контактного трансдуктора (перетворювача). Трансдуктором у біосенсорних системах слугують електрохімічні, оптичні, термоелектричні, акустичні, транзисторні та інші елементи. Біосенсори розглядають як інформаційні перетворювачі, в яких первинна енергія біоспецифічних взаємодій слугує для отримання інформації про природу та концентрацію аналіту у пробі. Сьогодні запропоновано кілька **основних типів біосенсорів**, які відрізняються за характером перетворювача: амперметричні (див. додаток М), кондуктометричні, потенціометричні (зазвичай, на основі рН-залежних польових транзисторів), термісторні та оптичні. Перші три типи мають спільну електрохімічну природу й об'єднуються під спільним терміном “електрохімічні біосенсори” (див. додаток Н). Основна принципова відмінність між ними полягає у природі вимірюваного електрохімічного сигналу: сили струму (амперометричні), різниці потенціалу (потенціометричні), електричної провідності (кондуктометричні). У термісторних перетворювачах вимірюється зміна температури завдяки тепловому ефекту аналітичної реакції, а в оптичних – інтенсивність генерованої світлової енергії. Важливими **перевагами біосенсорів** є висока чутливість та селективність, можливість мініатюризації, сумісність із комп'ютерними процесорами, легкість обробки даних, простота використання, швидкість аналізу, широкий діапазон речовин, які можна детектувати, та низька собівартість аналізу, а недоліками – обмежена стабільність та складність у приготуванні біоселективної мембрани. Завдяки цим перевагам біосенсори стали приладами нового покоління. Сьогодні активно ведуться дослідження стосовно конструювання ефективних біосенсорів для потреб промисловості, біотехнології, медицини. Конструювання біосенсорів спричинило справжній бум у галузі аналітичної біотехнології.

Розвиток біосенсорів нерозривно пов'язаний з **розвитком мікросистемних технологій**. Великий прогрес у розробці мікроелектродів став можливим завдяки сучасним досягненням у галузі мікромеханіки, збільшення чутливості та якості супутного електричного обладнання. Водночас прогрес у математиці і комп'ютерній техніці забезпечив можливість теоретичного моделювання мікросистем, їх роботи за різних умов, оцінки

чутливості і співвідношення “сигнал/шум”, водночас знизивши витрати на проведення додаткових експериментів. До того ж, мініатюризація таких систем дала змогу зменшити витрати на реагенти, що використовуються в аналізі, зробила їх зручнішими в експлуатації та транспортуванні. Усі наведені позитивні чинники обумовили успішну комерціалізацію деяких біосенсорів.

Біонанотехнології – це технології, які здійснюють конструювання нових матеріалів і приладів на основі природних чи синтетичних макромолекул, а також нових біологічних структур на основі синтетичних біополімерів. Біонанотехнології використовують не тільки для створення нових матеріалів. На основі біомолекул можна конструювати “молекулярні машини”, різноманітні прилади й сенсори. При розробці молекулярних машин активно ведуться дослідницькі роботи. Доведено, що можна створити рухливі наноструктури, “крокуючі роботи”, виготовлені із молекул ДНК. Вони здатні рухатися у певному напрямі по молекулі ДНК при підведенні до них енергії. Щодо наносенсорів (ДНК-залежних перемикачів, молекулярних сенсорів, сенсорів на основі гібридних конструкцій, які складаються із нуклеїнової кислоти і білка), то вони уже широко використовуються у молекулярній діагностиці. Розроблено кілька діагностичних систем для медицини, що базуються на олігонуклеотидах, які самозбираються у комплекс на аналізованій ДНК, отримано патенти на такі системи і ДНК-чипи. Винайдено нанорозмірні неорганічні структури – “квантові краплі”, які за рахунок квантових ефектів різноколірно забарвлені. Вони можуть бути використані як спектральні мітки для діагностичних систем. Розроблено оригінальні біосенсори для візуалізації певних вірусних РНК. Перевагами нових нанобіосенсорів є висока чутливість, селективність стосовно кРНК, стабільність біосенсорів *in vitro* та *in vivo*.

Важливим напрямом біонанотехнологій є **конструювання із ДНК нових матеріалів, різних дво- і тримірних структур**. На їхній основі можуть бути отримані принципово нові матеріали для електроніки. Ведуться роботи з отримання хімічно модифікованих нуклеїнових кислот, потрібних для отримання таких матеріалів.

Важливим завданням біонанотехнології є **розробка засобів доставки терапевтичних препаратів** у певні види клітин. Зокрема, апробуються методи скерованого введення патологічним клітинам ДНК й РНК, що є необхідністю для успішного розвитку генотерапії.

Одним з найбільш розвинутих напрямів нанотехнологій є **біочипові технології**, які почали широко використовуватися у сучасній біології та медицині. Біочипова технологія – сучасна нанотехнологія аналізу генетичного матеріалу, що дає змогу проводити скринінг складних сумішей нуклеїнових кислот. Це індустрія високих технологій, які базуються на сучасних досягненнях біології, хімії, фізики, мікроелектроніки, біоінформатики та інших галузей знань. **Біочип** є пластинкою, яка містить на своїй поверхні велику кількість різних зондів – фрагментів нуклеїнових кислот чи олігонуклеотидів, або олігопептидів, розміщених у чіткому порядку. За допомогою такого чипу можна спостерігати за функціонуванням усіх генів в організмі людини, аналізувати білкові пейзажі, утворення і розпад метаболітів у різних типах клітин, що стало реальністю сучасної геноміки, протеоміки та метаболіки. Для медичних потреб розроблено чипи для ідентифікації різних генотипів вірусу гепатиту С, різних варіантів вірусу віспи тощо.

План заняття

1. Охарактеризуйте основні класи електрохімічних біосенсорів, їхні властивості, особливості конструювання.

2. Опишіть будову біосенсорів як нового класу аналітичних приладів.

3. Які біосенсиори називають амперметричними? Охарактеризуйте електрохімічні принципи їхнього функціонування та вкажіть застосування на практиці.

4. Які біосенсиори називають кондуктометричними? Охарактеризуйте електрохімічні принципи їхнього функціонування та вкажіть застосування на практиці.

5. Назвіть принципи функціонування ферментативних електрохімічних біосенсорів на основі глюкозооксидази і алкоголь оксидази.

6. Опишіть роботу ДНК-аналітичних біосенсорів та їхнє використання на практиці.

7. Що таке біочипи? Опишіть особливості їхнього конструювання та функціонування.

8. Виберіть одну або кілька правильних відповіді.

8.1. Каталітичними біоелементами біосенсорів можуть слугувати:

а) рецептори;

- б) антитіла;
- в) біоміметики;
- г) клітини мікроорганізмів;
- д) ферменти.

8.2. Для конструювання ензимних електродів біосенсорів використовують:

- а) клітини або органели;
- б) полікарбонатну мембрану;
- в) імобілізацію фермента на «голу» поверхню електрода;
- г) електроосадження матриці з ферментом на поверхню електрода;
- д) ДНК або РНК;

8.3. До інформаційних технологій, у яких біоелементи слугують як розпізнавальні елементи, належать:

- а) інженерна ензимологія;
- б) ферментативна кінетика;
- г) біосенсорика;
- д) ДНК-чипування.

8.4. ДНК аналітична біотехнологія дає змогу здійснювати:

- а) кількісний та якісний склад біологічних рідин;
- б) аналіз експресії генів у різних тканинах;
- в) спектральний аналіз білків у різних тканинах;
- г) аналіз одонуклеотидного поліморфізму у генах організмів.

Питання для самостійного опрацювання

1. Опишіть основні відкриття, які стали основою розвитку біосенсорики як науки.
2. Які матеріали та способи використовують для імобілізації біологічного матеріалу під час конструювання біосенсорів?
3. Дайте характеристику принципів функціонування амперметричних біосенсорів.
4. Що таке медіаторні та безмедіаторні амперметричні біосенсиори?
5. Дайте фізико-хімічну характеристику (будові, принципам функціонування) кондуктометричних біосенсорів.
6. Що таке ферментні і мультиферментні біосенсиори?
7. Які недоліки та переваги клітинних біосенсорів, порівняно з ферментними?
8. Опишіть способи імобілізації біологічного матеріалу у конструюванні біосенсорів.

9. Які матеріали (носії, матриці) слугують для іммобілізації ферментів у конструюванні біосенсорів.
10. Опишіть функціонування імунобіосенсорів.
11. Опишіть функціонування біосенсорів на основі світлочутливих мембран.
12. Наведіть приклади комерційних варіантів аналітичних систем на основі біосенсорів.
13. Зазначте роль аналізаторів біосенсорного типу для сучасної клінічної діагностики.
14. Які Ви знаєте системи моніторингу (*in vivo*) на основі біодатчиків, що застосовуються у клініці?
15. Що таке портативні аналізатори?

Література

1. Божков А.И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А.И. Божков. – Х : Федорко, 2008. – С. 292–303.
2. Дзядевич С.В. Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів / С.В. Дзядевич, О.П. Солдаткін. – К. : Наук. думка, 2006. – С. 3–177.
3. Федоренко В.О. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів : навч. посіб. [для студентів біологічних факультетів університетів] / В.О. Федоренко, Б.О. Осташ, М.В. Гончар, Ю.В. Ребець. – Львів : Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка. – 2007. – С. 254–257.
4. Корпан Я.І., Гончар М.В., Стародуб М.Ф., Єльська Г.В. Біосенсори на основі клітин мікроорганізмів / Я.І. Корпан, М.В. Гончар, М.Ф. Стародуб, Г.В. Єльська // Біополімери і клітина. – 1995. – Т. 11. – № 2. – С. 15–45.
5. Яворська Г.В. Промислова мікробіологія : навч. посіб. / Г.В. Яворська, С.П., Гудзь, С.О. Гнатуш. – Львів : Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка. – 2008. – С. 169–180.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 8

МОЛЕКУЛЯРНА ДІАГНОСТИКА СПАДКОВИХ, НАБУТИХ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Мета: ознайомитися з видами й особливостями застосування молекулярно-генетичних методів с методів цито- та імунодіагностики для виявлення спадкових, набутих та інфекційних захворювань.

Теоретичні відомості

Діагностика спадкових, набутих та інфекційних захворювань людини є важливим етапом встановлення їхньої етіології та, у майбутньому, вибору правильної схеми лікування. Серед традиційних методів діагностики, останніми роками головне місце займають молекулярно-генетичні, цито- та імунодіагностичні методи.

На сьогодні розроблені різноманітні методи імунодіагностики інфекційних та неінфекційних захворювань, більшість яких базуються на використанні антитіл та антигенів збудника хвороби. Серед важливих і високочутливих методів імунодіагностики, які застосовують у клінічній діагностиці, – радіоімунний аналіз (РІА) та імуноферментний аналіз (ІФА).

