

Київський національний імені Тараса Шевченка
Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»
Кафедра біохімії

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО РОЗДІЛУ «МОЛЕКУЛЯРНА
БІОТЕХНОЛОГІЯ» КУРСУ «ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»**

Затверджено на засіданні Вченої Ради
ННЦ «Інститут біології та медицини»,
протокол **№ 6** від **11 грудня 2018 року**

Упорядники:

к.б.н., асист. Драницина А. С.
д.б.н., проф. Савчук О. М.
к.б.н., доц. Гребіник Д. М.
к.б.н., доц. Кравченко О.О.
д.б.н., проф. Остапченко Л. І.

Київ-2018

Зміст

Загальні	підходи	до	вивчення	молекулярної
біотехнології.....				4
Коротка характеристика навчальної дисципліни.....				4
Виділення та фракціонування нуклеїнових кислот еукаріот.....				5
Гель-електрофорез в агарозному та поліакриламідному гелі.....				20
Спектрофотометрія нуклеїнових кислот.....				43
Основи полімеразної ланцюгової реакції.....				49
ПЛР у реальному часі.....				63
Аналіз даних ПЛР у реальному часі.....				73
Гібридизація нуклеїнових кислот, ДНК-фінгерпринтинг.....				81
Дот блот аналіз.....				89
Методи імунного аналізу.....				92
Сиквенування нуклеїнових кислот.....				97
Опис лабораторних робіт.....				107
1. Порівняння якості та кількості тотальної ДНК еукаріот при виділенні за допомогою рідкофазних і твердофазних методів.....				107
2. Особливості роботи з РНК. Виділення РНК за допомогою різних методів.....				111
3. Виділення ДНК із клітин <i>E. coli</i>				115
4. Якісний і кількісний аналіз препаратів нуклеїнових кислот за допомогою гель-електрофорезу в агарозному гелі.....				117
5. Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК і РНК				121
6. Рестрикційний аналіз геномної та векторної ДНК для ДНК фінгерпринтингу. Віртуальна рестрикція.....				123
7. Реакція лігування за тупими кінцями.....				132
8. Отримання компетентних клітин <i>E. coli</i> та їх трансформація плазмідною ДНК.....				134
9. Детекція рекомбінантних клонів на основі біло-блакитної селекції.....				137

10.	Виділення ДНК плазмід за допомогою лужного лізису та очищення ДНК плазмід	139
11.	Кількісний аналіз експресії мРНК певного гена за допомогою ПЛР у реальному часі.....	142
12.	Визначення нуклеотидної послідовності ДНК методом Сенгера на приладі «ABI Prism 3130».....	157
13.	Аналіз сиквенованих нуклеотидних послідовностей: пошук гомологій.....	160
14.	Технологія перевірки наявності певного білка в зразку за допомогою дот блот аналізу	165
15.	Диск-електрофорез білків молока в системі Лемлі.....	167
16.	Визначення кількісного вмісту IL-5 у сироватці миші методом ІФА.....	173
	Типові тестові завдання до курсу.....	177
	Відповіді на типові тестові завдання.....	182
	Список використаної та рекомендованої літератури.....	183

Загальні підходи до вивчення молекулярної біотехнології

Коротка характеристика навчальної дисципліни

Навчальна дисципліна «Загальна біотехнологія» вивчає можливості використання методів генної інженерії, біохімії, молекулярної біології та інших наук для отримання тих чи інших біологічних молекул чи трансгенних організмів із метою використання в різних галузях охорони здоров'я та екології: одержання та використання клітин мікроорганізмів, тварин і рослин, а також продуктів їх життєдіяльності: ферментів, амінокислот, вітамінів, антибіотиків тощо. Для спеціальності Біотехнології та біоінженерія цей курс є базовим і створює основу для подальшої спеціалізації дослідників, які планують застосовувати новітні молекулярно-біотехнологічні методи досліджень як у галузі науки, так і в прикладних дослідженнях та промисловості.

Метою дисципліни є формування у студентів базових знань про сучасний стан біотехнології як нового напрямку наукової й практичної діяльності людини на основі засвоєння методів клонування ДНК, білків та отримання трансгенних одно- й багатоклітинних організмів для вирішення різних завдань у галузях охорони здоров'я та екології.

Виділення та фракціонування нуклеїнових кислот еукаріот

Уперше нуклеїнові кислоти (НК) почали виділяти з 19 століття (Friedrich Miescher (1869); Іван Горбачевський тощо) за допомогою емпірично підібраних концентрацій та комбінацій різних речовин, наприклад: NaOH, CaCl₂, Na₂SO₄, HCl та спирти. Джерелом НК може слугувати будь-який біологічний об'єкт (клітини, що містять ядро; а також у певних випадках позаклітинна НК). На сьогодні розроблено безліч методів виділення як сумарної фракції НК, так і екстракції або тільки ДНК (хромосомної, мітохондріальної, плазмідної тощо), або тільки РНК (матричної, транспортної тощо). Методи засновані на відмінностях у властивостях аналізуємих молекул. Наприклад, у присутності лугу відбувається гідроліз РНК, а ДНК залишається стабільною, й навпаки.

Методи виділення НК умовно ділять на **аналітичні** та **препаративні**, що залежить від кількості необхідної НК. Ці методи розрізняються кількістю вихідного матеріалу, об'ємами розчинів реагентів. Головна умова - суворе дотримання початково встановлених співвідношень реагентів.

Для підготовки біологічного зразка до полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), рестрикції ДНК, сиквенування тощо в залежності від поставлених завдань, часу аналізу та ступеня очищення використовують різні методики. **Основними етапами методів виділення НК** є лізис клітинних структур, очищення НК від домішок і концентрування. Їх суть полягає в екстракції НК із препарату та видаленні чи нейтралізації сторонніх домішок (білків (що входять до складу нуклеопротейдних комплексів хроматину), залізовмісних з'єднань тощо) для отримання максимально цілісного зразка НК (захистити від дії **нуклеаз** (рибонуклеази - РНКазі чи дезоксирибонуклеази - ДНКазі), оскільки довгі лінійні молекули ДНК при їх ізоляції з клітини неминуче фрагментуються. Так, щоб захистити зразок НК від фрагментування потрібно додати, наприклад, ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота, (HOOCCH₂)₂N(CH₂)₂N(CH₂COOH)₂), яка хелатує кофактор ДНКаз - Mg²⁺, або у випадку РНК - гуанідин ізотіоціанат та 2-меркаптоетанол (відновлює дисульфідні зв'язки РНКаз).

Пріоритетні вимоги, які повинні забезпечувати методи виділення НК:

- лізис біологічного матеріалу;
- селективна екстракція (сорбція);
- концентрування з великих об'ємів;
- відокремлення компонентів, які інгібують ПЛР;
- відокремлення ДНК від РНК;
- висока концентрація виходу НК;
- відсутність контамінації;
- невеликі затрати часу;
- безпечність;
- можливість роботи з різними біологічними об'єктами;
- відтворюваність і валідація результатів;
- можливість автоматизації.

Усі сучасні методи очищення НК можна поділити на 2 великі групи: методи з поетапним видаленням домішок із водного розчину НК – **рідкофазні** та методи, засновані на сорбції НК на твердій фазі, - **твердофазні**. Вибір найбільш підходящої методики виділення та очищення НК залежить від поставлених завдань і ґрунтується на таких критеріях: джерело НК, вид НК, кількість і чистота кінцевого препарату НК.

Рідкофазні методи. Класичні методи виділення. За класичними методами виділення НК зі складних вихідних зразків, таких як кров або тканини, відбувається за допомогою лізису біологічного матеріалу детергентами або хаотропними агентами (іноді в присутності ферментів, які руйнують білки).

Процедура лізису може бути наступною: механічне пошкодження (подрібнення за допомогою товкача, гомогенізатора, застосування ультразвуку тощо), вплив температурою (кип'ятіння, заморожування-відтавання), хімічними речовинами (використання детергентів (наприклад, додецилсульфат натрію (ДСН, SDS (англ.), аніонний детергент (суфрактант)), хаотропними агентами

(гуанідин тіоціанат, фенол, бутанол, сечовина, високі концентрації солей тощо) і гідролітичними ферментами (лізоцим, трипсин, протеїназа К тощо).

Після цього етапу проходять кілька стадій, в яких використовуються органічні розчинники, такі як фенол і / або хлороформ, або етанол. Деякі методики для звільнення ДНК від білків хроматину передбачають використання протеїназ. Повне відділення білків від НК може бути досягнуто додаванням перхлората натрію.

Очищення НК від домішок у більшості випадків пов'язано з **концентруванням**. Використовують різні фізико-хімічні лабораторні методи: фільтрування, екстракція органічними розчинниками (фенол, хлороформ тощо), Преципітація спиртами або поліетиленгліколем, центрифугування, електрофорез, хроматографія тощо. Серед **хроматографічних методів** найбільш часто застосовують адсорбційну, афінну, іонно-обмінну, обернено-фазову, гідрофобну хроматографії або гель-фільтрацію (хроматографія, що поділяє за розміром).

Для отримання препаратів, які містять тільки ДНК або РНК, застосовують нуклеази або системи, що селективно зв'язують НК. Так, разом із ДНК частково виділяється й РНК, від якої позбавляються за допомогою ферменту РНКаз. При виділенні РНК дуже великий ризик контамінації з боку присутньої в початковому зразку ДНК. Так, у разі відокремлення РНК від ДНК необхідне селективне інкубування з хлоридом літію або специфічне безнуклеазне ізолювання з гуанідин хлоридом або гуанідин ізотіоціанатом, скомбіноване з фенольною екстракцією або етанольною преципітацією. Але такі методи збільшують ймовірність деградації НК, втрати зразка або кросконтамінації зразків, якщо кілька проб обробляються одночасно.

Екстракція на основі температурного лізису. Методика, що дозволяє в найкоротші терміни отримати препарат НК. Принцип методу полягає в наступному: зразок біоматеріалу інкубується з лізуючим буфером при високій температурі (близько 90 - 95 °C), у цей час відбувається деструкція клітинних мембран, вірусних оболонок та інших біополімерних комплексів і вивільнення

НК. При подальшому центрифугуванні нерозчинні компоненти осідають на дні пробірки, а супернатант (надосадова рідина) містить НК. Застосування цього методу досить обмежено, так як його **недоліком** є низька якість виділеного препарату НК - забруднення продуктами лізису клітин (білками й ліпідами).

Найбільш відомим традиційним рідкофазним методом є **фенол-хлороформна екстракція** (для виділення ДНК [Blin and Stafford, 1976]). Цей метод у різних варіаціях застосовується, коли потрібно досягти високої стандартизації в процедурі екстракції та отримати високоочищені препарати НК із різних типів біологічних об'єктів. Однак цей метод орієнтований на роботу з такими токсичними речовинами, як фенол і хлороформ, до того ж присутні стадії центрифугування та рідинної екстракції, які не можна автоматизувати.

Принцип методу заснований на тому, що ДНК є полярною молекулою і не розчиняється в органічних розчинниках. Суміш фенолу з хлороформом не змішується з водою. При додаванні до лізата суміші фенолу з хлороформом та інтенсивному перемішуванні присутні в розчині білки денатурують (РНКазна активність інгібується частково; також у фенолі розчиняються мРНК із довгими поліА-последовностями), а гідрофобні домішки (ліпіди, жири тощо) розчиняються хлороформом (він, у свою чергу, видаляє залишки фенолу з препарату НК). Після перемішування та центрифугування клітинного лізата та фенолу формуються дві фази. ДНК знаходиться у верхній (водній) фазі, а денатуровані білки формують кільце на межі розділу фаз або розчиняються в нижній (органічній) фазі.

РНК уперше було виділено [Ulrich et al., 1977] за допомогою гуанідин тіоціанату. Проте через кропотливість виконання методу, його невдовзі було змінено на **одностадійний метод - гуанідин тіоціанат-фенол-хлороформна екстракція за методикою Хомчинського** [Chomczynski et al, 1987, «Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction»]. Принцип цієї методики полягає в тому, що РНК відділяється від ДНК після екстракції кислотним розчином, який складається з гуанідин

тіоціанату, ацетату натрію, фенолу та хлороформу. У кислих умовах загальна РНК залишатиметься у верхній водній фазі всієї суміші, тоді як ДНК і білки залишаться в міжфазі або нижній органічній фазі. Відновлення загальної РНК потім виконується осадженням з ізопропанолом (зادля збереження нативності РНК усі маніпуляції при 4 °С). Для більшої зручності при виділенні РНК фірмою «Invitrogen» запропоновано реагент **тризол** (триреагент, TRIzol Reagent), який уже містить в собі: гуанідин тіоціанат, кислий фенол, амонію тіаціанат, натрію ацетат та гліцерол.

Також можна виділяти РНК (особливо із зразків цільної крові) за допомогою подігрітого до 65 °С кислого фенолу (**виділення РНК «гарячим» фенолом; «Hot Acid Phenol RNA Isolation»**, Currents Protocols in Molecular Biology and from Hahn's web site).