Радіоімунний аналіз є видом імунохімічного аналізу, який має велику кількість модифікацій та широко використовується у лабораторній діагностиці. Одне із призначень методу – діагностика мікробіологічного агента – збудника захворювання. Специфічність і чутливість РІА складає 99 – 100 %. Основою РІА є реакція конкуренції – зв'язування антитіл з антигеном, міченим радіоактивним ізотопом, що пригнічується за присутності неміченого антигену. Однак цей метод має екологічну небезпечність.

Розробка РІА була поворотним моментом у розвитку імунохімічних методів аналізу, що започаткувало цілу серію методів з використанням різноманітних мічених речовин. За допомогою РІА ними вперше було визначено вміст інсуліну у сироватці крові. Згодом, було розроблено модифікації РІА у біологічних рідинах для визначення вмісту ферментів, гормонів, аутоантитіл, факторів росту, маркерів злоякісних новоутворень, наркотиків, ліків та інших речовин.

Імуноферментний аналіз (ІФА), або, точніше, ферментний імуносорбентний аналіз (англ. *enzyme-linked immuno sorbent assay*,

ELISA) – імунологічний метод визначення певних антигенів шляхом реакції антиген-антитіло (див. додаток І). ІФА широко використовується в науково-дослідній роботі та клінічній лабораторній діагностиці для визначення збудників різних інфекційних хвороб, ракових процесів, концентрації різних низькомолекулярних сполук, зокрема лікарських засобів, токсинів тощо. Значно поліпшити специфічність ІФА вдалося із застосуванням моноклональних антитіл.

Спадкові хвороби людей – це захворювання, обумовлені геномними, хромосомними або генними мутаціями. Розрізняють ядерні та мітохондріальні спадкові хвороби залежно від локалізації генів, які спричиняють їх розвиток. Більшість спадкових хвороб людини є ядерними.

На сьогодні описано приблизно 6000 спадкових захворювань. Спадкові захворювання складають приблизно 3/4 уроджених (з'являються *de novo* у процесі ембріогенезу). Серед загальної захворюваності населення спадкові захворювання складають 15–25%.

Спадкові захворювання і спадково обумовлені захворювання є основною причиною передчасної смертності, особливо в економічно розвинутих країнах. Завдяки вивченню молекулярних причин розвитку спадкових захворювань, розроблено методи їх діагностики та, у низці випадків, попередження прогресуючого їх розвитку.

Діагностику спадкових захворювань здійснюють за допомогою традиційних і новітніх біохімічних, молекулярно-генетичних та імуногенетичних методів.

Значної популярності у молекулярній діагностиці для ідентифікації генних мутацій, які ведуть до розвитку спадкових захворювань, набули методи генних зондів, ПЛР та геномна дактилоскопія.

Точність **методу генних зондів** залежить від якості зонду (його чистоти). Найкращими ДНК- і РНК-зондами слугують олігонуклеотидні послідовності, отримані шляхом хімічного синтезу, у яких розміщення нуклеотидів повністю відповідає ділянці цільового гена (чи усього гена). ДНК-зонди мітять різними способами: ізотопами, спеціальним білком біотином, флуорохромами і ін.

Завдяки успіхам молекулярної генетики розроблений принципово новий метод вивчення молекулярної організації хромосом – **метод флюоресцентної гібридизації *in situ*** (FISH). Останній дає змогу

ідентифікувати мікроцитогенетичні перебудови хромосом людини, які ведуть до розвитку спадкових захворювань.

Деякі спадкові хвороби людей є наслідком однієї мутації у відповідному гені – це група т.зв. моногенних захворювань, обумовлені явищем однонуклеотидного поліморфізму. Однонуклеотидні поліморфізми або SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) – це однонуклеотидні позиції у геномній ДНК, для яких наявні різні варіанти послідовностей (алелі) у популяціях, причому ці послідовності зустрічаються з частотою не більше 1 %. Розрізняють двоалельні, триалельні ($\leq 0,1\%$ всіх SNP людини) і чотириалельні типи SNP. Їх використовують для аналітичній практиці як маркери для геномного скринінгу (середня відстань між маркерами ~1000 н.п. – 5000 н.п. та пошуку кандидатних генів мультифакторіальних захворювань; є зручними маркери молекулярної еволюції).

У прикладному аспекті SNP використовують у генетичній паспортизації особи з метою індивідуалізованого визначення уже відомих SNP-профілів, асоційованих зі схильністю до розвитку мультифакторіальних захворювань (кардіоваскулярні патології, нейродегенеративні захворювання, злоякісні новоутворення) та індивідуальною чутливістю до лікарської терапії. Зокрема, описано чимало значимих SNP для оцінки ризику серцево-судинних захворювань (див. додаток О), також для ризику розвитку раку молочної залози, інсулін-незалежного діабету і інш.

Для ідентифікації змін у первинній структурі ДНК використовують різноманітні підходи і методи: ферментативні (поліморфізм довжин рестриктних фрагментів RFLP, поліморфізм довжин ампліфікованих фрагментів AFLP, аналізи, які базуються на лігазній реакції (LDR, LCR), алель-специфічна ПЛР (AS-PCR), ПЛР з прямою термінацією синтезу (DT-PCR), випадкова ампліфікація поліморфної ДНК (RAPD, AP-PCR), хімічні (хімічне розщеплення гетеродуплексів, хімічне лігування), методи, що базуються на різній електрофоретичній рухливості поліморфних ділянок ДНК (аналіз конформації одноланцюгових фрагментів (SSCP), гетеродуплексний аналіз, секвенування ДНК), детекція на твердій фазі (гібридизація на однонуклеотидних матрицях), оптиковолоконний ДНК гібридизаційний аналіз, елонгація імобілізованих праймерів (мінісеквенс), піросеквенс), хроматографічні методи (денатуруюча HPLC), фізичні методи (мас-спектроскопія, резонансне гасіння

флуоресценції і ін.), аналіз *in silico* (порівняння наявних в базі даних геномних і EST послідовностей).

Поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів або ПДРФ (англ. restriction fragment length polymorphism, RFLP) передбачає ампліфікацію досліджуваного фрагменту ДНК методом ПЛР, його розщеплення відповідними рестриктазами, та ідентифікацію на електрофореграмі. ПДРФ-метод має деякі обмеження: визначає тільки ті SNPs, що знаходяться у сайтах рестрикції та визначає вже відомі мутації.

Поліморфізм довжин ампліфікованих фрагментів або ПДАФ (англ. amplification fragment length polymorphism, AFLP) – молекулярно-генетичний метод, головним призначенням якого є ідентифікація організмів. Містить такі етапи: 1) обробка геномної ДНК набором двох рестриктаз; 2) приєднання ДНК-адапторів (≈ 20 н.) з обох кінців до відповідних рестрикційних фрагментів (містять “липкі” кінці для даних рестрикційних сайтів; 3) здійснюють дві послідовні ПЛР: у I реакції використовують праймери, повністю комплементарні адаптерам, результатом чого є значна кількість продуктів ампліфікації, які неможливо диференціювати за допомогою електрофорезу; у другій реакції праймери містять на 3'-кінці додаткові некомплементарні адаптерам основи (від 1 до 3) для селективної ампліфікації; 3) здійснюють електрофоретичну детекцію. Перевагою ПДАФ-методу є аналіз більшої кількості SNPs без знання їх нуклеотидної послідовності.

Метод денатуруючого градієнтного гел-електрофорезу (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) – молекулярно-генетичний метод аналізу одонуклеотидного поліморфізму, який полягає у детекції здатності ДНК-дуплексів мігрувати у гелі за денатуруючих умов. Міграція дуплексів у гелі триває до моменту точки плавлення у гелі, коли ланцюги розходяться, міграція припиняється. Відмінності нормального та зміненого зразків ДНК проявляються різною електрофоретичною рухливістю в гелі.

Полімеразна ланцюгова реакція – лігування олігонуклеотидних зондів (ПЛР/ЛОЗ). Етапи проведення ПЛР/ЛОЗ такі: 1) синтез олігонуклеотидних зондів: Х-зонд – 3'-кінцевий нуклеотид комплементарний основі досліджуваного сайту (Н: у положенні 106) та мічений біотином; У-зонд – 5'-кінцевий нуклеотид комплементарний сусідньому нуклеотиду (107) та мічений дигоксигеніном; 2) гібридизація зондів з ДНК-ланцюгом

(ампліфікований методом ПЛР); 3) зшивка ДНК-лігазою X та У зондів; 4) зв'язування біотинових зондів з стрептовідином; відмивання; 5) додавання кон'югатів “антитіло до дигоксигену – лужна фосфатаза”; 6) додавання безколірного хромогенного субстрату.

Важливою складовою геному людини є мітохондріальна ДНК (МтДНК). МтДНК людини є кільцевою молекулою розміром 16569 п.н. і складається з важкого (H) та легкого (L) ланцюгів. Кожен ланцюг транскрибується з контрольного району, починаючи з відповідного промотору (РН чи РL), які є у т.зв. D-петлі. МтДНК містить 37 генів: 22 гени тРНК, 2 гени рРНК та 13 генів, які кодують компоненти системи окисного фосфорилування. Мутації цих генів зумовлюють розвиток нейро- та міопатій.

У мтДНК є консервативні ділянки, однакові у всіх людей, які чергуються з варіабельними ділянками, нуклеотидна послідовність яких часто мутує. Такою варіабельною ділянкою є D-петля. Для генотипування мтДНК використовують два гіперваріабельні райони D-петлі - HVR1 та HVR2. Частота мутацій мтДНК є вищою (від $0,075 \times 10^{-6}$ до $0,47 \times 10^{-6}$ заміни у сайті за рік) порівняно з ядерними ($0,017 \times 10^{-6}$).

Генетична діагностика мтДНК полягає у детекції точкових нуклеотидних заміни. МтДНК містить багато точкових мутацій, що зумовлює її варіабельність.

У генотипуванні мтДНК отримані результати тестування порівнюють зі “стандартною кембріджською послідовністю” – першою секвенованою нуклеотидною послідовністю мтДНК, яка була взята за міжнародний стандарт. Ця робота була виконана у 1981 р. в Кембріджі Стеном Андерсеном (тому інша назва послідовності мтДНК – “послідовність Андерсена”). Порівнюючи нуклеотидну послідовність досліджуваної мтДНК зі стандартною кембріджською, встановлюють генетичний профіль досліджуваної мтДНК. На основі цього порівняння встановлюється достовірний висновок про близькостпорідненість осіб, належність до етнічної популяції, національності, а також чи є вони членами однієї материнської генеалогічної групи.