Стандартною й також класичною вважається рідкофазна методика отримання чистого препарату НК, запропонована Marmur [Marmur, 1961]. Вона передбачає **ферментативний протеоліз клітин із подальшою депротейнізацією та осадженням НК спиртом.**

Преципітація (осадження) НК спиртами. Застосовується для концентрування розчинів НК і видалення більшості хімічних домішок. Принцип методу заснований на тому, що в присутності спирту солі НК утворюють агрегати, які осідають центрифугуванням. Для осадження використовують такі солі: амонію ацетат ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) у концентрації не менше 2,0 М, літію хлорид (LiCl) - не менше 0,8 М, натрію хлорид (NaCl) - не менше 0,2 М або натрію ацетат (CH_3COONa) - не менше 0,3 М. Найбільшого поширення знайшло використання етилового та ізопропілового спиртів. Преципітація НК відбувається при концентрації етилового спирту в препараті 70 % і вище, а ізопропілового спирту – 40 % і вище. При низьких концентраціях НК у зразку додатково використовують коосаджувачі (тРНК, глікоген тощо). Після центрифугування осад, що утворився, додатково промивають 70 % етанолом для видалення залишків солей. Слід зазначити, що при осадженні НК

спиртами відбувається копреціпітація цукрів, білків, фосфатів, ЕДТА та інших речовин.

Екстракція перхлоратом натрію (NaClO_4). Застосовується для видалення білкових домішок. Принцип методу заснований на денатурації білків під дією високих концентрацій перхлорату натрію. Наступний етап центрифугування зразка дозволяє відокремити денатуровані білки та інші нерозчинні домішки. Слід зазначити, що буферний розчин перхлорату натрію може використовуватися на етапі лізису клітинних структур.

Для отримання високоочищених препаратів НК, придатних для проведення ферментативних реакцій, застосовують **комбінацію фізико-хімічних методів лізису, екстракції та осадження НК.** Наприклад, комбінована методика виділення НК із біологічних зразків, що включає лізис клітинних структур із використанням хаотропної солі (гуанідин тіоціанат) і детергента (Triton X-100), екстракцію сумішшю фенолу з хлороформом та осадженням НК спиртом. Комбінація цих методів дозволяє отримати достатню ступінь очищення НК, необхідну для проведення ферментативних реакцій, таких як синтез комплементарної ДНК (зворотна транскрипція, ЗТ-ПЛР) і ПЛР.

Виділення із застосуванням NaCl [Малюта, 1996; Dranitsina, 2006] порівняно зі стандартною фенол–хлороформною екстракцією дає приблизно однакові результати як з кількості, так і з нативності виділеної ДНК (рис. 1). Проте метод екстракції з NaCl є більш швидким та таким, що не вимагає використання токсичних речовин.

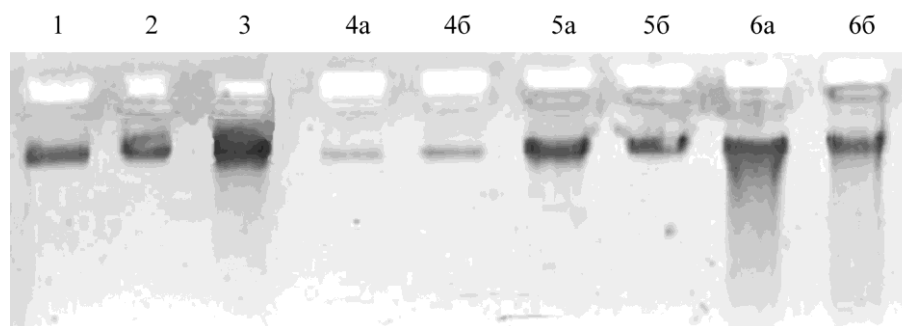


Рис. 1. Електрофореграма ДНК, яка була виділена із зразків крові пінгвінів а) за фенольно – хлороформним методом; б) за допомогою

екстракції зі NaCl (0,8 % агарозний гель): 1 – ДНК фага λ в кількості 100 нг; 2 – ДНК фага λ - 200 нг; 3 - ДНК фага λ - 500 нг; 4 - ДНК пінгвіна дженту (*Pygoscelis pappua*) № 1, 5 - ДНК пінгвіна дженту № 2, 6 - ДНК пінгвіна дженту № 3

Виділити ДНК із тваринних тканин значно простіше, ніж із **рослинних**, так як її питомий вміст у тваринних клітинах (0,25 % маси клітини, наприклад, у ссавців) у середньому вище, ніж у рослинних (0,01 - 0,1 %). При класичному способі виділення ДНК із тканин рослин важливе значення має ефективне руйнування клітинних стінок та інактивування шкідливих ферментів, що досягається за рахунок, наприклад, подрібнення зразка після заморожування його рідким азотом.

Часто доводиться знаходити компроміс між розміром ДНК та її кількісним виходом. Вивільнення високомолекулярної ДНК із рослинних клітин - це тільки частина завдання, так як рослинні екстракти містять великі кількості білків, полісахаридів, танінів і пігментів, які в ряді випадків досить важко відокремити від ДНК. Тому, після руйнування клітинних стінок зразок можна ресуспендувати у відповідному буферному розчині, такому як ЦТАБ (бромід цетилтриметиламоній, СТАВ (англ.), катіонний детергент). Цей реагент може осаджувати НК (утворює з ними солі) і кислотні полісахариди з низькоіонних розчинів. Тим часом, ЦТАБ утворює позитивно заряджені комплекси з денатурованими білками, які, у свою чергу, як і нейтральні полісахариди, залишаються в розчині за цих умов. У розчинах із високою іонною силою ЦТАБ не виділятиме НК і утворює комплекси з білками. Осад ЦТА-солей ДНК і РНК розчиняється в 1 М NaCl (Na^+ витісняє ЦТА $^+$).

Такі речовини, як глікоалкалоїди, таніни, феноли, ряд катіонів важких металів здатні інгібувати широко поширені в практиці біотехнології, але вельми «примхливі» до складу реакційного середовища ферменти (рестриктази, лігази, ДНК-полімерази (див. далі)). У такому випадку використання екстрагованої ДНК стає неможливим. Тому очищення ДНК від

низькомолекулярних сполук, яке проводять за допомогою екстракції хлороформом і переосадження (перекристалізації) НК спиртом, є обов'язковим етапом (або декількома етапами) виділення ДНК із рослинних тканин.

Також відомі методи, згідно з якими можна **виділити одночасно як ДНК, так і РНК з одного джерела**. При цьому використовуються сильні хаотропні агенти: гуанідин тіоціанат і тріфлуороацетат цезію для одночасного руйнування клітинних мембран та інактивації внутрішньоклітинних РНКаз. Проте лімітуючими факторами таких методик є необхідність довготривалого ультрацентрифугування впродовж 16 - 44 год.

Методи одночасного виділення ДНК і РНК, в яких немає центрифугування, мають перевагу ще й тому, що фенол діє як ефективний депротейнізуючий агент, який руйнує клітини й денатурує білки. Для ефективного відділення високомолекулярної ДНК від РНК спочатку проводиться фенольна екстракція, а потім дві фенол-хлороформні екстракції для одночасного видалення білків і ліпідів з розчину, що містить НК.

Препарат виділеної ДНК (з огляду на ймовірну присутність в ньому ферментів, здатних руйнувати НК, а також особливості молекулярної структури ДНК) рекомендується **зберігати** в замороженому стані. Причому заморожування препарату слід проводити при температурі -56°C і нижче, проте без кристалізації та льодоутворення, що, у свою чергу, може стати причиною розривів ниткоподібних молекул ДНК. Для таких цілей можна використовувати спеціальні низькотемпературні морозильні камери - криогенератори, кріостати або кельвінатори. Препарат ДНК можна зберігати і в побутової морозильній камері (-18°C) за умови, що розморожування буде проводитися нечасто. Інший спосіб - зберігання ДНК у вигляді осаду в неводному середовищі, найчастіше під 70 % -вим етанолом. Спиртовий осад ДНК компактний і практично не схильний до механічного і ферментативного руйнувань, так як переважна більшість ферментів неактивно в спиртовому розчині. РНК можна зберігати деякий час у $\text{H}_2\text{O dist}$ та пластику, позбавлених певним чином РНКаз (автоклавування, оброблення диетилпірокарбонатом

(DEPC)), у деіонізованій H_2O (наприклад, millipore – Milli-Q) чи покупний комерційний H_2O під 96 % -вим етанолом при (-20, -70, -80 °C); або в ТЕ (буферний розчин наступного складу: трис (скорочена назва хімічної сполуки трис-(гідроксиметил)-амінометана $(HOCH_2)_3CNH_2$) та ЕДТА з інгібітором РНК-аз (наприклад, РНК-зин, 0,5 – 1,0 од на мкл) при +4 °C.

Твердофазні методи: основні принципи. У твердофазних методах виділення НК використовуються наступні взаємодії: а) формування водневих зв'язків із немодифікованою гідрофільною матрицею (зазвичай кварцом; також для мРНК, наприклад, оліго(dT)-целюлоза) у хаотропних умовах; б) іонообмін у водному розчині, зазвичай із використанням аніонообмінників; в) афінність; г) механізми виключення за розміром.

Твердофазні системи, які адсорбують НК, - це частинки на основі **кварцу** (SiO_2 – є поліморфною модифікацією діоксиду кремнію (кремнезем, лат. silica)) або **силікатні сорбенти**; суспензії тонкоподрібнених скляних порошків, скляні волокна; аніонообмінні носії, які використовуються в **хроматографічних сепараційних колонках**. Ці носії застосовуються для виділення або очищення НК із висококонцентрованими розчинами (із високою іонною силою) хаотропних солей (йодид натрію, перхлорат натрію, гуанідин тіаціанат).

Однією з перших запропонованих методик цього типу є метод виділення ДНК, запропонований Boom [Boom *et al*, 1990, Boom *et al*, 1999]. Цей метод заснований на використанні для лізису клітин сильного хаотропного агенту та наступній сорбції ДНК на твердому носії - **силікатному сорбенті** (такі сорбенти мають назву «**скляні буси**», «діатомова земля» тощо). Останнім часом використовують одноразові пластикові колонки з упакованим сорбентом (рис. 2).



Рис. 2. Скорочена схема твердофазного виділення ДНК на основі силікатного сорбента (адаптовано з explorer.bio-rad.com). Пояснення в тексті.

Після афінної сорбції НК на поверхні носія або на колонці інгібітори ферментативних реакцій, інші домішки та компоненти біологічного матеріалу залишаються в розчині. Носій, який зв'язав НК, осідає за допомогою центрифугування, а надосадова рідина видаляється. Серія наступних відмивок забезпечує отримання високоочищеного препарату. Також промивання колонок із зв'язаною НК розчинами з високою іонною силою видаляє білки й низькомолекулярні речовини, після чого проводять елюцію очищених НК шляхом промивання сорбенту розчинами низької іонної сили або $\text{H}_2\text{O dist}$.

Інші методи засновані на спільній детергенції з матеріалами, що зв'язують НК, або на використанні твердого сорбенту з функціональними групами, які зв'язують НК, у поєднанні з поліетіленгліканами та солями високої концентрації.

Ще один метод із цієї групи базується на використанні **іонообмінників типу «Chelex™»** («Bio-Rad», США), котрі, на відміну від оксиду кремнію, сорбують не НК, а домішки, які заважають проходженню реакції. Як правило, ця технологія містить 2 стадії: кип'ятіння зразка, унаслідок чого клітинні стінки руйнуються, а НК виходять у розчин; і сорбція домішок на іонообмінник (наприклад, суміш ізомерів дівінілбензола («голівка») із парами імінодіацетат-іонів). У більшості випадків цей метод є простим у виконанні й придатним для

роботи з клінічним матеріалом. Але іноді зустрічаються зразки з такими домішками, які неможливо видалити за допомогою іонообмінників, тому застосування цього методу є досить обмеженим. Крім того, клітинні стінки деяких мікроорганізмів не піддаються руйнуванню простим кип'ятінням. У таких випадках необхідні додаткові стадії оброблення зразку.

Метод на основі магнітної сепарації. Модифікацією твердофазних методів є використання кремнієвих носіїв із магнітними властивостями, які досягаються додаванням до їх складу оксиду заліза, що дозволяє відмовитися від етапу центрифугування. Зазвичай магніт прикладається до стінки чи дна пробірки, які містить зразок із магнітними частинками, щоб частинки агрегували на стінках (дні) пробірки, а залишок зразка можна було прибрати

Таким способом можна відокремлювати компоненти клітинного лізату, які інгібують ДНК-полімеразу та ПЛР, наприклад, полісахариди, фенольні компоненти, гумус. Для процесу виділення використовуються **магнітні носії з іммобілізованими афінними лігандами або виготовлені з біополімеру, що збільшує афінність до потрібної НК**. Магнітні носії є в продажу або можуть бути виготовлені в лабораторії.

Магнітні частинки виготовляють із різних синтетичних полімерів, біополімерів, пористого скла або на основі неорганічних магнітних матеріалів, таких як оксид заліза з модифікованою поверхнею. Особливо підходять для виділення **суперпарамагнітні частки**, що не взаємодіють один з одним під час відсутності магнітного поля. Ці частинки набувають магнітного моменту в сильному магнітному полі, але не зберігають постійного магнетизму, коли поле вимикають. Якщо усунені магнітна агрегація й злипання частинок, то протягом реакції досягається суспензування частинок та однакова екстракція НК. Для автоматичного виділення НК використовуються магнітні частинки зі скляним покриттям. НК зв'язується зі скляною поверхнею, потім зв'язана з частинками вона проходить низку стадій екстракційного процесу: після серії відмивань у пробі залишається НК, сорбована на носії, з якого вона легко знімається за допомогою буферного розчину для елюції (зокрема певними маніпуляціями

можна відділити ДНК від РНК). Метод зручний, технологічний і придатний для підготовки зразка до ампліфікації, його можна відтворити на роботизованих піпетуючих робочих станціях (рис. 3). Однак можливі втрати продукту внаслідок незворотної сорбції на носії, а також у процесі численних відмивань. Особливо велике значення це має при роботі з невеликими кількостями ДНК в зразку.



Рис. 3. Роботизована станція для виділення нуклеїнових кислот на основі магнітної сепарації (комірки для завантаження зразків; «Qiagen QiaSymphony SP», The Jenner Institute Laboratories (запозичено з <http://www.jenner.ac.uk/qiasymphony-automated-nucleic-acid-extraction-qane>).

Валові ДНК і РНК виділяються за допомогою одних і тих же магнітних частинок. Щоб відокремити РНК від ДНК, РНК знищується до стадії сепарації ДНК. Найкращим варіантом є додавання РНКаз або луку. Навпаки, РНК може бути виділена при руйнуванні ДНК ДНКазою.

На сьогодні на ринку представлені декілька комерційних наборів (на основі розчину чи колонок), що містять готові реагенти для **очищення геномної ДНК, загальної РНК та загального білка від одного біологічного зразка одночасно** (без використання вищезазначених токсичних речовин).

За допомогою так званої **диференційної екстракції** (Differential Extraction, [Gill et al. 1985; Guisti et al. 1986]) можна відокремити та **виділити ДНК із двох**

біологічних зразків одночасно (наприклад, жертви та нападника). Метод є модифікацією класичної **фенол-хлороформної екстракції**.

Окрім зазначених методів, НК із крові та різних біологічних рідин можна швидко виділяти, зберігати (не менше 6 місяців за кімнатної температури без денатурації НК) та транспортувати за допомогою специфічного паперу (**FTA® Paper, «Sigma-Aldrich»**). Він являє собою целюлозний фільтр – матрицю («Whatman BFC180» чи «31ET paper»), на який НК адсорбується під дією УФ-світла. Також, відповідно, на ньому нашаровано суміш із буферного розчину високої іонної сили, певних денатуруючих та хелатуючих агентів (рис. 4).



Рис. 4. FTA® папір (запозичено з <http://www.sigmaaldrich.com>).

Також за допомогою специфічних комерційних наборів можливо виділити **позаклітинну НК у плазмі крові**. Розглядається можливість активної екскреції ДНК клітинами імунної системи, апоптотичне, стресове тощо походження позаклітинної ДНК, а також можливість діагностичного використання позаклітинної НК в якості маркерів пухлинного росту.

При заборі матеріалу для методів прямої лабораторної діагностики потрібно уникати використання надлишку біоматеріалу (для ПЛР цілком достатньо мг зразка), адже недостатнє очищення ДНК може інгібувати ПЛР. Для ПЛР-дослідження придатний будь-який потенційно інфікований матеріал;

остаточний вибір матеріалу для аналізу повинен визначатися найбільш імовірним місцем локалізації збудника інфекції. Для отримання адекватного результату аналізу велике значення має якість забору матеріалу для дослідження, умови його зберігання, транспортування, попереднього оброблення. Так, необхідно використовувати стерильні пробірки, вільні від НК, РНКаз, ДНКаз. Для кожного зразка використовують індивідуальні інструменти та одноразові контейнери для зберігання. Це необхідно для запобігання перехресного забруднення (контамінації) одного зразка генетичним матеріалом іншого. Певний біоматеріал повинен зберігатися в холодильнику за відповідної температури або в замороженому стані, або відразу використовуватися для виділення НК; транспортуватися з охолодженням; зокрема кров із стабілізуючими агентами: ЕДТА, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (цитрат натрію), але за відсутності інгібіторів ПЛР – гепарину, формаліну тощо.

ПЛР є доволі невибагливою методикою відносно якості вихідного зразка ДНК. Однак є декілька особливостей виконання підготовки зразків для проведення ПЛР із реєстрацією результатів у реальному часі, зокрема певні вимоги до фонові флуоресценції зразка та до присутності домішок у зразку, які можуть призводити до денатурації флуоресцентної проби, яка використовується для реакції зворотної транскрипції і/або ампліфікації тощо. Проведення ЗТ-ПЛР потребує високої чистоти зразка РНК для досягнення кращої ефективності синтезу кДНК.

Таким чином, у розділі наведено вимоги, які повинні забезпечувати методи виділення НК, та охарактеризовано рідкофазні та твердофазні методи очищення НК (історичний аспект, сучасний стан та перспективи), детально описано їх приклади та нюанси проведення відповідних методик.

Кількісне та якісне оцінювання зразка отриманої НК здійснюється за наступною стандартною процедурою **гель-електрофорезу НК в агарозному гелі** шляхом візуального порівняння зі зразками відомої концентрації та молекулярної маси. **Спектрофотометричне визначення** дає більш точну кількісну характеристику препарату НК та його чистоту (див. нижче).

Контрольні запитання:

- 1) Які пріоритетні вимоги повинні забезпечувати методи виділення НК?
- 2) Які компоненти входять до складу розчину для лізису клітин і які їх функції?
- 3) Назвіть відмінності рідкофазних і твердофазних методів виділення НК.
- 4) Як захистити НК від дії нуклеаз?
- 5) Який із рідкофазних методів виділення ДНК є більш швидким та таким, що не вимагає використання токсичних речовин?
- 6) Преципітація (осадження) НК спиртами.
- 7) Як отримати препарати, що містять тільки ДНК або РНК?
- 8) Переваги та недоліки методу магнітної сепарації.
- 9) Які основні вимоги та особливості роботи з РНК під час її виділення?
- 10) Назвіть методи виділення НК, які можуть бути автоматизовані в лабораторії.

Гель-електрофорез в агарозному та поліакриламідному гелі

Електрофорез заснований на фізичному явищі, при якому молекули, які несуть різний заряд, рухаються під дією прикладеного електричного поля з різною швидкістю, у результаті чого відбувається їх розділення з вихідної суміші.

Уперше цей підхід був застосований шведським біохіміком Арне Тізеліусом (Arne Wilhelm Kaurin Tiselius) у 1930-х роках для розділення білків сироватки крові, а вже в 1948-му році, ця робота була відзначена Нобелівською премією. З тих пір електрофорез є основним методом поділу білків і НК (а також їх фрагментів), залишаючись одним із найбільш чутливих методів.

Електрофоретичне (горизонтальне) розділення в **агарозному гелі** - це стандартний метод, який використовується для розділення, ідентифікації та очищення НК. Агароза застосовується тому, що аналізуємі зразки ДНК найчастіше значно більші білків, тому вони не здатні входити в **поліакриламідний гель** (ПААГ (див. далі)) - для них потрібен гель, який має пори великого розміру. У НК у широкому діапазоні рН (величина загального заряду молекули визначається кількістю заряджених груп, їх природою, а також кислотністю розчину) на кожен фосфатну групу припадає заряд -1, отже, негативно заряджені молекули НК рухаються в доданому до агарозного геля електричному полі до позитивно зарядженого анода.

Візуалізувати дволанцюгові та одноланцюгові НК у гелі можна за допомогою флуоресцентного барвника – **бромистого етидію**, який інтеркалює між сусідніми парами азотистих основ. За допомогою бромистого етидію в ультрафіолетових променях візуально можна виявити мінімально близько 1 нг ДНК (у залежності від типу ламп транслюмінатора – прилада для детекції НК в УФ-світлі, наприклад, при УФ із довжиною світла 254 нм чи при використанні додаткових підсилюючих світлофільтрів).

Швидкість руху молекули в полі одиничної напруженості називається **електрофоретичною рухомістю**, яка є важливою характеристикою речовини. Коли біологічний зразок, такий як ДНК, змішується в буферному розчині й

наноситься на гель, 2 змінні, від яких залежить розподіл макромолекул, - це заряд і маса, - діють одночасно. Електричний заряд від одного електрода відштовхує молекули, у той час як інший електрод одночасно притягує молекули. Сили тертя матеріалу, що утворює гель, діють як «молекулярне сито», розділяючи молекули за розміром.

За Маніатісом [*Maniatis et al*, 1982], швидкість міграції НК при електрофоретичному розділенні в агарозному гелі залежить від таких параметрів: розмірів молекул НК; концентрації агарози; конформації НК; показника напруги електричного поля; іонної сили та температури буферного розчину; відносної гідрофобності зразка; вмісту азотистих основ і температури.

Існує також **опір тертя**, яке уповільнює рух заряджених молекул. Ця сила тертя є функцією від наступних параметрів: гідродинамічного розміру молекули; форми молекули; розміру пор середовища, в якому відбувається електрофорез; в'язкості буферного розчину.

Розмір молекул нуклеїнових кислот. Швидкість руху лінійних молекул НК в агарозному гелі обернено пропорційна десятковому логарифму їх молекулярних мас (рис.5).

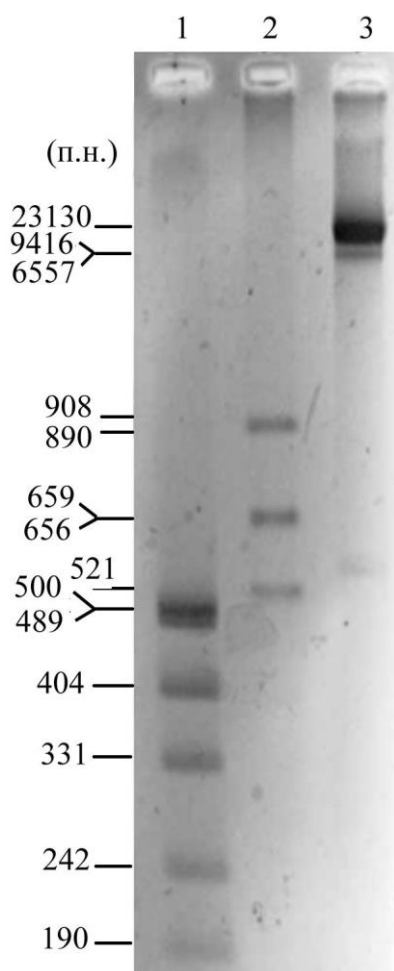


Рис. 5. Електрофореграма розділення різних маркерів молекулярної маси (1,8 % агарозний гель):

1 – молекулярний маркер (п.н.) – плазмідна *pUC19*, розщеплена ферментом *MspI*; 2 – молекулярний маркер (п.н.) – плазмідна *pBR322*, розщеплена ферментом *AluI*; 3 – молекулярний маркер (п.н.) – ДНК фага λ , розщеплена ферментом *HindIII*.

Концентрація агарози. Агароза – це чиста фракція природного лінійного полісахариду агару, який отримують із морських червоних водоростей (*Gracilaria*, *Gelidium*, *Ahnfeltia*). Цей колоїд, утворений елементом, який повторюється, – агаробіозою, що, у свою чергу, складається з β -D-галактопіранози і 3,6-ангідрид- α -L-галактопіранози, що чергуються (зв'язок 1 $\rightarrow$ 4; середня молекулярна маса становить $\sim 12\,000$ Да). Гелеутворення йде шляхом зв'язування в просторову сітку пучків ниток за рахунок водневих зв'язків між ними. Агарозні пори великого розміру використовуються

переважно для розділення молекул із молекулярною масою більше 200 кДа. Для загальних цілей використовують агарозу, яка легко плавиться. При температурах 84 - 96 °С розчин агарози переходить у прозору рідину - «плавиться». Спеціальна низькоендоосмотична агароза плавиться вже при 70 °С і дає прозорі розчини й пружні гелі навіть при малих концентраціях 0,3 %. Розчини агарози тверднуть, утворюючи гель, при значно нижчих температурах: 36 - 42 °С.

Збільшення концентрації агарози в гелі призводить до зменшення розмірів його пор. Між логарифмом електрофоретичної рухомості ДНК (μ) і концентрацією агарози геля (τ) існує пряма залежність, яка описується наступним рівнянням:

$$\lg \mu = \lg \mu_0 - K_r \tau,$$

де μ_0 - вільна електрофоретична рухомість, а константа K_r називається коефіцієнтом сповільнення, залежить від властивостей геля, розмірів і форми молекул, що рухаються.

Нижче наведено концентрації агарози в гелі, які використовуються для розділення молекул ДНК різного розміру (табл. 1).

Таблиця 1. Агарозні гелі різної концентрації для розділення фрагментів ДНК певного розміру.

Концентрація агарози в гелі (%)	Область розмірів лінійних молекул ДНК (т.п.н.), що ефективно розділяються
0,3	60 - 5
0,6	20 - 1
0,7	10 - 0,8
0,9	7 - 0,5
1,2	6 - 0,4
1,5	4 - 0,2
2,0	3 - 0,1

Розділення в агарозних гелях відбувається швидко, але з обмеженою роздільною здатністю, так як смуги, що утворюються в агарозних гелях, мають тенденцію розмиватися/дифундувати та поширюватися в боки. Це є результатом великого розміру пор і не може бути попереджено методологічно.