мтДНК використовують як генетичний маркер материнської лінії успадкування, при встановленні спорідненості, коли часова дистанція між родичами є більшим як одне покоління, міграції населення, еволюції людини, а також для ідентифікації людей. Нуклеотидна

послідовність мтДНК, зазвичай, ідентична у всіх родичів по материнській лінії. Для встановлення приналежності особи до конкретного роду (непряма ідентифікація), використовують порівняльний аналіз мтДНК будь-яких родичів індивіда по материнській лінії. Типування мтДНК використовують для аналізу кістяків, які мають десятки, сотні і тисяча років, для ідентифікації осіб при масових катастрофах, детекції нуклеотидних замін методом прямого флюоресцентного секвенування.

План заняття

1. Дайте характеристику явища генетичному поліморфізму (однонуклеотидний поліморфізм, мінісателітні й мікросателітні повтори), притаманному для геному людини.

2. Опишіть використання явища однонуклеотидних поліморфізмів у генетичному картуванні, діагностиці захворювань, ідентифікації особи.

3. Зазначте як використовується поліморфізм мтДНК для встановлення спорідненості, шляхів міграцій популяцій, ідентифікації особи при масових катастрофах.

4. Ознайомтеся з методами імунодіагностики інфекційних та неінфекційних захворювань та дайте відповіді на запитання:

4.1. Які реакції із застосуванням мічених антитіл і антигенів використовуються у методах молекулярної діагностики з використанням реакції взаємодії антигену з антитілом?

4.2. Як здійснюється радіоімуний аналіз (RIA)?

4.3. Як поетапно здійснюється імуноферментний аналіз (ІФА).

4.4. Опишіть імунологічні системи тестування лікарських препаратів, специфічних метаболітів, ідентифікації та контролю патогенних мікроорганізмів.

4.5. Які ДНК-зонди застосовуються для виявлення хромосомних аберацій у пухлинах, способи їх мічення і детекції?

5. Ознайомтеся з методами імуноцитохімії (світловою і електронною мікроскопією) та дайте відповіді на питання:

5.1. Як здійснюють підготовку зразків для досліджень: фіксацію, виготовлення блоків, приготування зрізів, імуномічення?

5.2. Зазначте, які мітки застосовуються в імуноцитохімічній діагностиці?

5.3. Опишіть принцип, зонди і системи детекції ГІС-методу, який використовується для виявлення вірусних генів.

6. Виберіть правильну відповідь:

6.1. Геномну дактилоскопію (ДНК-типування) використовують:

- а) у полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР);
- б) у судовій медицині для ідентифікації біологічних зразків;
- в) у побудові рестрикційних (фізичних) карт молекул ДНК;
- г) для встановлення батьківства.

Питання для самостійного опрацювання

1. Зазначте номенклатуру мікросателітних повторів.
2. Чому поліморфізми використовуються як геномні маркери?
3. Чому поліморфні локуси важливі для картування генів захворювань людини?
4. Що таке генотипування? ПДАФ-типування?
5. Як використовують мікро- та мінісателітні повтори для встановлення батьківства, ідентифікації особи, визначення статі, підбору донора?
6. Що таке Y-мікросателітні повтори та як їх використовують для встановлення спорідненості у судових справах і популяційних дослідженнях?
7. Охарактеризуйте поліморфізми мітохондрійної ДНК, гіперваріабельні райони мтДНК та явище гетероплазмії, пов'язане з ними.
8. Як здійснюється ДНК-типування тканин?
9. Дайте характеристику основних напрямів досліджень у імунодіагностиці.
10. Зазначте структурну організацію антитіл, їхні біологічні характеристики і використання в молекулярній діагностиці.
11. Вкажіть генетичні порушення, які зумовлюють канцерогенез: мутації в онкогенах та генах-супресорах, генах, задіяних у розвитку апоптозу, генах рецепторів епідермальних факторів росту, генах, задіяних у репарації, нестабільність мікросателітів;
12. Перелічіть маркери онкологічних захворювань, які використовуються у діагностиці пухлин.
13. Опишіть застосування ГІС-методу для клітинної діагностики вірусів: папіломи людини, цитомегаловірусу, вірусу простого герпесу, вірусу гепатиту В, ВІЛ.
14. Як здійснюється діагностика цитопатологій із застосуванням ГІС?
15. Як детектуються патогенні пріони ГІС-методом?

Література

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 181–202.
2. Божков А.И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А.И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – С. 188–192.
3. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. С Херрингтона и Дж. Макги : пер. с англ. – М. : Мир, 1999. – С. 173–199; 244–279; 448–531.
4. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. – С. 389–417.
5. Медична генетика : підручник для вузів / В.М. Запорожан, Ю.І. Бажора, А.В. Шевеленкова, М.М. Чеснокова. Одеса : Одес. держ. мед. ун-т, 2005. – С. 194–216.
6. Медична генетика : підручник для вузів / за ред. О.Я. Гречаніної, Р.В. Богатирьової, О.П. Волосовця. – К. : Медицина, 2007. – С. 199, 277, 425.

Додатки

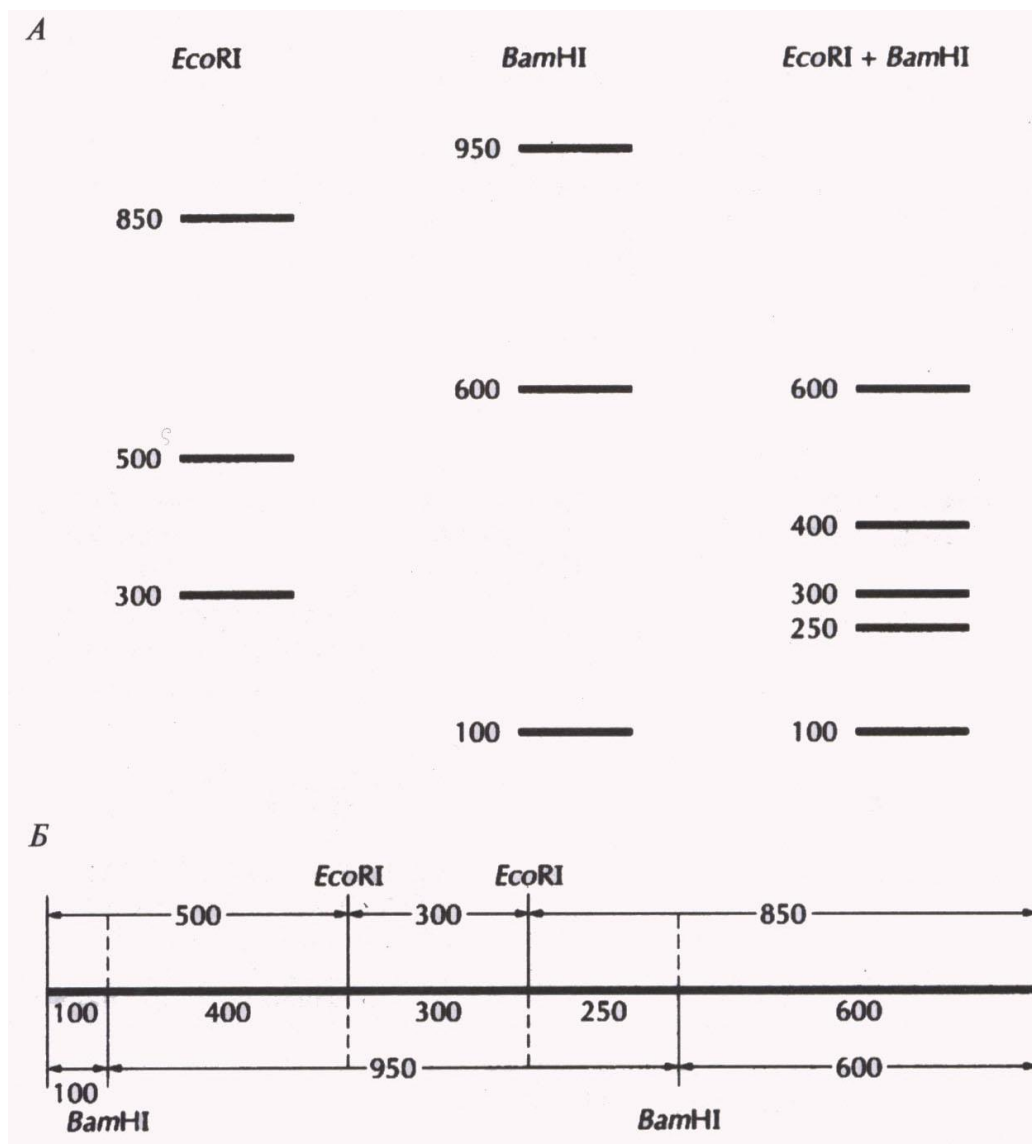
Додаток А

Нуклеотидні послідовності, які розпізнаються деякими рестриктазами*

Рестриктаза	Сайт розпізнавання	Характер утворюваних кінців
<i>AluI</i>	5'-AG↓CT-3' 3'-TC↑GA-5'	Тупі кінці
<i>BamHI</i>	5'-G↓GATCC-3' 3'-C C-TAG↑G-5'	Виступаючі кінці з 5'-фосфатною групою
<i>EcoRI</i>	5'-G↓AATT C-3' 3'-CTTAA↑G-5'	Виступаючі кінці з 5'-фосфатною групою
<i>HaeIII</i>	5'-GG↓CC-3' 3'-CC↑GG-5'	Тупі кінці
<i>HpaI</i>	5'-GTT↓AAC-3' 3'-CAA↑TTC-5'	Тупі кінці
<i>MstII</i>	5'-C↓CTNAGG-3' 3'-GGANTC↑C-5'	Виступаючі кінці з 5'-фосфатною групою
<i>NotI</i>	5'-G↓CGGCCGC-3' 3'-C GCCGGC↑G-	Виступаючі кінці з 5'-фосфатною групою
<i>PacI</i>	5'-T↓TAATTA-3' 3'-AATTAAT↑T-5'	Виступаючі кінці з 3'-фосфатною групою
<i>PstI</i>	5'-C- TGCA↓G-3' 3'-G↑ACGT- C-5'	Виступаючі кінці з 3'-гидроксильною групою
<i>PvuII</i>	5'-CAG↓CTG-3' 3'-GTC↑GAG-5'	Тупі кінці
<i>Sau3AI</i>	5'↓GATC-3' 3' -CTAG↑-5'	Виступаючі кінці з 5'-фосфатною групою

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

Картування сайтів рестрикції

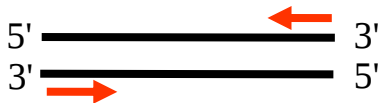
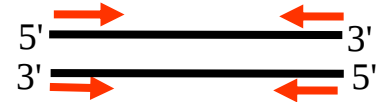
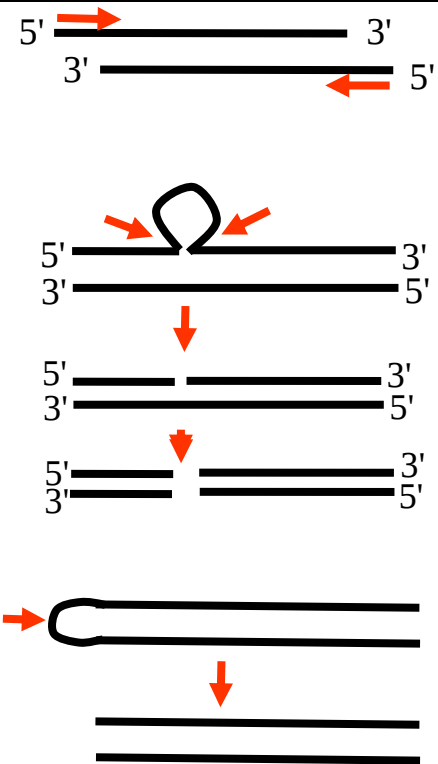


А. Результати гелі-електрофорезу фрагментів ДНК*, отриманих розщепленням відповідними ферментами. Очищену ДНК 1) гідролізували рестриктазами *Eco*RI і *Bam*HI окремо, а потім їх сумішню, 2) здійснювали гелі-електрофореуз і 3) візуалізували рестрикти фарбуванням етидій бромистим. Числа зліва від горизонтальних смужок на електрофореграмі – довжина фрагментів у парах основ (п.о.).