Конформація нуклеїнових кислот. Лінійні молекули ДНК одного розміру рухаються в гелі з однаковою швидкістю. Молекули ДНК, які мають однакову молекулярну масу, але різні конформації, наприклад, кільцеву інтактну (форма I), кільцеву з одноланцюговим розривом (форма II) і лінійну (форма III), рухаються в агарозному гелі з різними швидкостями [Thorne, 1966, 1967]. Відносна рухомість трьох зазначених форм ДНК залежать від концентрації агарози в гелі, сили струму, іонної сили буферного розчину та щільності суперспіральних витків у форми I. За одних умов форма I рухається швидше, за інших – повільніше порівняно з формою III (зокрема, це означає, що не можна користуватися лінійним маркером для оцінки розміру кільцевих молекул). Щоб однозначно визначити конформацію ДНК проводять електрофоретичне розділення в присутності зростаючих концентрацій бромистого етидію. Зі зростанням концентрації барвника кількість його молекул, зв'язаних із ДНК, зростає. При цьому негативні суперспіральні витки в молекулах форми I поступово зникають, а швидкість руху ДНК у гелі знижується. За певної критичної концентрації молекул барвника (коли в ДНК більше не залишається суперспіральних витків), швидкість руху форми I сягає мінімальних значень. Наступне внесення нових порцій бромистого етидію призводить до утворення позитивних супервитків, у результаті чого рухомість форми I починає зростати. Рухомість форм II та III при збільшенні концентрації барвника знижується, хоча й по-різному, унаслідок нейтралізації зарядів і збільшення жорсткості молекул ДНК під впливом бромистого етидію. Для більшості препаратів ДНК у формі I критична концентрація бромистого етидію в гелі знаходиться в області концентрацій 0,1 - 0,5 мкг/мл.

Таким чином, методом електрофорезу можна фракціоновані різні форми молекул ДНК бактерій: бактеріальна нативна; плазмідні: нікована

(релаксована під час реплікації); лінійна дволанцюгова (розщеплена рестриктазою за одним сайтом кільцева суперспіралізована молекула або також отримана внаслідок певних помилок при лужному лізису (див. далі)); кільцева дволанцюгова; кільцева суперспіралізована (нативна молекула, стабілізована білками, використовується для клонування); кільцева одноланцюгова (рис. 6):

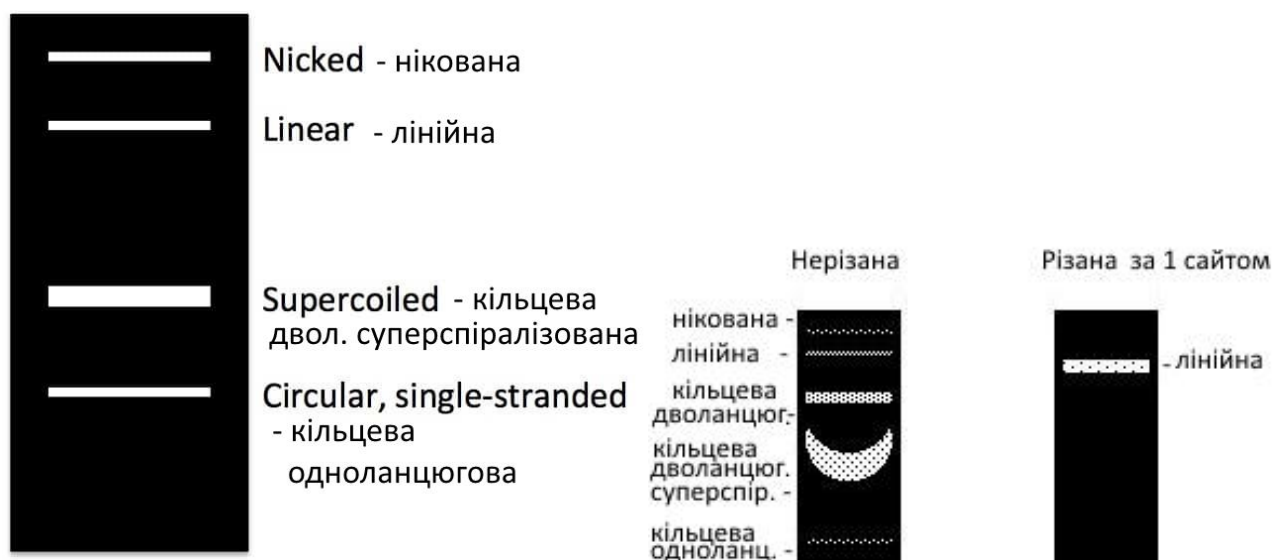


Рис. 6. Електрофореграма розділення різних різних форм молекул ДНК бактерій (до та після рестрикції; 1,8 % агарозний гель; адаптовано з <https://bitesizebio.com/13524/how-to-identify-supercoils-nicks-and-circles-in-plasmid-preps/>; пояснення в тексті).

На сьогодні більшість кювет для проведення горизонтального електрофорезу є модифікацією приладу, запропонованого Шефнером, в якому агарозний гель розміщується на окремій скляній чи пластиковій пластинці (рис. 7).

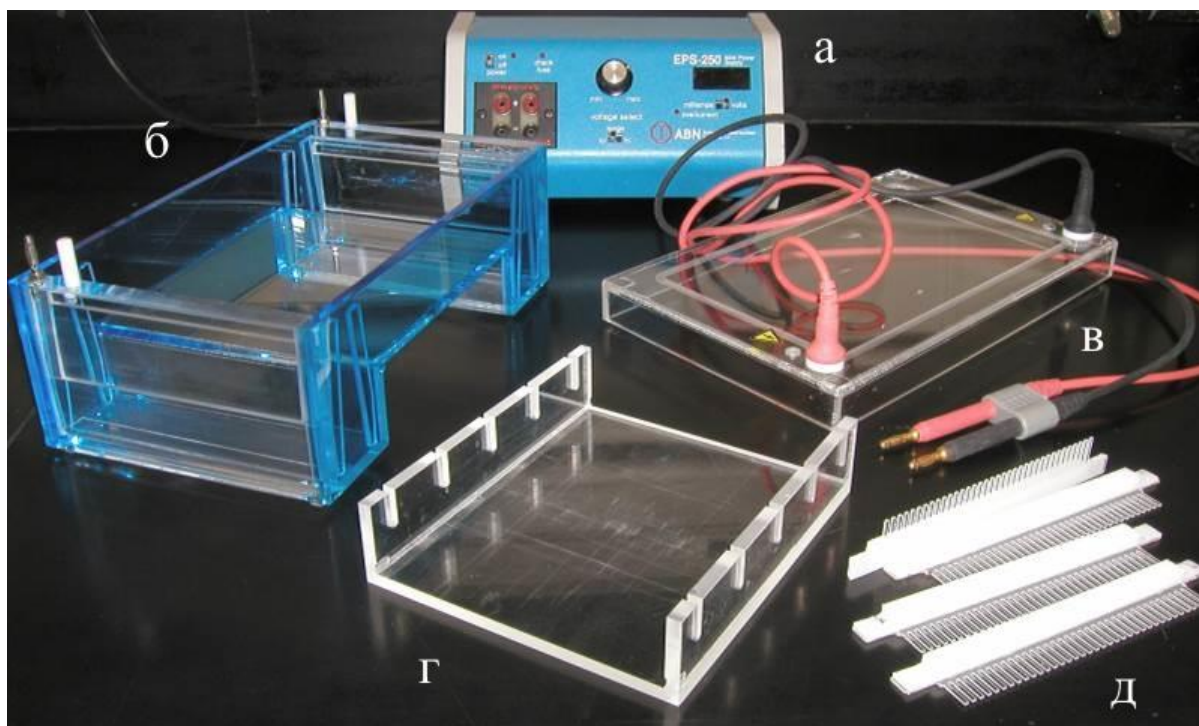


Рис. 7. Прилад та комплектуючі для проведення гель-електрофорезу в агарозному гелі (адаптовано з medicalexprou.com): а – джерело напруги, б – резервуар для пластинки та буферного розчину, в – електроди, г – пластинка для заливання розплавленої агарози, д – гребінки.

Пластинку встановлюють на платформі приладу таким чином, щоб гель знаходився безпосередньо під поверхнею буферного розчину для проведення електрофорезу. Опір геля мало відрізняється від опору буферного розчину для електрофорезу (адже агарозний гель готують за допомогою того буферного розчину, в середовищі якого буде проходити електрофоретичне розділення), тому через гель проходить значна частина струму.

Буферний розчин для електрофорезу. На електрофоретичну рухливість ДНК впливають **склад** та **іонна сила** буферного розчину для електрофорезу. За відсутності іонів електропровідність мінімальна, і переміщення ДНК відбувається повільно, якщо взагалі відбувається. У буферному розчині з високою іонною силою електропровідність дуже ефективна, і утворюється значна кількість тепла. У гіршому випадку, гель розплавляється і ДНК денатурує. Для проведення горизонтального електрофорезу зазвичай

використовують такі **буферні системи**: трис-ацетатну, трис-боратну і трис-фосфатну (рН 7,5-7,8) (табл. 2.).

Таблиця 2. Буферні розчини для проведення гель-електрофорезу.

Буферний розчин	Концентрації речовин у робочому буферному розчині	Концентровані розчини певної кратності (×) - приготування на 1 л
трис-ацетат (ТАЕ)	0,04 М трис-ацетат; 0,002 М ЕДТА; рН 7,5-7,8	(50 ×): 242 г трис; 57,1 мл льодяної оцтової кислоти; 100 мл 0,5 М розчину ЕДТА, рН 8,0.
трис-фосфат (ТФЕ)	0,08 М трис-фосфат; 0,008 М ЕДТА; рН 7,5-7,8	(10×): 108 г трис; 15,5 мл 85 % фосфорної кислоти (1,679 мкг/мл); 40 мл 0,5 М розчину ЕДТА, рН 8,0.
трис-борат (ТБЕ)	0,089 М трис-борат; 0,089 М борна кислота; 0,002 М ЕДТА; рН 7,5-7,8	(5×): 54 г трис; 27,5 г борної кислоти; 20 мл 0,5 М розчину ЕДТА, рН 8,0.

Буферні розчини готують у вигляді вихідних концентрованих розчинів певної кратності та зберігають при кімнатній температурі. Буферна ємність трис-ацетатного буферного розчину порівняно низька і за тривалого багаторазового використання ця буферна система виснажується: анод стає лужним, а катод - кислотним. Тому при роботі з ТАЕ рекомендують частіше проводити заміни буферного розчину. Трис-боратна та трис-фосфатна буферні системи забезпечують добре розділення фрагментів ДНК і характеризуються значно вищою буферною ємністю порівняно з ТАЕ. Буферний розчин має покривати гель не більше ніж на 1 мм (для зниження температурного градієнту вздовж гелю), бо в іншому випадку ДНК, яка зверху лунки, буде переміщатися швидше за ту, що на дні лунки, і після фарбування зразок буде виглядати як

подвоєні смуги (зазначений артефакт може виникати й при не вертикальному закріпленні гребінки та відповідному спотворенні форми лунки).

Буферний розчин для нанесення. Зразки НК, які будуть наноситися на агарозний гель, спочатку змішують із концентрованим буферним розчином для нанесення, зазвичай містить воду, сахарозу й барвник (наприклад, бромфеноловий синій, бромкрезоловий зелений тощо (табл. 3)).

Таблиця 3. Буферні розчини для нанесення проб ДНК.

Тип буферного розчину	Концентрації речовин у концентрованому 6-ти кратному розчині	Температура зберігання
I	0,25% бромфенолового синього; 0,25% ксилолціанолу; 40% (вага/об'єм) сахарози; H ₂ O dist	+ 4° C
II	0,25% бромфенолового синього; 0,25% ксилолціанолу; 15% (об'єм/об'єм) фіколу (тип 400); H ₂ O dist	Кімнатна
III	0,25% бромфенолового синього; 0,25% ксилолціанолу; 30% (об'єм/об'єм) гліцерину; H ₂ O dist	+ 4° C
IV	0,25% бромфенолового синього; 40% (вага/об'єм) сахарози; H ₂ O dist	+ 4° C

Максимальна кількість НК, яка може бути нанесена, залежить від числа фрагментів. Мінімальна кількість ДНК, яка може бути виявлена на знімках гелю, пофарбованого бромистим етидієм, становить близько 1 - 2 нг у смугі, шириною 0,5 см. Якщо в смугі такої ширини знаходиться більше 500 нг ДНК, доріжка буде перевантаженою, що призведе до розмивання смуги. Буферний розчин для нанесення використовується для таких цілей: 1) збільшення щільності зразка для забезпечення попадання НК у лунку; 2) додавання барвника до зразка, щоб полегшити процес нанесення (рис. 8);

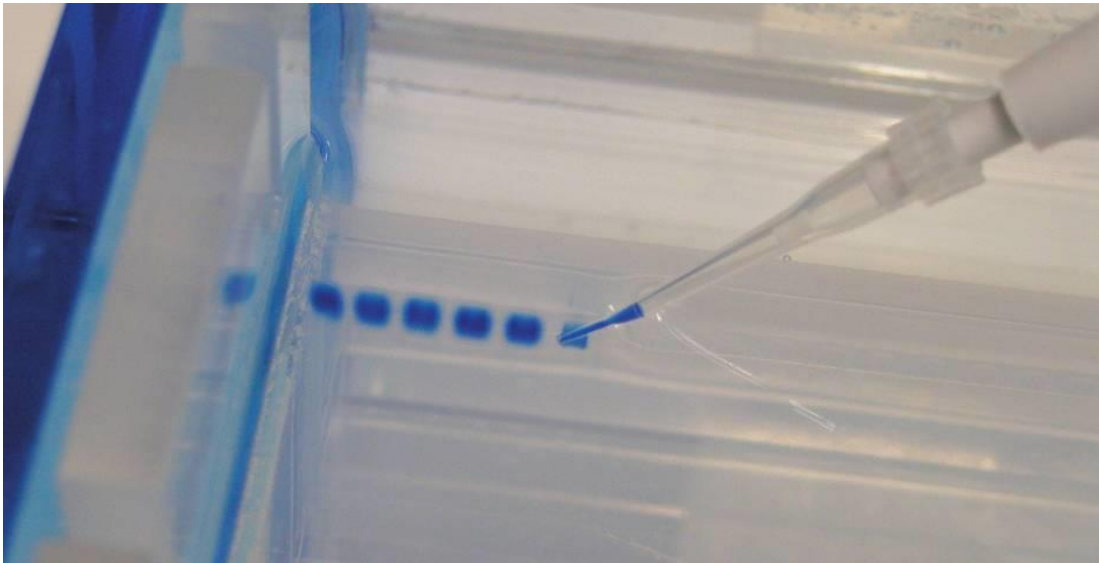


Рис. 8. Додавання барвника до зразка НК, щоб полегшити процес нанесення тощо для проведення гель-електрофорезу в агарозному гелі

3) додавання до зразка такого барвника, який в електричному полі буде рухатися в бік анода на передбачувану відстань (табл. 4).