Б. Рестрикційна карта*, укладена за електрофоретичними даними. Числа – відстань між сайтами розщеплення відповідних рестриктаз.

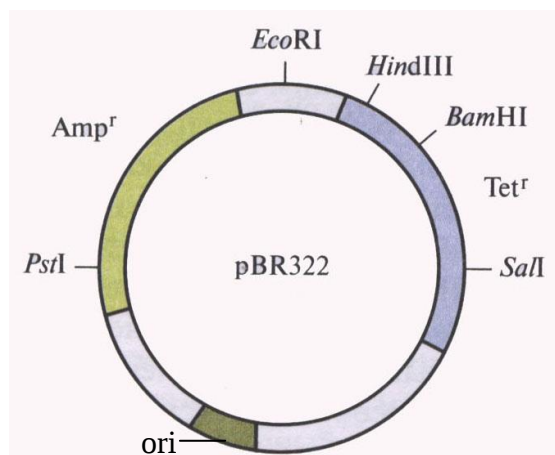
*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

Нуклеази, які використовуються у генній інженерії*

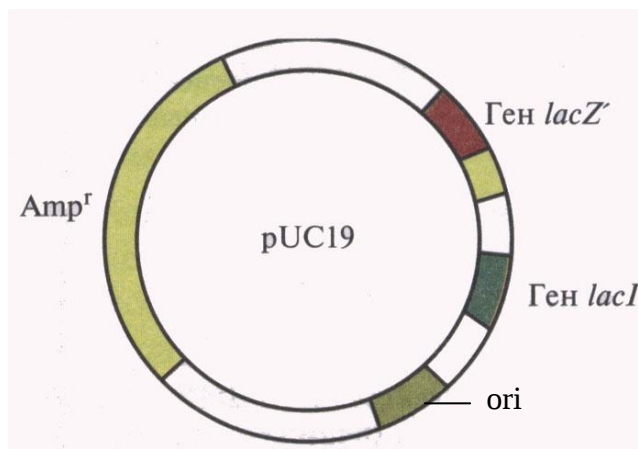
Нуклеаза	Принцип дії нуклеази	Дія нуклеази
Екзонуклеаза III <i>E. coli</i>		Розщеплює дволанцюгову ДНК з 3'-кінців
Екзонуклеаза VII <i>E. coli</i>		Розщеплює одноланцюгову ДНК із 5'-та 3'-кінців
λ-екзонуклеаза <i>E. coli</i>		Розщеплює дволанцюгову ДНК із 5'-кінців
Нуклеаза Bal <i>Alteromonas espejana</i>		Розщеплює дволанцюгову ДНК 5'- та 3'-кінців
Нуклеаза S1 з <i>Aspergillus oryzae</i>		Гідролізує одноланцюгову ДНК та РНК Гідролізує одноланцюгові петлі у складі ДНК та РНК Руйнує ділянки навпроти прогалин Гідролізує “шпилькові” структури у складі ДНК та РНК

* [Федоренко В.О. Курс лекцій (електронний) з біотехнології, 2010].

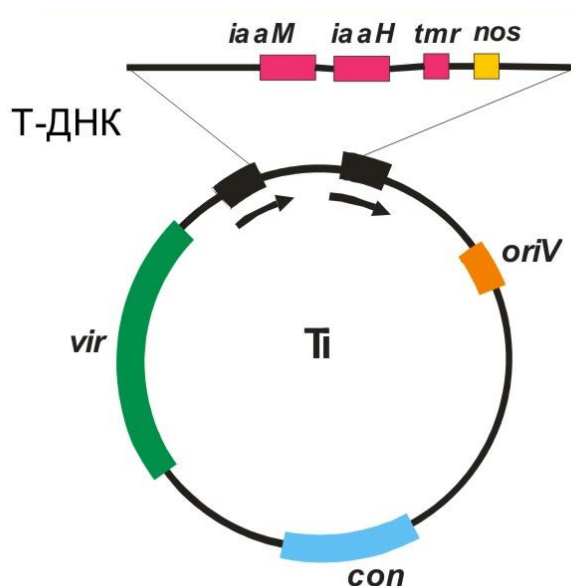
Генетичні карти плазмідних векторів



Генетична карта плазмідного вектора pBR322*: Amp^r і Tet^r – гени ампіцилін і тетрациклін-резистентності, відповідно; $PstI$, $EcoRI$, $HindIII$, $BamHI$, $SalI$ – сайти рестрикції відповідних рестриктаз; ori – точка початку реплікації.



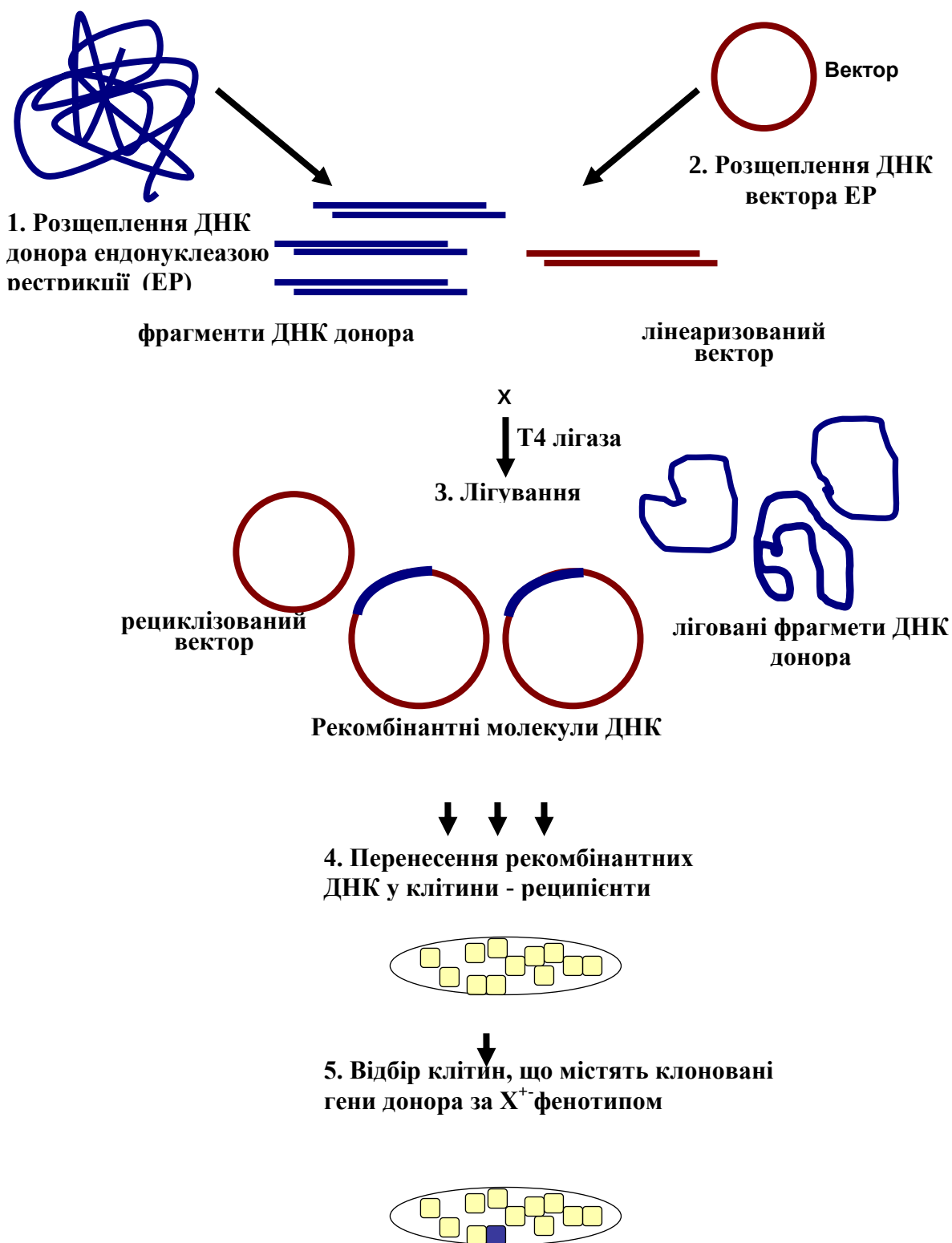
Генетична карта плазмідного вектора pUC19*: Amp^r – ген ампіцилін-резистентності; ген $lacZ'$ – регульований сегмент гена β -галактозидази ($lacZ'$) лактозного оперону *E.coli*; ген $lacI$ – ген, який кодує репресор, що контролює експресію $lacZ'$.



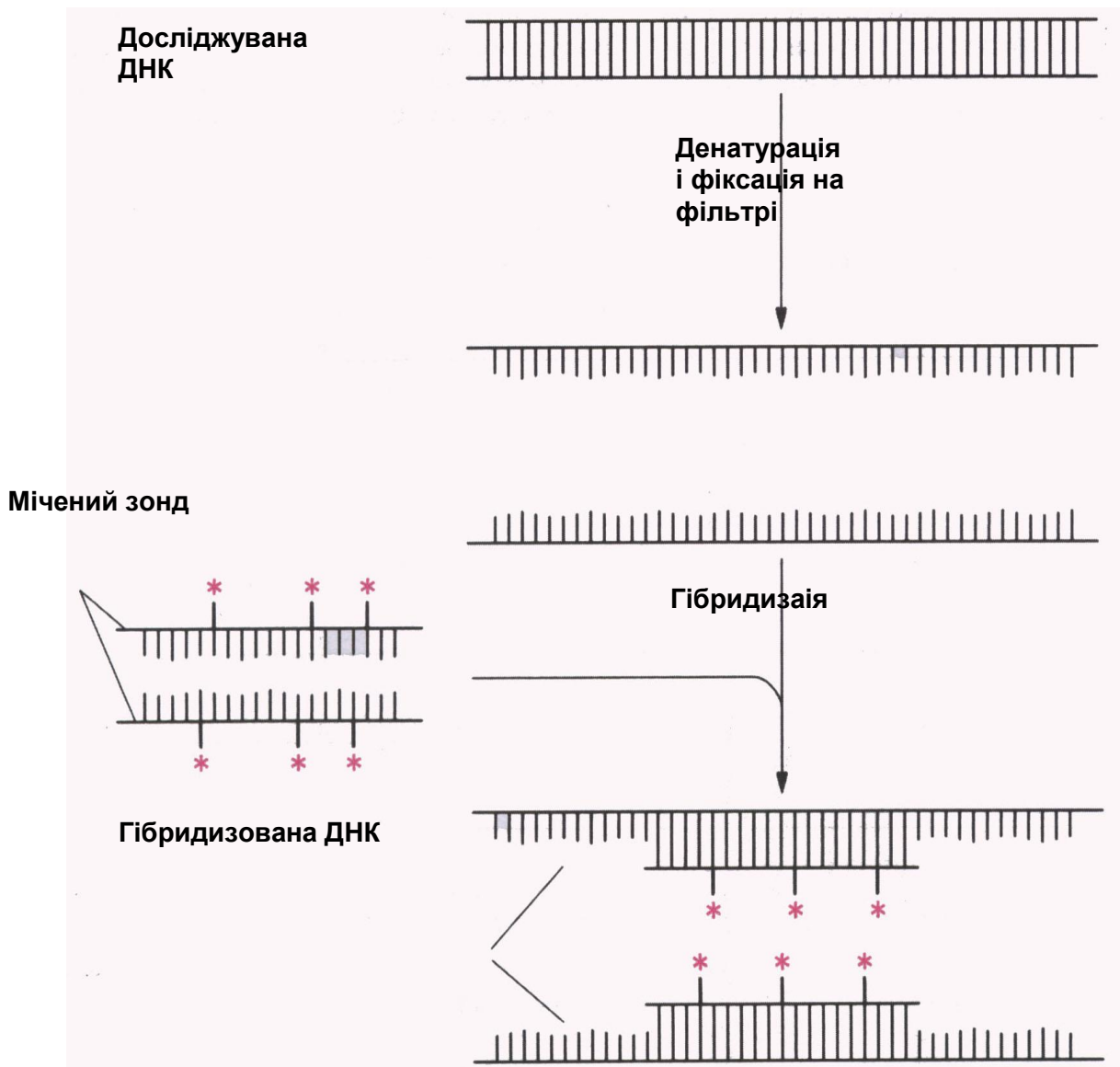
Генетична карта Ti-плазмиди *Agrobacterium tumefaciens**: $iaaM$ – ген триптофан-монооксигенази; $iaaH$ – ген індол-3-ацетамідгідролази; tmr – ген ізопентеніл-трансферази; nos – ген нопалінсинтази; $oriV$ – оріджин реплікації плазмиди

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

Основні етапи генно-інженерного експерименту



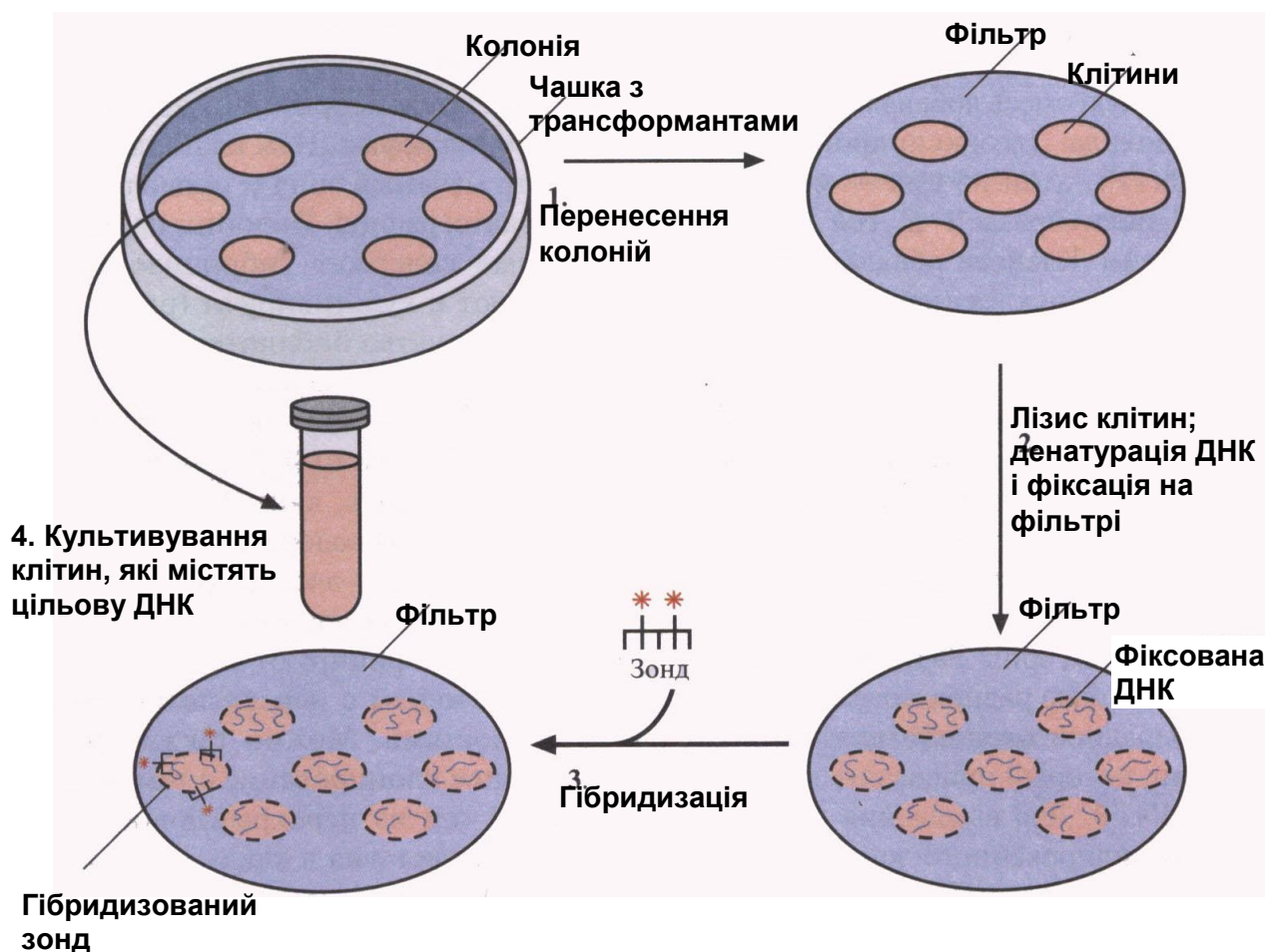
Схематичне зображення ДНК-гібридизації



Перебіг стадій ДНК-гібридизації*. Досліджувану ДНК піддають денатурації і фіксують на твердій основі (нітроцелюлозному чи нейлоновому фільтрі). Мічений ДНК-зонд (завдовжки від 100 до 1000 п.н.) денатурують, наносять на фільтр із фіксованою ДНК і проводять відбиток. Усунення негібридизованого ДНК-зонда здійснюють ретельною промивкою фільтра. Проводять візуалізацію мітки методом радіоавто-графії (мітка на рисунку позначена у вигляді зірочки).

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

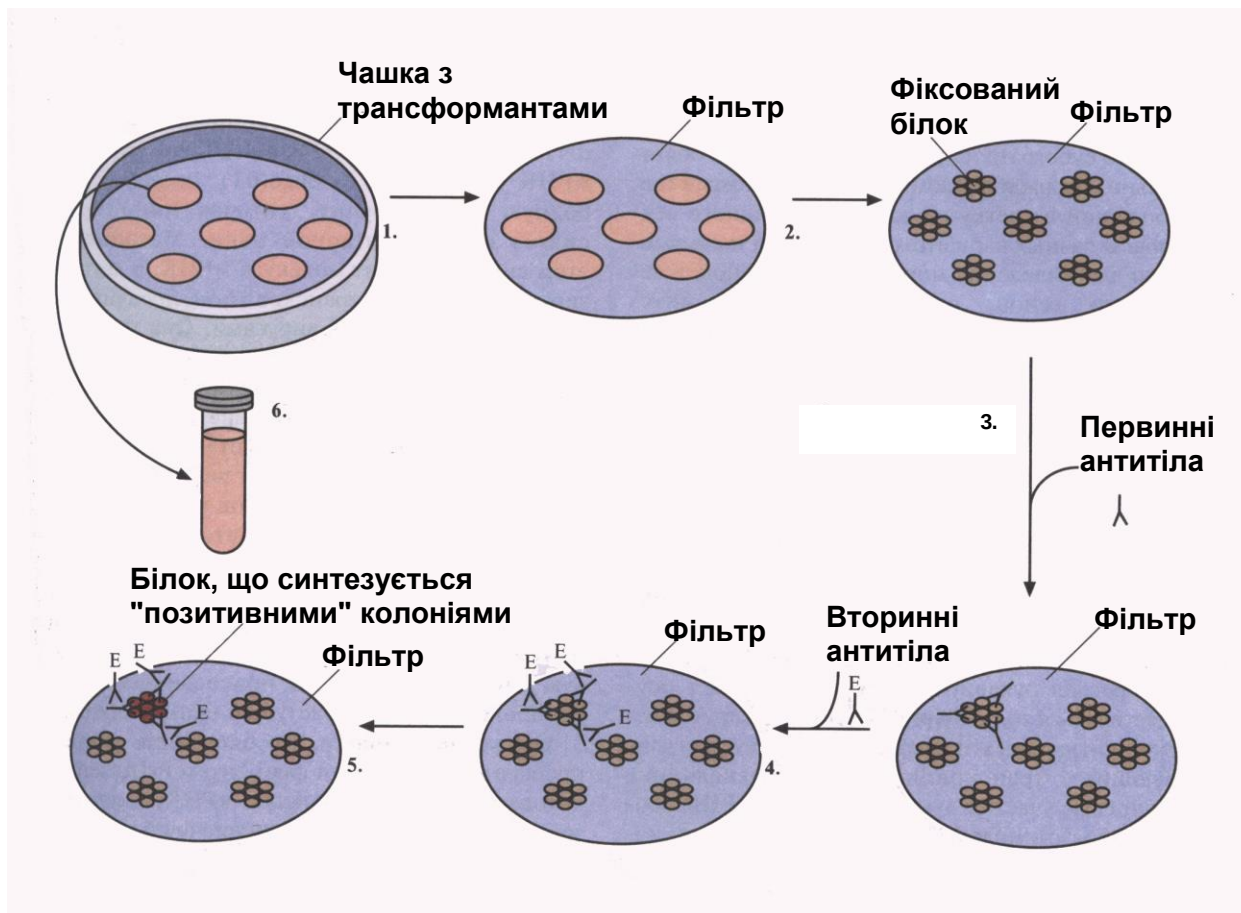
Ідентифікація клонів клітин методом ДНК-ДНК гібридизації

**Скринінг бібліотеки геномної ДНК за використання міченого зонда*.**

Клітини трансформують та висівають на селективне середовище, яке забезпечує ріст трансформантів. 1. Переносять клітини методом реплік на тверду підкладку (нітроцелюлозний чи нейлоновий фільтр). 2. Клітини лізують, вивільнену ДНК піддають денатурації, депротейнізації та фіксують на фільтрі. 3. На фільтр наносять мічений ДНК-зонд і проводять гібридизацію. Проводять ретельну промивку фільтра та радіоавтографію, для ідентифікації клітин, що містять мічений ДНК-зонд. 4. Визначають на чашці колонії, що містять досліджувану ДНК (позитивний гібридизаційний сигнал), відбирають з них клітини та культивують.