Таблиця 4. Рухливість барвників у гелях із різною концентрацією агарози.

Гель, %	Рухливість барвників			
	Ксилолціанол ¹⁾	Крезоловий червоний ¹⁾	Бромфеноловий синій ¹⁾	OrangeG ¹⁾
0,7	~ 10,5 (9 – 15)	~ 3,8 (3,2 – 4,5)	~ 0,8 (0,7 – 1,2)	~ 0,15 (0,1 – 0,2)
0,8	~ 8 (7 – 9)	~ 2,9 (2,7 – 3,2)	~ 0,5 (0,4 – 0,6)	< 0,25
1	~ 6 (4,8 – 7)	~ 2,2 (2 – 2,5)	~ 0,5 (0,4 – 0,6)	< 0,25
1,5	~ 2,2 (1,8 – 2,6)	~ 1,0 (0,9 – 1,3)	~ 0,25	<< 0,25
2	~ 0,75 (0,6 – 0,9)	~ 0,35 (0,3 – 0,4)	< 0,25	<< 0,25

Примітка: ¹⁾ числа позначають приблизні розміри фрагментів ДНК (т.п.н.), разом з якими рухається барвник.

Маркерна НК. При заданій напрузі, концентрації агарозного гелю та буферного розчину відстань переміщення залежить від молекулярної маси вихідного матеріалу. Тому, маркерна НК (для РНК - під час електрофорезу в денатуруючих умовах, наприклад, у формальдегідному гелі) відомого розміру повинна наноситися на доріжки як із лівого, так і з правого краю гелю. Маркер зазвичай містить певний набір відомих сегментів ДНК, які полегшують визначення розміру досліджуваної ДНК, якщо будь-яке систематичне викривлення гелю виникає під час електрофорезу.

Показник напруги електричного поля. За низьких значень напруги швидкість переміщення лінійних фрагментів ДНК пропорційна напрузі. Однак, зі збільшенням напруги електричного поля рухливість фрагментів ДНК із високою молекулярною масою зростає диференційно. Відповідно, зі зростанням напруги зона ефективного розділення ДНК в агарозному гелі знижується.

На швидкість руху заряджених молекул ДНК в гелі впливає **напруженість електричного поля**, що визначається напругою постійного електричного поля, що подається на електроди (градієнт потенціалу при певній напрузі до довжини між електродами). Максимальна ефективність розділення фрагментів ДНК спостерігається при напруженості (рис. 9), яка не перевищує 5 В/см довжини гелю (для високоякісних або препаративних фореziv: ~ 2 В/см (до ~ 5 В/см), для аналітичних електрофореziv прийнятна якість зберігається до ~ 6 В/см (за іншими вченими [29], до $\sim 10 - 15$ В/см).

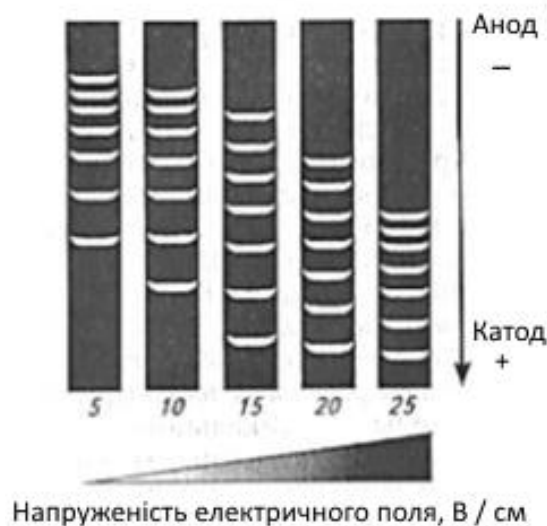


Рис. 9. Швидкість руху лінійних молекул ДНК залежно від величини напруженості електричного поля. Світлі зони - мігруючі в гелі молекули ДНК різного розміру (адаптовано з [29]).

Вміст азотистих основ і температура. Електрофоретична рухливість ДНК в агарозних гелях (на відміну від ПААГ [Allet et al, 1973]) слабо залежить від складу азотистих основ ДНК [Thomas, Davis, 1982]. В агарозних гелях в області температур від + 4 до + 30 °С зміни відносної електрофоретичної рухомості фрагментів ДНК різного розміру не спостерігаються. Зазвичай, електрофоретичне розділення фрагментів ДНК проводять при кімнатній температурі. Однак, слід зазначити, що гелі, які містять менше 0,5 % агарози, дуже м'які - тому з такими гелями краще працювати при температурі + 4° С.

Найбільш зручним і відносно дешевим методом візуалізації ДНК в агарозних гелях є її забарвлення **флуоресціюючим барвником бромистим етидієм** (3,8-діаміно-5-етил-6-фенілфенантрідіум бромід, EtBr, Ethidium bromide).

Молекула бромистого етидію містить плоску циклічну групу, яка може інтеркалювати між сусідніми азотистими основами НК, розкручує супервитки, деформуючи ДНК, тому бромистий етидій є сильним мутагеном (також вважається канцерогеном і тератогеном) (рис. 10.).

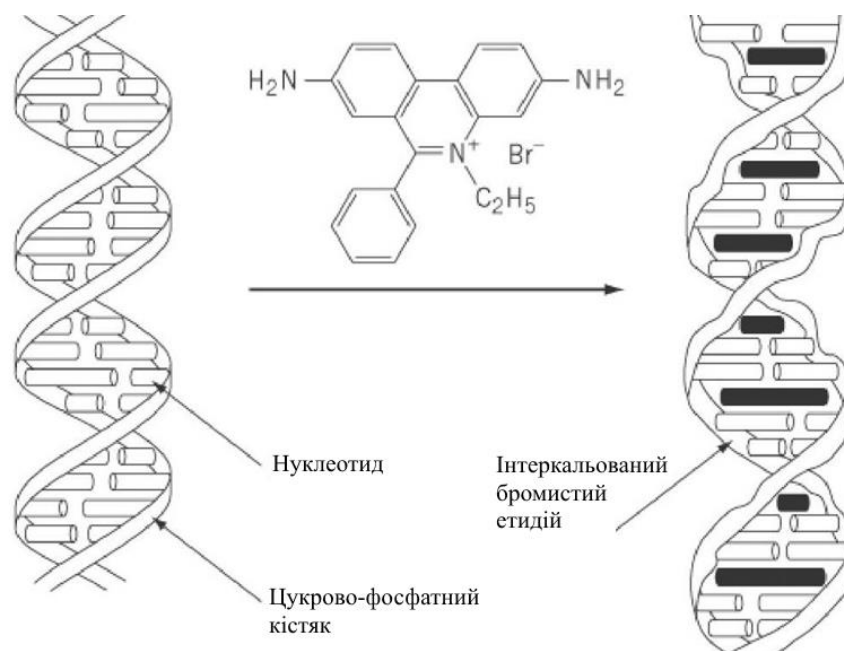


Рис. 10. Схема інтеркаляції бромистого етидію в ДНК (адаптовано з explorer.bio-rad.com). Пояснення в тексті

У результаті такої інтеркаляції інтенсивність флуоресценції бромистого етидію підвищується. Енергія УФ-випромінювання, яка поглинається ДНК в області 260 нм, передається на барвник (або ж випромінювання, що поглинає сам барвник при довжинах хвиль 300 і 360 нм), після чого барвник флуоресцює променями червоно-помаранчевої області видимого спектру (590 нм).

Бромистий етидій можна використовувати для виявлення як дво-, так і одноланцюгових молекул НК (ДНК і РНК). Однак, спорідненість барвника до одноланцюгових НК є значно нижчою, і, відповідно, флуоресценція слабшою. Бромистий етидій можна вносити безпосередньо в гель (робоча концентрація 0,5 мкг/мл; так як молекули барвника рухаються до катода, при великій напрузі вони можуть швидко вийти з геля, який потрібно буде фарбувати після електрофорезу). Також, в його присутності електрофоретична рухливість лінійних двохланцюгових молекул ДНК знижується приблизно на 15 %. Можна проводити електрофоретичне розділення і за відсутності бромистого етидію і фарбувати гель після електрофорезу. У цьому випадку гель поміщають у H_2O dist (робоча концентрація 10 - 20 мкг/мл), що містять бромистий етидій, на 15 -

20 хв за кімнатної температури. Знебарвлення при цьому не потрібно, але при виявленні малих кількостей ДНК (менше 10 нг) краще знизити фонову флуоресценцію (обумовлену незв'язаним барвником), витримуючи гелі в 1 мМ розчині MgSO_4 протягом 1 години при кімнатній температурі [Maniatis et al, 1982] або в проточній H_2O протягом 10 – 15 хв. Далі гелі поміщають на транслюмінатор із довжиною хвилі 254 нм та фотографують в УФ – світлі. При фотографуванні гелів в УФ – світлі краще використовувати жовтогарячий світлофільтр.

Крім бромистого етидія застосовують й **інші барвники**: DAPI (4,6-діамідино-2-феніліндол 2 HCl), акридіновий жовтий, метиленовий синій, нітрат срібла тощо. Кожен із них володіє своїми перевагами (відносно недорогі, менш токсичні, не потребують УФ-світла, утилізація небезпечних відходів відсутня тощо) та недоліками (дорожчі, менш чутливі, потрібна більша кількість ДНК, довший час фарбування/відмивання тощо). Порівняно недавно на ринку з'явилися нові барвники, наприклад, GelGreen™ та GelRed™ («Biotium, Inc.», США). GelRed™ є чутливим (більш ніж бромистий етидій), стабільним і безпечним для навколишнього середовища флуоресцентним барвником для НК, створеним на заміну високотоксичного бромистого етидія для фарбування дво-, одноланцюгової ДНК або РНК в агарозному гелі та ПААГ. GelRed™ і бромистий етидій мають фактично однаковий спектр, тому можна просто замінити барвники, не змінюючи наявну систему детекції. Флуоресцентний барвник runSAFE («Cleaver Scientific Ltd.», Велика Британія) потребує синього світла і є, як стверджують винахідники, цілком безпечним у використанні.

Більш дорожчим та одним із найбільш чутливих барвників, які застосовують для детекції дволанцюгових молекул ДНК (ДНК-РНК дуплексів) при електрофорезі в агарозних і поліакриламідних гелях, є SYBR Green I. Для цього його додають до агарозного геля чи ПААГ безпосередньо перед їх заливанням, або після електрофорезу (бажано при мінімальному доступі світла). Чутливість цього барвника приблизно в 25 разів вище в порівнянні з бромистим етидієм. При використанні транслюмінатора з довжиною хвилі 300

нм, за допомогою SYBR Green I, можна детектувати 60 пг дволанцюгової ДНК (рис. 11).

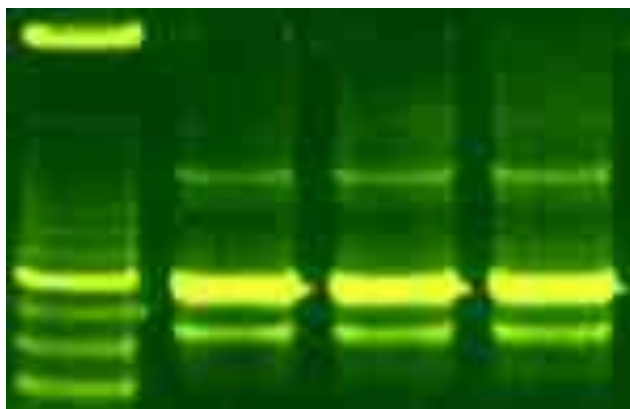


Рис. 11. Електрофореграма розділення різних зразків виділеної плазмиди *pUC19* (1,8 % агарозний гель, пофарбований SYBR Green I).