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

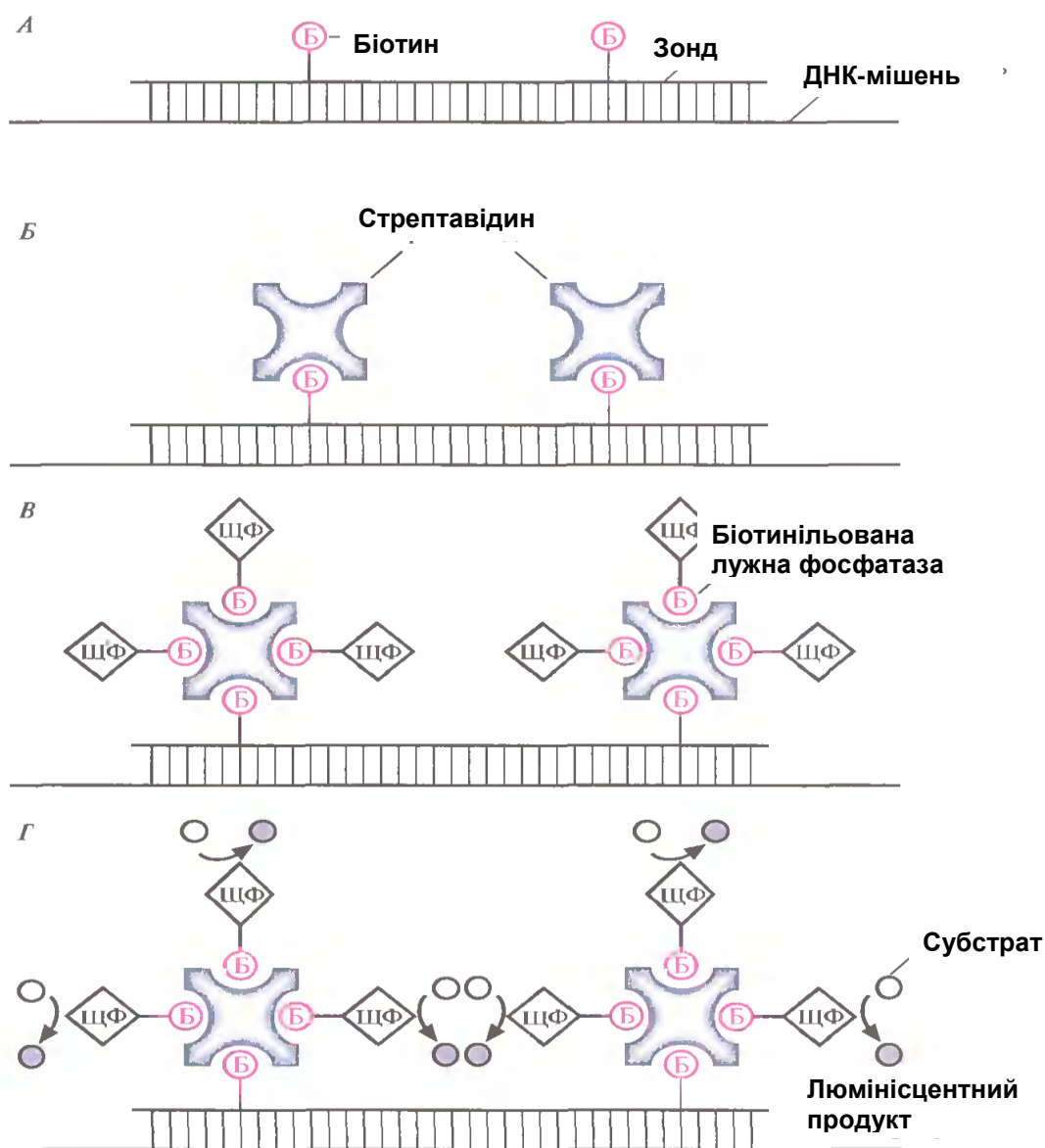
Ідентифікація клонів клітин імунологічним методом



Імунологічний скринінг геномної бібліотеки (імунологічне тестування колоній)*. Клітини трансформують та висівають на селективне середовище, яке забезпечує ріст трансформантів. 1. Переносять клітини методом реплік на тверду підкладку (нітроцелюлозний чи нейлоновий фільтр) так, щоб їхнє розміщення відповідало на вихідній чашці. 2. Клітини лізують, білки фіксують на фільтрі. 3. На фільтр наносять первинні антитіла, які зв'язуються тільки з цільовим білком. 4. Ретельно промивають фільтр, наносять на нього кон'югат вторинних антитіл, специфічних стосовно первинних антитіл, з ферментом (часто, лужною фосфатазою). 5. Ретельно промивають фільтр та наносять на нього безбарвний субстрат, за гідролізу якого ферментом генерується забарвлений продукт. Гідроліз субстрату може відбутися тільки за наявності вторинних антитіл. 6. Відбирають колонії на вихідній чашці, які відповідають забарвленим плямам на фільтрі, та їх культивують. Ці колонії можуть міститися рекДНК, що кодує цільовий білок.

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

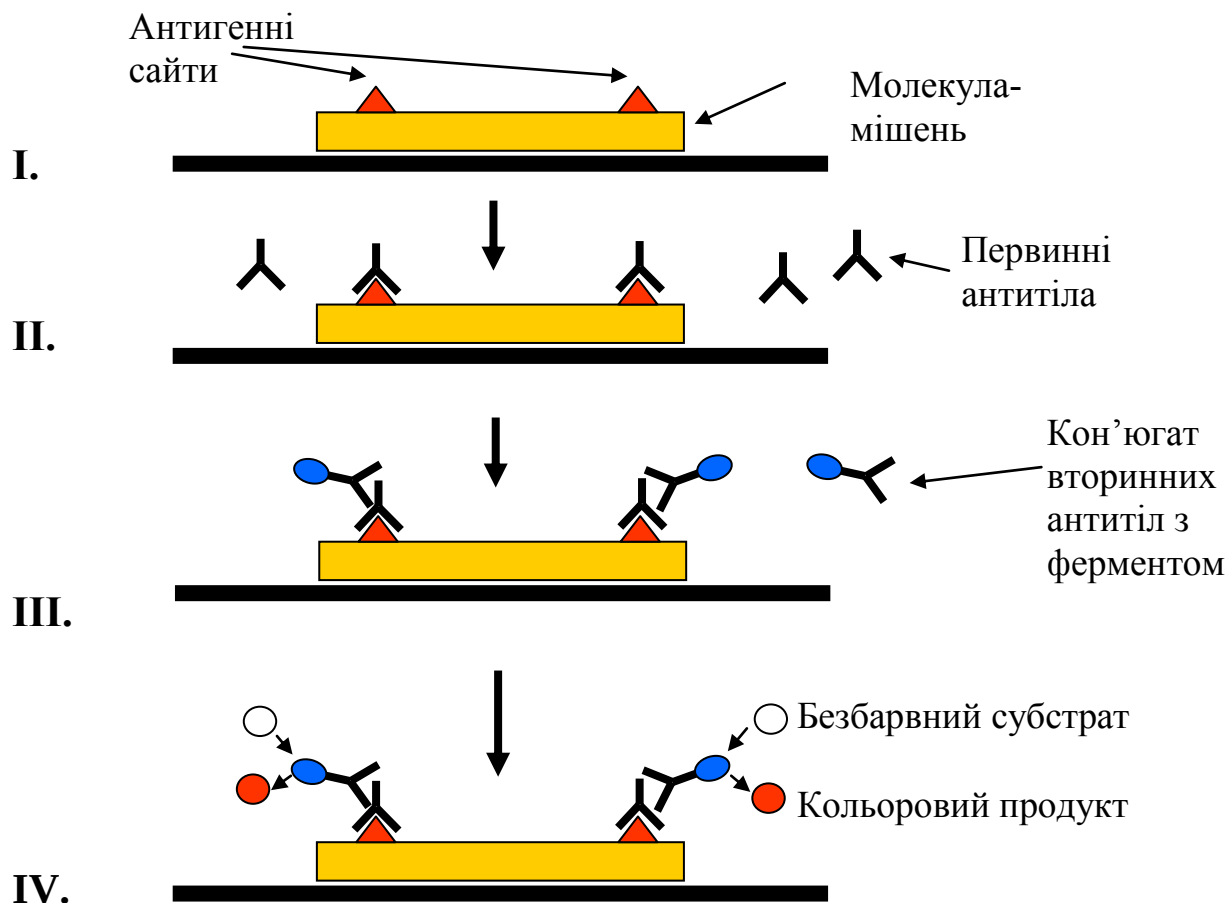
Хемілюмінісцентний метод ідентифікації ДНК-мішені



Хемілюмінісцентний метод детекції ДНК-мішені*: Б – біотин, ЩФ – лужна фосфатаза; А – зв'язування біотинільованого зонда із ДНК-мішенню; Б – зв'язування стрептавідину з біотином; В – зв'язування біотинільованої лужної фосфатази зі стрептавідином; Г – утворення люмінісцентного продукту під впливом лужної фосфатази.

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

Схема імуноферментного аналізу ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)



Схематичне зображення етапів проведення ELISA*:

I. Зв'язування зразка, який тестується на наявність специфічної молекули (молекули-мішені), на твердій поверхні (пластмасовій основі).

II. Додавання антитіл, специфічних до антигенів молекули-мішені (первинних антитіл). Промивання зразка для усунення антитіл, які з ним не зв'язалися.

III. Додавання вторинних антитіл, які специфічно зв'язуються з первинними антитілами, але не з антигенами молекули-мішені. Вторинні антитіла зв'язані з ферментами, що перетворюють безбарвний субстрат у кольоровий продукт. Промивання зразка для усунення вторинних антитіл, які з ним не зв'язалися.

IV. Додавання субстрату. Поява кольорового продукту свідчить на наявність молекули-мішені.

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

Хроніка геномних досліджень і секвенування нуклеїнових кислот

Рік відкриття	Назва відкриття
1953	Френсіс Крік і Джеймс Уотсон запропонували модель подвійної спіралі ДНК. Френсіс Крік сформулював центральну догму молекулярної біології про потік генетичної інформації у клітині
1958	Фредерік Сенджер з співробітниками розробили “плюс-мінус” метод секвенування ДНК
1975	Фредерік Сенджер з співробітниками розробили метод “термінаторів” для секвенування ДНК
1977	Максам і Гілберт розробили метод секвенування ДНК шляхом хімічної деградації
1993	Секвеновано ДНК вірусу натуральної віспи
1995	Секвеновано геном бактерії <i>Haemophilus influenzae</i>
1995	Секвеновано геном бактерії <i>Mycoplasma genitalum</i>
1996	Секвеновано геном архебактерії <i>Methanococcus jannaschii</i>
1996	Секвеновано геном дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1997	Секвеновано геном кишкової палички <i>Escherichia coli</i>
2001	Опубліковано результати секвенування першого геному людини
2005	Комерціалізація технології піросеквнування
2006	Комерціалізація технології Sollexa (Illumina)
2006	Комерціалізація технології лігазного секвенування
2010	Комерціалізація технології іонного напівпровідникового секвенування (технологія Post-Ligth™)
2011	Перший комерційний реліз секвенаторів PacBio, що базуються на технології одномолекулярного SMRT секвенуванні
2015	Початок продажу перших приладів, які базуються на поровому секвенуванні

Секвенування ДНК за Седгером

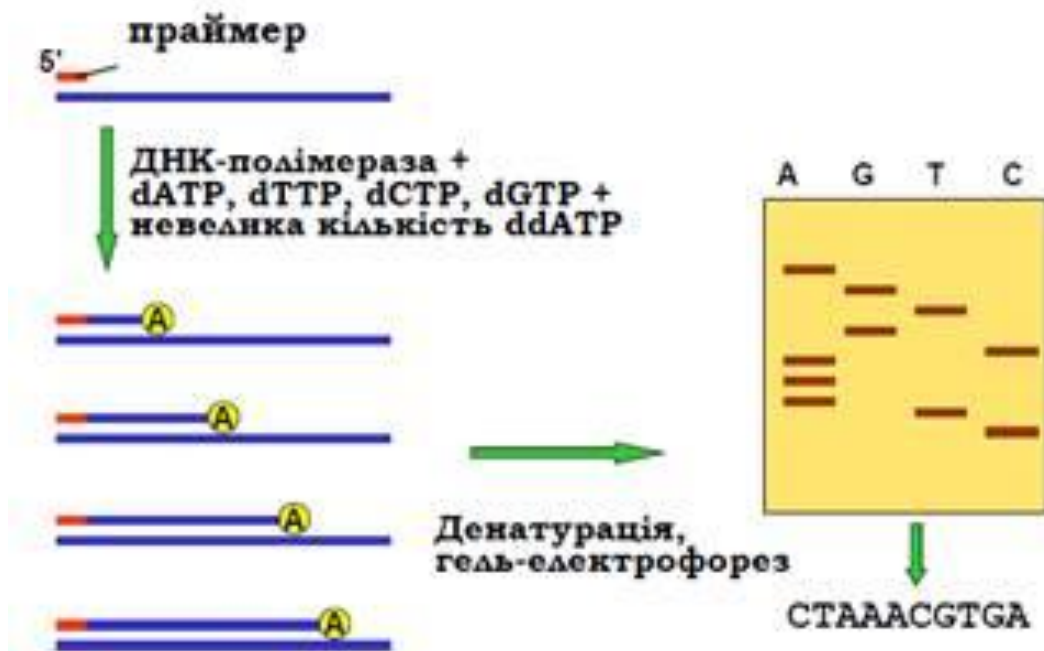


Рис 1. Схема синтезу ДНК за присутності дидезокси-АТР (ліворуч). Шляхом аналогічної процедури для інших трьох дидезоксинуклеотидів отримують набір одноланцюгових фрагментів, що аналізуються за гель-електрофорезом (за денатуруючих умов): праворуч – розподіл смуг дає змогу прочитати нуклеотидну послідовність (праворуч унизу)*

*[Рисунок із: Секвенування ДНК. Режим доступу: <https://helpiks.org/5-15320.html>].

Принципова схема біосенсора*

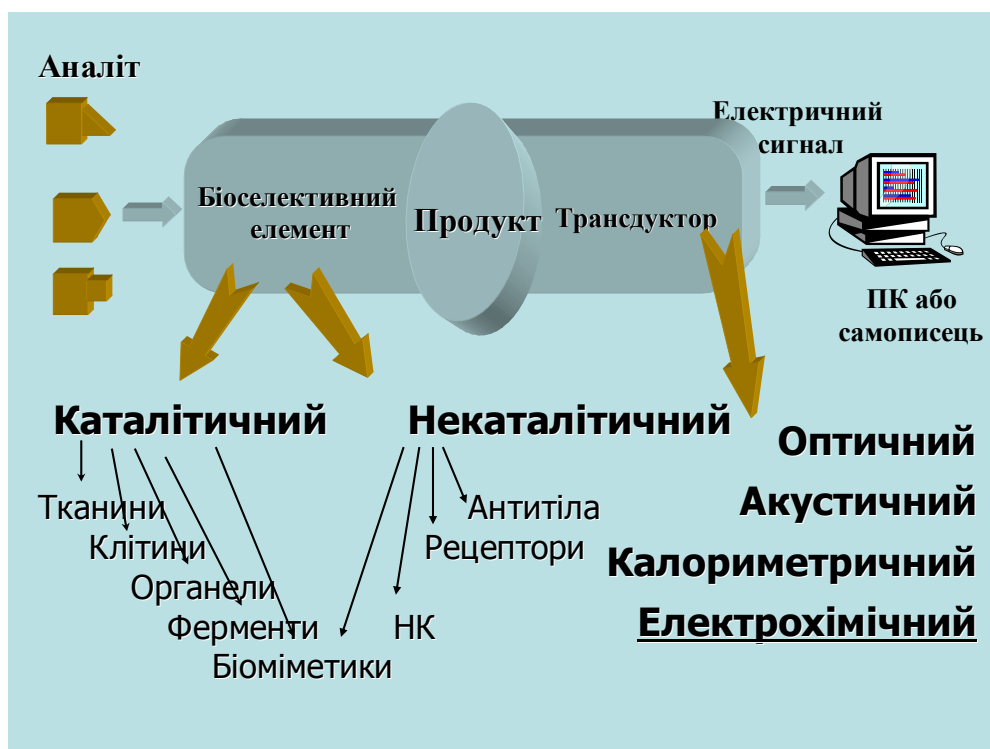
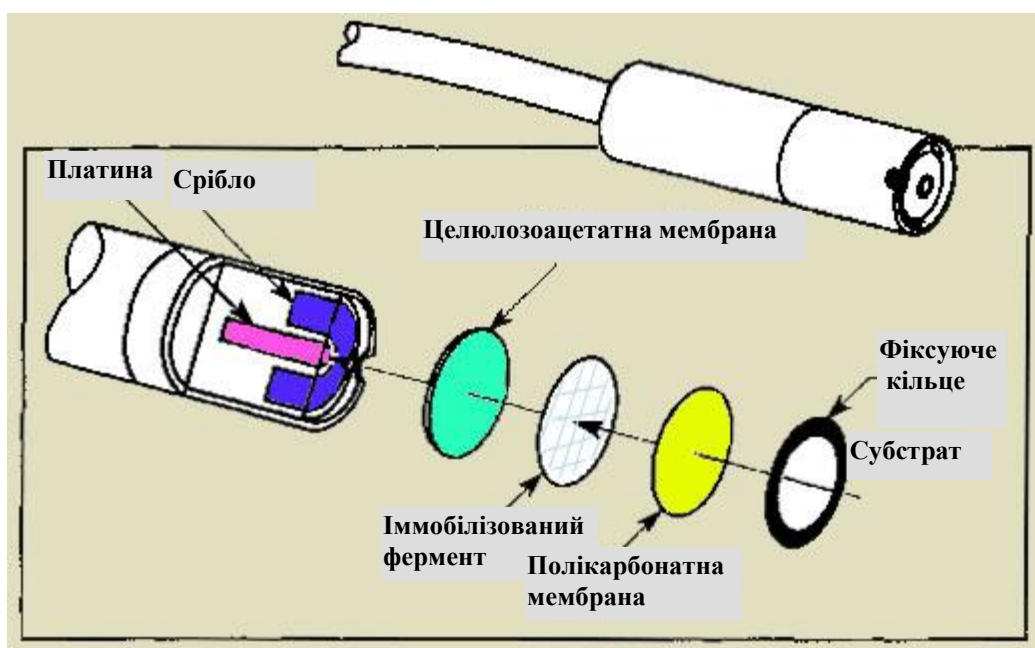
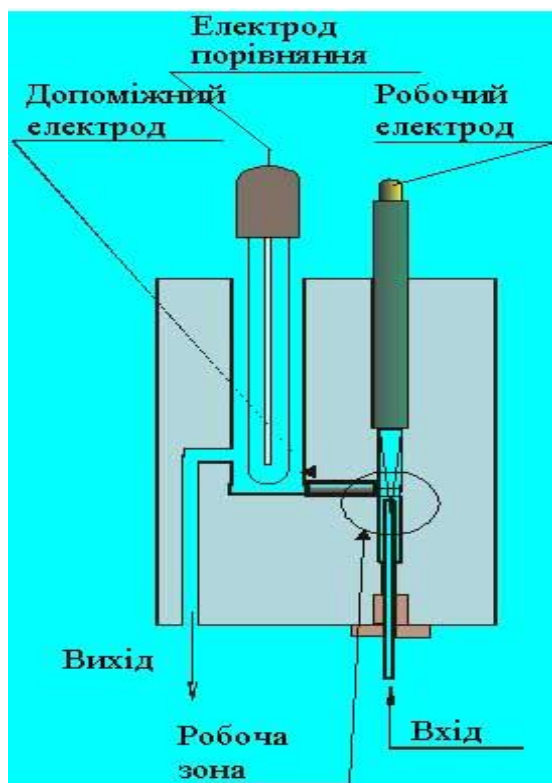