Висока чутливість SYBR Green I пояснюється унікальними характеристиками цього барвника: високою афінністю до ДНК, і сильному – більш ніж у 10 разів у порівнянні з бромистим етидієм, збільшенням флуорисценції при зв'язуванні з ДНК. При цьому квантовий вихід комплексу ДНК - SYBR Green I (близько 0,8) більш ніж в 5 разів вище, ніж у комплексі ДНК – бромистий етидій (близько 0,15). Максимум поглинання SYBR Green I спостерігається при 497 нм. Максимум емісії флуорисценції барвника, зв'язаного з ДНК, - 520 нм. Крім головного, у спектрі барвника є два невеликих додаткових максимуму поглинання - при 290 нм і 380 нм. Такі спектральні характеристики дозволяють детектувати барвник різними приладами – від ультрафіолетових транслюмінаторів і ламп до лазерів із довжиною хвилі в районі 500 нм (синє світло).

Незважаючи на те, що мутагенна активність SYBR Green I є значно нижча, ніж бромистого етидію [Singer et al., 1999], працювати з барвником необхідно в рукавичках із дотриманням всіх суворих правил роботи з небезпечними мутагенними речовинами. SYBR Green II використовують для візуалізації РНК, тоді як SYBR Green Gold - для одно- та дволанцюгових молекул НК.

Кількісну та якісну оцінку препарату виділеної НК у першому наближенні визначають при гель-електрофорезі, як правило, відразу за процедурою виділення. Для цього візуально порівнюють на сусідніх доріжках гелю інтенсивність світіння в ультрафіолеті отриманого зразка зі зразками відомої концентрації.

Електрофорез в агарозі може бути використаний як препаративний метод для виділення ДНК. Так, смуги ДНК, які цікавлять, можна вирізати з гелю та виділити ДНК: електроелекцією (електрофоретичне перенесення фрагментів ДНК у комірки, нарізані в гелі, чи на діалізні мембрани); або розм'ягченням шматочка гелю в буферному розчині з подальшим центрифугуванням та збиранням супернатанту (якщо використовується легкоплавка агароза - розплавленням шматочка гелю і розведенням його буферним розчином). У кожному випадку ДНК вилучають із супернатанта за допомогою переосадження з етанолом.

Електрофорез у пульсуючому електричному полі або **пульс-електрофорез** – це модифікація гель-електрофорезу в агарозному гелі. З його допомогою вдається розділяти дуже великі, можна сказати величезні молекули ДНК. Звичайний гель-електрофорез не дозволяє розділити такі молекули через сталість електричного поля, яке надає молекулам змієподібну конфігурацію. Молекули, які володіють такою конфігурацією, рухаються в гелях із постійною швидкістю незалежно від довжини молекул. Якщо ж напрямок електричного поля буде часто змінюватися, швидкість руху молекул буде визначатися їхньою здатністю переорієнтуватися відповідно цих змін. Такий процес у великих молекул займає значно більше часу, внаслідок чого вони будуть відставати. На гелях після пульс-електрофорезу цілі хромосоми бактерій або дріжджів виявляються у вигляді окремих смуг, і тому можна легко визначити хромосомні перебудови.

Поліакриламідні гелі використовують для аналізу й виділення фрагментів ДНК, довжиною менше ніж 100 п.н. [Maniatis et al, 1975]. Також

практично всі електрофоретичні аналізи білків та пептидів проводять у ПААГ. Цей гель складається з двох мономерних компонентів:

1. акриламід - $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$,
2. NN'-метиленабісакриламід - $(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH})_2-\text{CH}_2$.

Акриламід – високотоксична речовина, працювати з ним потрібно в рукавичках та захисній масці. Акриламід під дією ініціаторів полімеризації (наприклад, персульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) та TEMED) утворює лінійні полімери, а NN'-метиленабісакриламід використовується для «зшивання» лінійних полімерів акриламідів. Застосування цього матеріалу дозволило отримувати більш контрольовані, ніж у гелі з інших матеріалів, розміри пор (рис. 12).

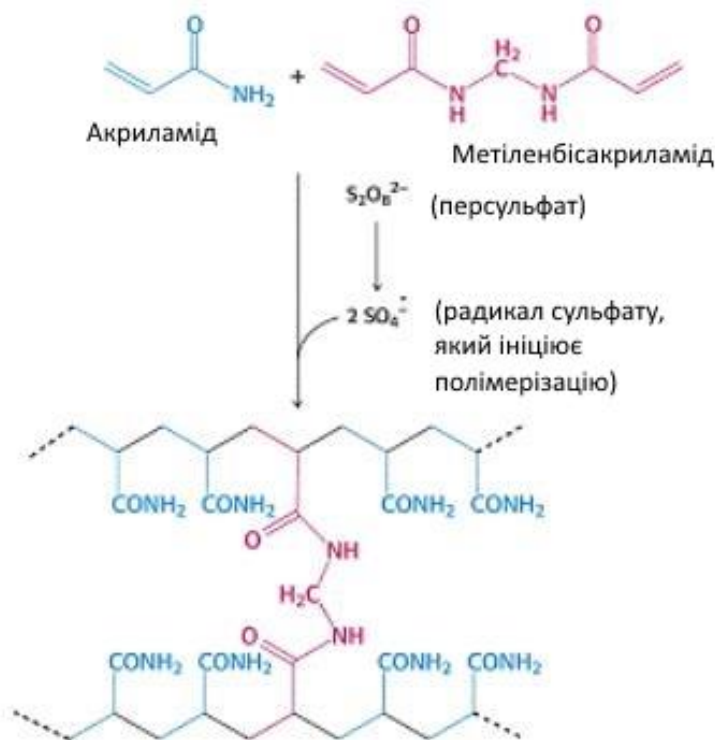


Рис. 12. Схема полімеризації ПААГ (адаптовано з explorer.bio-rad.com).

Пояснення в тексті

Склад буферних розчинів, які використовуються для електрофорезу білків, не впливає на процес полімеризації акриламід. Природа, концентрація та рН буферного розчину визначаються особливостями самого процесу електрофорезу. Полімеризації ПААГ не заважає також присутність сечовини (навіть у високих концентраціях), гуанідин хлориду, формаміду, сахарози або інших детергентів, як ДСН, Тритон Х-100, цетавлон. Сахароза навіть сприяє полімеризації та покращує механічні властивості гелю.

Розміри пор варіюють концентрацією метиленбісакриламід. Зазвичай використовують 3,5 - 20 % ПААГ (табл. 5).

Таблиця 5. Поліакриламідні гелі різної концентрації для розділення фрагментів ДНК певного розміру.

Концентрація акриламід у гелі (%)	Область розмірів лінійних молекул ДНК (п.н.), які ефективно розділяються
3,5	100 - 1000
5	80 - 500
8	60 - 400
12	40 - 200
20	10 – 100

Для характеристики ПААГ необхідно вказувати відсотковий вміст мономерів (Т) і кількість агента, що зшиває, у відсотках від загальної кількості мономерів (С):

$$T, \% = (\text{акриламід, г} + \text{біс-акриламід, г}) \times 100\% / \text{загальний об'єм, мл}$$

$$C, \% = (\text{акриламід, г}) \times 100\% / (\text{акриламід, г} + \text{біс-акриламід, г}).$$

Співвідношення між кількістю агента, який зшиває, і акриламідом дуже важливе, оскільки воно істотно впливає на механічні та фізичні властивості гелю. Було встановлено, що чим вища концентрація акриламід, тим нижчою повинна бути концентрація бісакриламід, і навпаки. Одночасне збільшення

вмісту обох компонентів призводить до утворення гелів із підвищеною жорсткістю і крихкістю, а одночасне зниження – до зростання м'якості й еластичності.

Поліакриламідні гелі заливають між двома скляними пластинками. При цьому основна частина поліакриламіду не контактує з повітрям, і полімеризація пригнічується лише у вузькому шарі по краях геля. Розділення в ПААГ проводять лише вертикально (рис. 13).

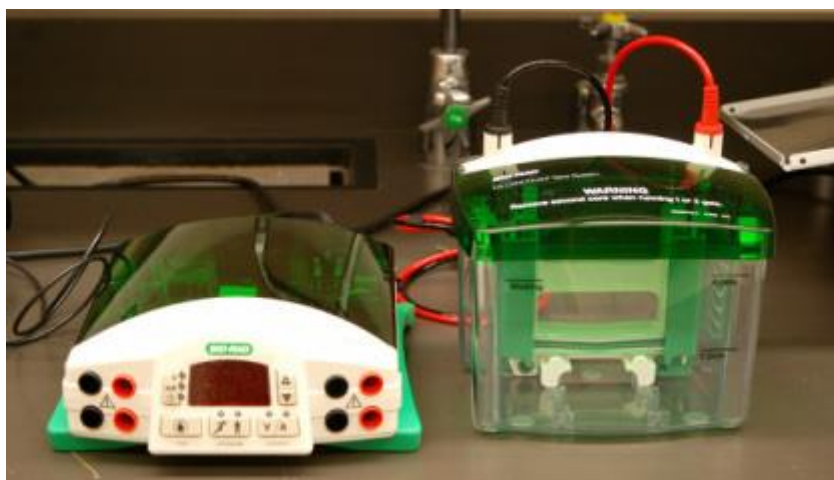


Рис. 13. Прилад та комплектуючі для проведення гель-електрофорезу в поліакриламідному гелі (запозичено з saludeslab.org)

При аналізі ДНК у поліакриламідному гелі використовують зазначені вище буферні розчини, розчини для нанесення проб ДНК і проводять візуалізацію за допомогою бромистого етидію тощо, як і при проведенні гель-електрофорезу в агарозі (табл. 6).

Таблиця 6. Рухливість барвників-маркерів у поліакриламідних гелях.

Гель, %	Рухливість барвників	
	Бромфеноловий синій ¹⁾	Ксилолціанол ¹⁾
3,5	100	460

5	64	260
8	45	160
12	20	70
20	12	45

Примітка: ¹числа позначають приблизні розміри фрагментів ДНК (п.н.), разом з якими рухається барвник

Електрофорез із розділенням ранцюгів. У ряді випадків (наприклад, при сиквенуванні за Максамом - Гілбертом, при приготуванні зондів чи гібридизації з РНК, яка представлена малою кількістю копій) необхідно розділити ДНК на окремі ланцюги. Часто це можна зробити шляхом електорофорезу денатурованої ДНК у поліакриламідному гелі (фрагменти ДНК менше 1 т.п.н. [Szalay et al, 1977; Maxam, Gilbert, 1980], нейтральному агарозному гелі (більші фрагменти ДНК [Hayward, 1972; Dunn, Sambrook, 1980])); чи в денатуруючому ПААГ (із 8 М сечовиною).

У ході електрофорезу зони розчиненого білка залишаються невидимими. Для спостереження за процесом у вихідний препарат додають **барвник** («лідуючий барвник»), молекули якого несуть заряд того ж знака, що і молекули білка, але не взаємодіють із ним. Швидкість міграції барвника трохи вища за швидкість усіх білків, тому коли забарвлена зона («фронт електрофоретичного руху») доходить до кінця гелю, електрофорез припиняють.

Електрофоретичну пластинку після поділу на ній білкових молекул фіксують у суміші ізопропанол / оцтова кислота / етанол для запобігання процесу дифузії. Після фіксації проводять фарбування білкових смуг. Барвники мають різний ступінь чутливості, і забарвлення смуг відбувається пропорційно кількості білка в зоні. В якості барвників найчастіше використовують кумасі

синій (G-250, R-250). Він досить простий і зручний в роботі, має чутливість до 100 нг на білкову смугу (рис. 14).

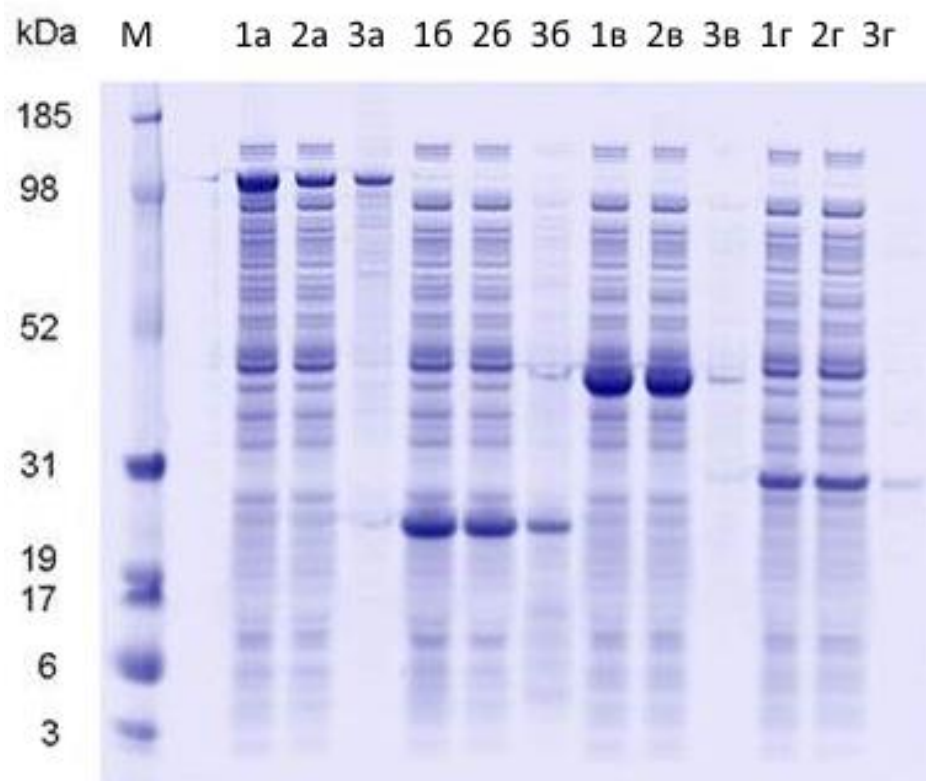


Рис. 14. Електрофореграма розділення фракцій білків із гомогенатів органів різних особин щурів: а – печінка; б – підшлункова залоза; в – дванадцятипала кишка; г – нирки; М – маркер молекулярної маси; 1 – 3 – різні особини щурів

Також в якості фарбуючих агентів застосовують нітрат срібла, флуоресцентні барвники. Вони мають значно вищу чутливість у порівнянні з кумасі, але робота з ними вимагає або чіткого дотримання всіх процедур протоколу забарвлення, який дуже чутливий до якості реактивів, або додаткового обладнання для детекції забарвлених зон (у випадку з флуоресцентними барвниками).