Схема амперометричних біосенсорів на основі O_2 - і H_2O_2 -селективних електродів*

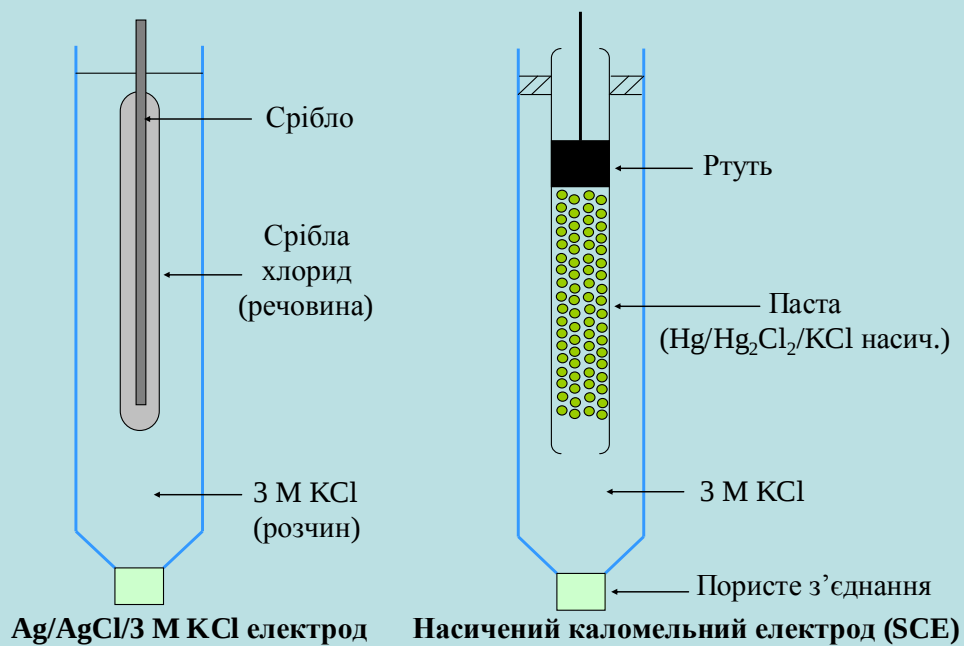


* [Дзядевич С.В., Солдатків О.П., 2006].

Схема трьохелектродного біосенсора*



Типи електродів порівняння



*[Дзядевич С.В., Солдатків О.П., 2006].

Значимі поліморфізми для оцінки ризику серцево-судинних захворювань*

	Name	Gene	Polymorphism
1	Prothrombin (F II)	FII	G20210A
2	Leiden factor	FV	G1691A
3	Fibrinogen	FGB	G 455A
4	Methylenetetrahydrofolate reductase	MTHFR	C677T
5	Apolipoprotein C3	APOC3	C1100T
6	Apolipoprotein C3	APOC3	C -482T
7	Apolipoprotein E	APOE	T334C
8	Apolipoprotein E	APOE	T472C
9	Apolipoprotein B	ApoB	C2488T
10	Apolipoprotein B	ApoB	G4154A
11	Apolipoprotein(a)	LPA	C93T
12	Apolipoprotein(a)	LPA	G121A
13	Lipoprotein lipase	LPL	C1595G
14	Lipoprotein lipase	LPL	G281A
15	Hepatic lipase	LIPC	C(-514)T
16	Hepatic lipase	LIPC	C(-2)T
17	Hepatic lipase	LIPC	A884G
18	ABCA1 transporter	ABCA1	R-219-K
19	ABCA1 transporter	ABCA1	Ile823Met
20	Lipoprotein receptor-related protein 1	LRP1	C200T
21	Lipoprotein receptor-related protein 1	LRP1	C663T
22	Lipoprotein receptor-related protein 1	LRP1	C766T
23	Lectin-like oxidized LDL receptor	LOX-1/OLR1	C(-25)G
24	Lectin-like oxidized LDL receptor	LOX-1/OLR1	G501C
25	Angiotensinogen	AGT	T174M
26	Angiotensinogen	AGT	M235T
27	Angiotensin I-converting enzyme	ACE	Alu I/D
28	Angiotensin receptor I	AGTR1	A1166C
29	nitric oxide synthase	NOS	E298D
30	Paraoxonase	PON I	C (-108) T

*Современные технологии анализа точечного нуклеотидного полиморфизма.
 Режим доступа: <https://slideplayer.com/slide/4789928/>

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Божков А.И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А.И. Божков. – Х., 2008. – 364 с.
2. Біотехнологія : підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименка, М.І. Цвіліховський та ін. / під заг. ред. В.Г. Герасименка. – К. : Інкос, 2006. – 647 с.
3. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів / В.О. Федоренко, Б.О. Осташ, М.В. Гончар, Ю.В. Ребець : навч. посіб. [для студентів біологічних факультетів університетів]. – Львів : Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2007. – С. 178–257.
4. Глик Б., Пастернак Дж. . Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
5. Дзядевич С.В. Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування // Біополімери і клітина, 2005. – Том. 21, № 2. – С. 91–106.
6. Задачі та вправи з генетики : навч. посіб. / В.О. Федоренко, Я.І. Черник, Д.В. Максимів, Л.С. Боднар. – Львів : Оріяна-Нова, 2008. – С. 523–568.
7. Клеточная инженерия / Р.Г. Бутенко, М.В. Гусев, А.Ф. Киркин, Т.Г. Корженевская, Е.Н. Маркарова. – Т. 3. – М. : Высш. шк., 1987. – 343 с.
8. Компанець Т.А. Віруси як векторні системи : курс лекцій / Т.А. Компанець. – К. : В-во Фітосоціологічного центру, 2007. – 84 с.
9. Медична генетика : підручник для вузів / В.М. Запорожан, Ю.І. Бажора, А.В. Шевеленкова, М.М. Чеснокова. – Одеса : Одес. держ. мед. ун-т, 2005. – 260 с.
10. Медична генетика : підручник для вузів / за ред. О.Я. Гречаніної , Р.В. Богатирьової, О.П. Волосовця. – К. : Медицина, 2007. – 536 с.
11. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. С Херрингтона и Дж. Макги : пер. с англ. – М. : Мир, 1999. – С. 558.
12. Основи біотехнології / укладачі: В.І. Буцьяк., А.Г. Колотницький. – Львів : Тріада плюс, 2010. – 396 с.
13. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. – 522 с.
14. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія : підручник / А.В. Сиволоб. – К. : Видав.-поліграф. центр “Київський університет”, 2008. – С. 384. Режим доступу : biology.org.ua/files/lib/MolBiol_sivolob.pdf
15. Тоцький В.М. Генетика : підручник. Вид. 3-е, випр. та доп. – Одеса : Асторопринт, 2008. – С. 475–505.
16. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. из-во, 2004. – 496 с.
17. Gazit E. Plenty of room for biology at the bottom. An Introduction to Bionanotechnology. – London : Imperial College Press, 2007. – 183 p.
18. Mardis E.R. New-generation DNA sequencing methods. – Ann. Rev. Genom. Human Genet, 2008. Vol. 9. – P. 387–402.

19. Metzker M.L. Sequencing technologies – the next generation. – Nat. Rev. Genet., 2010. Vol. 11. – P. 31–46.
20. PCR technology: principle and applications for DNA amplification / ed. H.Erlich. – New York : W.H.Freeman and Company,1992. – 74 p.
21. Schadt E. E., Turner S., Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. – Human Mol. Genet., 2010. Vol. 19. – P. 227–240.
22. <http://www.biotechnolog.ru>.
23. <http://www.biochem.biotech.ua>.
24. <http://www.cbio.ru>.
25. <http://www.rnd.cnews.ru>.
26. <http://www.nanodigest.ru>.
27. <http://www.nanonewsnet.ru>.

ЗМІСТ

Вступ.....	3
Методичні поради до практичних занять.....	5
Практичні заняття.....	7
Практичне заняття № 1. Методи виділення нуклеїнових кислот ...	7
Практичне заняття № 2. Ферменти і методи генної інженерії	17
Практичне заняття № 3. Методи аналізу та детекції нуклеїнових кислот	28
Практичне заняття № 4. Методи синтезу полінуклеотидів	39
Практичне заняття № 5. Методи конструювання рекомбінантних ДНК	48
Практичне заняття № 6. Методи секвенування нуклеїнових кислот. Геномні бази баних	55
Практичне заняття № 7. Аналітична біотехнологія. Біосенсорика.....	63
Практичне заняття № 8. Молекулярна діагностика спадкових, набутих та інфекційних захворювань	69
Додатки.....	77
Додаток А. Нуклеотидні послідовності, які розпізнаються деякими рестриктазами.....	77
Додаток Б. Картування сайтів рестрикції.....	78
Додаток В. Нуклеази, які використовуються у генній інженерії	79
Додаток Г. Генетичні карти плазмідних векторів	80
Додаток Д. Основні етапи генно-інженерного експерименту.....	81
Додаток Е. Схематичне зображення ДНК-гібридизації.....	82
Додаток Ж. Ідентифікація клонів клітин методом ДНК-ДНК гібридизації.....	83
Додаток З. Ідентифікація клонів клітин імунологічним методом.....	84
Додаток И. Хемілюмінісцентний метод виявлення ДНК-мішені.....	85
Додаток І. Схема імуноферментного аналізу ELISA.....	86
Додаток К. Хроніка геномних досліджень і секвенування нуклеїнових кислот.....	87
Додаток Л. Секвенування ДНК за Сенгером.....	88
Додаток М. Принципова схема біосенсора.....	89
Додаток Н. Схема трьохелектродного біосенсора	90
Додаток О. Значимі поліморфізми для оцінки ризику серцево-судинних захворювань.....	91
Використана література.....	92

Навчальне видання

Галина Клепач, Наталія Голуб

МОЛЕКУЛЯРНА ДІАГНОСТИКА

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

(для підготовки фахівців другого (магістерського) рівня вищої освіти
спеціальності 091 “Біологія”

**Редакційно-видавничий відділ
Дрогобицького державного педагогічного університету
імені Івана Франка**

Головний редактор
Ірина Невмержицька

Редактор
Іванна Біблій

Технічний редактор
Наталя Кізима

Коректор
Оксана Бульбах

Здано до набору 10.07.2019 р. Підписано до друку 15.07.2019 р.
Формат 60х90/16. Папір офсетний. Гарнітура Times. Наклад 100 прим.
Ум. друк. арк. 6, 00. Зам. 106.

Редакційно-видавничий відділ Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка. (Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до державного реєстру видавців, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 5140 від 01.07.2016 р.) 82100, Дрогобич, вул. І. Франка, 24, к. 42.