Після процедури фарбування слід відмити гель від надлишку барвника. При використанні кумасі ця процедура полягає в інкубуванні гелю в 9 %-му розчині оцтової кислоти, нагрітої до 75 - 90 °С. При використанні інших барвників протокол відмивання гелю може сильно варіювати.

Серед усього розмаїття методів електрофоретичного розділення білків із використанням ПААГ виділяють наступні основні методики: **нативний електрофорез у поліакриламідному гелі, ступінчастий (перервний) електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (Disc-electrophoresis)** тощо.

Електрофорез у поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах за Леммлі (ДСН-електрофорез / SDS-PAGE), дозволяє провести розділення білкових сумішей за молекулярною масою, оскільки для денатурації білкових молекул використовується суміш меркаптоетанола та ДСН, останній (за рахунок гідрофобних взаємодій детергент у трикратному надлишку приблизно однаково зв'язується з більшістю білків у співвідношенні 1,4 мг ДСН на 1 мг білка (2 молекули ДСН на 1 білкову молекулу)) надає білкам рівномірного негативного заряду, перевищуючи власний заряд білка, і вкриває їх своєрідною «шубою» з негативних зарядів, внаслідок чого розділення відбувається на основі відмінності в розмірах (молекулярній масі) білків (рис.15).

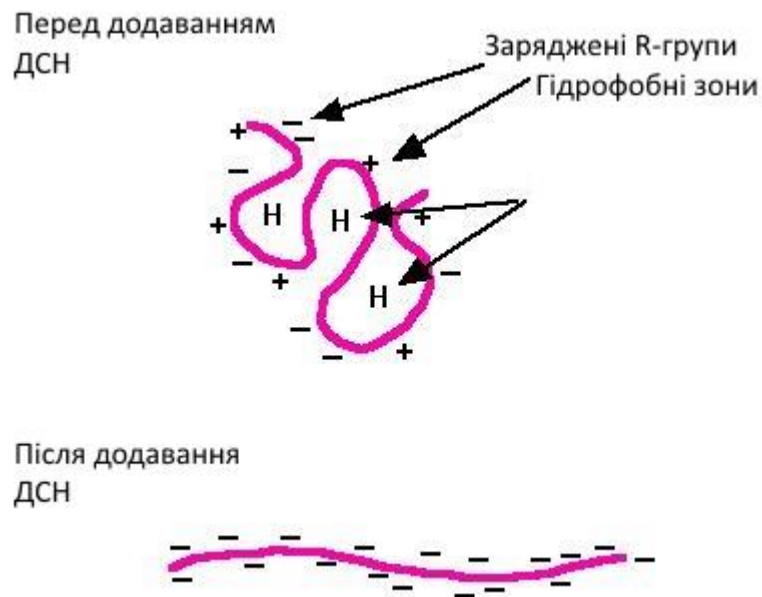


Рис. 15. Схема денатурації білкової молекули при дії ДСН (адаптовано з explorer.bio-rad.com). Пояснення в тексті

При необхідності білки, що містять **дисульфідні містки**, попередньо обробляють β -меркаптоетанолом або— дітіотреїтолом (ДТТ), щоб зруйнувати **всі S-S-зв'язки**. У результаті цієї маніпуляції можна отримати суміш ланцюгів певного білка, молекулярні маси яких можна виявити при електрофоретичному розділенні.

Диск-електрофорез (від англ. Discontinuous – перервний) – популярна модифікація електрофорезу в денатуруючих умовах, назва якої пов'язана з переривання руху молекул на межі між двома гелями – **концентруючим** (крупнопористим) та **розділяючим** (розподільчим, дрібнопористим). Використання двох гелів обумовлене підвищенням ефективності та роздільної здатності методу. Так, використання концентруючого гелю дає можливість ефективного поділу білків в діапазоні молекулярних мас від 1 до 400 кДа, без застосування спеціальних методичних прийомів.

Значення рН в даній системі відіграють дуже важливу роль і повинні вибиратися з урахуванням таких вимог: 1) у концентруючому гелі білки повинні концентруватися в результаті ізоахофорезу, тобто, всі заряджені

компоненти рухаються в електричному полі з однаковими (ізо) швидкостями (тако). При тих значеннях рН, які мають ці гелі, буферний (закриваючий) іон, що знаходиться в електродних судинах, повинен мати **найменшу** електрофоретичну рухливість. 2) розподільчий гель повинен мати такий **рН**, щоб рухливість закриваючого іона в ньому була вищою, ніж рухливість будь-якого іншого компонента проби. У цьому випадку закриваючий іон буде рухатися попереду білків. **Недоліком цієї системи** є те, що в процесі ізотахофореzu білки можуть досягати такої високої концентрації, що це викликає їх осадження. Крім того, деякі білки нестабільні в зоні рН, що використовується для їх дослідження цим методом.

Можливість варіювати щільність ПААГ у рамках цієї системи, змінюючи відсоток поліакриламідну під час формування пластини, дає максимально ефективний поділ білкових смуг у необхідному для конкретного білкового препарату діапазоні молекулярних мас. Електрофорез за Лемлі відрізняється застосуванням трис-гліцинової системи у якості буферної (**рН** якої наближається до 9,8), що також є значною перевагою зазначеного методу.

На сьогодні на ринку представлені **біоаналізатори**, які автоматично, за допомогою двох типів досліджень (електрофорез на готових чіпах із гелем, і проточна цитомерія) надають інформацію про розмір, кількість та якість (наприклад, значення цілісності РНК – RIN) зразків ДНК, РНК, білків або клітин, що дозволяє отримувати інформацію високої якості в цифровому вигляді.

У розділі висвітлено принцип гель-електрофорезу в агарозному та поліакриламідному гелях; описано призначення складових буферних розчинів тощо, методики фарбування; охарактеризовано головні параметри, які впливають на швидкість міграції молекул в гелі; надано загальні відомості про види електрофорезу НК та білків.

Контрольні запитання:

1) Назвіть та охарактеризуйте 5 головних параметрів, які впливають на швидкість міграції нуклеїнових кислот в агарозному гелі.

- 2) Поясніть призначення складових буферних розчинів для нанесення проб НК і буферних розчинів для проведення горизонтального електрофорезу.
- 3) Як можна візуалізувати НК в агарозному гелі після гель-електрофорезу?
- 4) Назвіть та охарактеризуйте види електрофорезу НК та білків.
- 5) Навіщо у вихідний препарат додають «лідуючий барвник» при розділенні білкових молекул?
- 6) Коротко охарактеризуйте метод ступінчастого (перервного) електрофорезу в ПААГ із використанням ДСН.
- 7) Що таке нативний електрофорез в поліакриламідному гелі? Надайте коротку характеристику.
- 8) Опишіть процедуру фарбування електрофоретичної пластинки після поділу на ній білкових молекул.

Спектрофотометрія нуклеїнових кислот

Спектрофотометрія (абсорбційна) – фізико-хімічний метод дослідження розчинів і твердих речовин, заснований на вивченні спектрів поглинання в ультрафіолетовій (200 - 400 нм), видимій (400 - 760 нм) та інфрачервоній (> 760 нм) областях спектра. Метод визначення концентрації НК кислот у розчині заснований на існуванні в пуринів і особливо піримідинів максимуму поглинання в ультрафіолетовому світлі при довжині хвилі 260 нм. За законом Бугера-Ламберта-Бера, кількість енергії, поглинута за певної довжини хвилі, є функцією від концентрації поглинаючого матеріалу:

$$I = I_0 \times 10^{-\varepsilon dc},$$

де:

I - інтенсивність світла, яке пропускається,

I_0 – інтенсивність падаючого світла,

ε – коефіцієнт молярної екстинції (відомий як молярний коефіцієнт поглинання),

d (інколи l) – довжина оптичного шляху (у см),

c – концентрація поглинаючого матеріалу (моль/л).

ε чисельно дорівнює поглинанню 1 М розчину при довжині оптичного шляху в 1 см і тому виражений в $M^{-1}cm^{-1}$. Значення поглинання отримують за допомогою УФ-спектрофотометра і, як правило, представляють як абсорбцію (absorbance) A ($\log I/I_0$). Коли довжина оптичного шляху $D = 1$ см, A називають оптичною густиною – **OD** (optical density) при певній довжині хвилі світла – λ .

$$OD_{\lambda} = \varepsilon \times c$$

У розчинах НК максимальна фотометрична абсорбція спостерігається за 260 нм і прямо корелює з концентрацією ДНК або РНК. Вона позначається A_{260} або **OD**₂₆₀. Коефіцієнт молярної екстинції НК – це сума молярних коефіцієнтів поглинання кожного з нуклеотидів. Значення ε зменшується від вільних азотистих основ до дволанцюгової ДНК за рахунок стекінг-взаємодії. Для великих молекул застосовують середній коефіцієнт екстинції. Так, для

дволанцюгової ДНК середній коефіцієнт молярної екстинції - $50 \text{ (мкг/мл)}^{-1}\text{см}^{-1}$, для одноланцюгової ДНК – $33 \text{ (мкг/мл)}^{-1}\text{см}^{-1}$, для РНК – $40 \text{ (мкг/мл)}^{-1}\text{см}^{-1}$. Отже, розраховується концентрація НК в пробі на основі поглинання таким чином: **$OD_{260} = 1$ відповідає 50 мкг/мл дволанцюгової ДНК і 40 мкг/мл РНК.**

Зокрема, краще вимірювати абсорбцію не лише при 260 нм, але й за інших довжин хвиль задля отримання інформації стосовно чистоти досліджуваного препарату НК. Так, значення, отримані при **OD_{330} : $OD_{260} - OD_{330}$** , свідчать про розсіювання світла і присутність твердих частинок у препараті НК. Так як чисті НК мають **$OD_{330} = 0$** , це дозволяє компенсувати (у першому наближенні) внесок домішок і зробити відповідні поправки.

Також при визначенні концентрації ДНК і РНК слід звертати увагу на ті компоненти розчину, які здатні поглинати ультрафіолетове світло: залишки NaI (після виділення ДНК з агарози), детергенти, ЕДТА, трифторацетат цезію тощо. Це особливо актуально, коли як контрольний розчин використовується H_2O .

Класично, співвідношення величини **OD** , що вимірюють при 260 нм, до величини **OD** , яку отримують при 280 нм (**OD_{260}/OD_{280}**), також свідчить про чистоту НК (чисті препарати ДНК мають співвідношення **OD_{260}/OD_{280}** , що дорівнює приблизно 1,8 – 1,9 та 1,9 – 2 для РНК). У випадку менших значень препарат містить велику кількість домішок білка, адже амінокислоти мають значне поглинання при 280 нм.

OD_{260} стерильної деіонізованої води дорівнює нулю, і цей нуль використовують для встановлення «оптичного нуля» спектрофотометра, робота якого ґрунтується на порівнянні двох потоків світла: один - через розчинник, інший – через речовину, яка в ньому розчинена. Застосування стерильної води пов'язано з тим, що присутність у розчиннику мікрофлори або нуклеаз, може призвести до отримання помилкових результатів вимірювань. Відомо, що вимірювання у воді призводять до відхилень до 14 % і зниження **OD_{260}/OD_{280}** . Також точність вимірювання знижується при занадто великих і малих поглинаннях (концентраціях), як було встановлено емпірично (табл. 7.).

Тому краще вимірювати відношення **OD₂₆₀/OD₂₈₀** у низькосольових буферних розчинах, при нейтральному рН, наприклад, у ТЕ (10 – 100 мМ трис (1мМ ЕДТА, рН 7,4 - 8,0) або 20 мМ Na₃PO₄ та 0,1 М NaCl, рН 7,5 - 9,0, або 100 мМ K₂HPO₄, рН 8,2.

Іншим показником чистоти препарату ДНК або РНК є відношення значень поглинання **OD₂₆₀/OD₂₃₀**. Коли препарат чистий, це співвідношення зазвичай дорівнює 1,8 – 2,2. Менші значення співвідношення **OD₂₆₀/OD₂₃₀** свідчать про забруднення препарату вуглеводами або компонентами, які залишаються після процедури виділення ДНК або РНК, наприклад, фенолом, тіаціанатами тощо.

*Таблиця 7. Точність вимірювання за певних значень **OD₂₆₀***

OD ₂₆₀	Точність:
~ 0,005	~ 18 %
~ 0,01	~ 9 %
0,3 - 0,7	~ 0,3 %
0,1 - 1,0	~ 1,0 %
Більше 2,5	Найменша; потрібне більше розведення

Сучасні спектрофотометри розраховують концентрацію НК автоматично з використанням спеціального програмного забезпечення. На сьогодні існують як звичайні кюветні, так і спектрофотометри для мікрооб'ємів, що дозволяють проводити вимірювання в об'ємах 0,5 - 2,0 мкл. При цьому вимірювання проводиться безпосередньо в краплі рідини, яку наносять на нерухомий модуль приладу («Thermo Scientific™», «NanoDrop™», США). Зверху на краплю опускають рухливий модуль приладу, у результаті чого із зразка формується стовпчик рідини між рухомим і нерухомим модулями. Прилад вимірює поглинання світла в стовпчику зразка.

Також концентрацію НК можна визначити за допомогою **флуориметра**. Принцип дії прилада заснований на вимірюванні флуоресценції барвника типу SYBR, який інтеркалює в ДНК. Перевагами флуоресцентного визначення концентрації НК є більш широкий діапазон концентрацій, всередині яких флуориметр надає достатньо точні результати.

Отже, у розділі описано принцип спектрофотометричного методу визначення концентрації НК у розчині, який засновано на існуванні в пуринів і піримідинів максимуму поглинання в УФ світлі при довжині хвилі 260 нм; надано алгоритм розрахунку концентрація НК в пробі та показників чистоти препарату на основі поглинання.

Контрольні запитання:

- 1) На чому заснований метод визначення концентрації нуклеїнових кислот у розчині?
- 2) Поясніть, коли абсорбція A називається оптичною густиною – **OD**.
- 3) Яким чином розраховується концентрація НК в пробі на основі поглинання?
- 4) Навіщо вимірюють відношення значень поглинання **OD₂₆₀/OD₂₈₀** і **OD₂₆₀/OD₂₃₀**?
- 5) Поясніть принцип роботи сучасних спектрофотометрів.
- 6) Які переваги флуоресцентного визначення концентрації НК?

Основи полімеразної ланцюгової реакції

ПЛР (PCR – polymerase chain reaction) — метод молекулярної біології, завдяки якому *in vitro* забезпечується синтез бажаних фрагментів ДНК (ампліфікація) у препаративних кількостях. На відміну від клонування, ПЛР здійснюється в пробірці і не передбачає використання живих клітин.

На початку 1970-х років Хьелл Клеппе запропонував спосіб ампліфікації ДНК за допомогою пари коротких одноланцюгових молекул ДНК - праймерів. Однак у той час ця ідея залишилася нереалізованою. Відкриття ПЛР Кері Мюллісом (Kary Banks Mullis) у 1983 р. стало однією з найбільш видатних подій в області молекулярної біології та біотехнології за останні десятиліття. А впровадження ПЛР в медицину відкрило новий діагностичний напрям — ДНК-діагностику. За вдосконалення ПЛР Кері Мюлліс разом із Майклом Смітом отримав Нобелівську премію з хімії у 1993 році.

В основі ПЛР лежить механізм, який у природі реалізується під час реплікації ДНК ферментом ДНК-полімеразою: дволанцюгова ДНК розкручується (під дією високих температур), дуплікується і знову закручується. Для протікання цієї реакції (у клітині чи пробірці) потрібно: вихідна молекула ДНК (матриця для реплікації), фермент термостабільна ДНК-залежна-ДНК-полімераза, іони магнію, дезоксирибонуклеотидтрифосфати (дНТФ) і короткі синтетичні одноланцюгові ДНК-затравки (праймери, як правило, два), які комплементарні матричному ланцюгу та обмежують на ньому ділянку, яка буде ампліфікуватися. Якщо всі перераховані компоненти змішати у відповідному буферному розчині, ДНК-полімераза буде синтезувати ДНК із дНТФ, підставляючи їх за принципом комплементарності до матричної молекули ДНК, починаючи від праймера.

Класична ПЛР складається з повторюваних **температурних циклів**, які, у свою чергу, складаються з трьох температурних режимів – кроків (рис. 8): 1) **денатурація** (плавлення, розходження ланцюгів ДНК) – руйнування водневих зв'язків між ланцюгами ДНК (дволанцюгова ДНК перетворюється в одноланцюгову форму при температурі 92 - 96 °С від 10 с до 15 хв); 2)

гібридизація праймерів із ділянками на ДНК («відпал», annealing (англ.), ренатурація); відбувається утворення дволанцюгової ділянки в тій області, де праймери обмежують (фланкують) шуканий фрагмент і комплементарні протилежним ланцюгам ДНК; температура підбирається експериментально (40 - 75 °C)); 3) **елонгація** (добудова ланцюга або полімерізація, синтез, або подовження) - синтез комплементарних ланцюгів ДНК шляхом подовження із 3' кінцевого нуклеотиду праймерів в напрямку 5' → 3' (оптимальна температура роботи термостабільної ДНК-полімерази становить 60 - 75 °C, а час залежить від довжини синтезованого фрагмента).

Ампліфікація дволанцюгових копій ДНК (від декількох сотень до декількох десятків пар нуклеотидів) відбувається експоненційно [Ребриков и др, 2009]. У результаті повторення циклів ПЛР збільшення кількості фрагмента ДНК (ампліфікона чи амплікона), обмеженого праймерами, іде в геометричній прогресії (з основою, близькою до 2). Тобто в ідеальному випадку, напрацювання специфічного фрагмента підкоряється закону 2^n , $P = 2^n$, де P - кількість специфічного продукту, n - число циклів реакції, а 2 - кількість вихідної дволанцюгової ДНК), оскільки раніше синтезовані фрагменти в кожному циклі реакції слугують як матриці для синтезу нових фрагментів (рис. 16). Практично ефективність ПЛР менше 100%, тому в дійсності $P = (1 + E)^n$, де E – середня ефективність циклу.

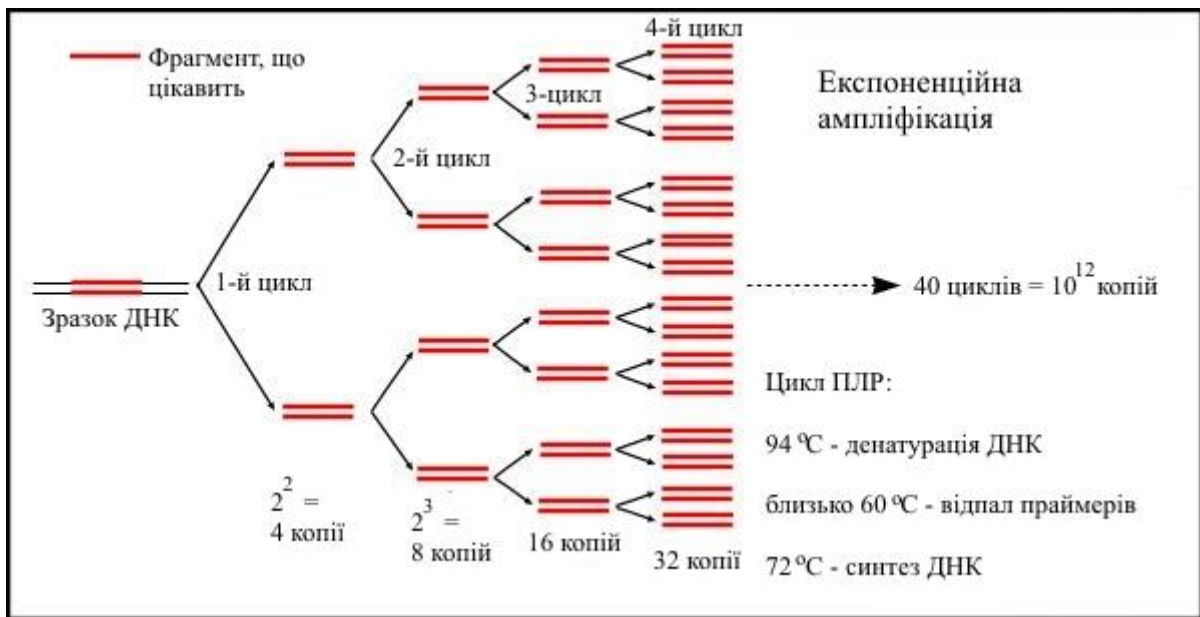


Рис. 16. Принцип експоненційної ампліфікації ДНК у ході ПЛР (адаптовано з <https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>). Пояснення в тексті

Як правило, для отримання достатньої для детекції кількості ДНК залежно від вихідної концентрації матриці та ефективності реакції, необхідно від 20 до 50 циклів ПЛР. У першому й частково в другому циклах утворюються амплікони, які не відповідають межах гена, який ампліфікується (усі амплікони в першому циклі й частина ампліконів у другому циклі виходять більш подовженими в тих ділянках, де ще не відбулося зв'язування другого, що обмежує зростання ланцюга, праймера). Починаючи з третього циклу, довжина ампліконів стає стандартною, тобто відповідає числу пар нуклеотидів ДНК-матриці між 3'-кінцями обох праймерів.

У технічному виконанні ПЛР вимагає великої уваги, акуратності та певних навичок роботи з дозування мікрооб'ємів. Готують реакційну суміш, до складу якої входять вищезазначені компоненти. Пробірку з отриманим розчином поміщають у програмований термостат (термоциклер, ДНК-ампліфікатор - прилад, який може проводити досить швидко охолодження та нагрівання пробірок (зазвичай, із точністю не менше 0,1 °C) за допомогою термоелектричного перетворювача - елементів Пельтьє (ТЕС (від англ.

Thermoelectric Cooler)) і вибирають необхідну програму циклічної зміни температури та тривалості кожного кроку реакції. Загальний об'єм реакційної суміші зазвичай становить від 10 до 100 мкл. Вибір оптимального режиму роботи визначається довжиною ампліфікуємої ділянки ДНК, характеристиками олігонуклеотидних праймерів і властивостями використовуваної ДНК-полімерази. Існують також прилади з автоматичною кришкою та відділенням для мікропланшетів, що дозволяє вбудовувати їх в автоматизовані системи.

Компоненти реакційної суміші ПЛР.

ДНК (кДНК). Для проведення специфічної ампліфікації не потрібно великих кількостей ДНК і, в принципі, достатньо навіть однієї молекули. Джерелом ДНК може бути будь-який біологічний матеріал. У медичній практиці поряд із препаратами цільної крові, використовують висушені на фільтрувальної папері плями крові, невеликі шматочки тканин, змиви порожнини рота, інших слизових поверхонь тощо. ДНК повинна бути добре очищена від білків, ліпідів і розчинена у воді або низькосольову буферному розчині (рН 7,5 – 8,5). Кількість ДНК (кДНК) для проведення ПЛР зазвичай становить 0,1 - 100 пг ДНК у залежності від довжини фрагмента. Для ампліфікації унікальних послідовностей на складних матрицях (геномна ДНК, перший ланцюг кДНК) потрібно 10 - 200 нг ДНК, при цьому ДНК рекомендують прогріти при 65 °С протягом 2 хв і добре перемішати перед додаванням у реакцію.

Праймери. Специфічність методу досягається за рахунок використання штучно синтезованих олігонуклеотидних праймерів довжиною від 15 до 30 основ (оптимально; є виключення), комплементарних унікальним ділянкам нуклеотидної послідовності досліджуваної ДНК. Вибір унікальної ділянки здійснюють при порівняльному аналізі нуклеотидної послідовності досліджуваної ДНК із гомологічними послідовностями. Відстань між обраними унікальними ділянками нуклеотидної послідовності визначає довжину молекули, яка синтезується. Визначення розміру молекули ДНК, що

синтезується, у подальшому використовують для підтвердження специфічності методу.

При підборі оптимальної пари праймерів (прямого й зворотного) зручно використовувати програмне забезпечення, наприклад, «GeneRunner» від «Hastings Software Inc.», «Primer-BLAST», доступний на сайті NCBI, тощо. Основні параметри оптимальних праймерів із точки зору класичної ПЛР:

- 1) довжина 18 - 30 нуклеотидів;
- 2) ГЦ вміст: 30 - 60 %;
- 3) концентрація праймерів: 0,1 – 0,5 мкМ;
- 4) три і більше 3'-нуклеотида не повинні бути комплементарними самому праймеру, праймеру в парі, пробі тощо задля уникнення формування «шпильок» і димерів праймерів;

5) T_m (температура плавлення (melting) - це температура, при якій ланцюги ДНК диссоційовані наполовину) праймерів, які працюють у парі, у більшості випадків має бути подібною, крім певних випадків. Для олігонуклеотидів розміром **15 - 30 основ**, T_m розраховують за формулою:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2(A+T) + 4(G+C), \text{ де}$$

A + T загальна кількість основ аденіну (A) і тиміну (T) в олігонуклеотиді; G + C загальна кількість основ гуаніну (G) і цитозину (C) в олігонуклеотиді;

$$T_m = 69,3 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 650 / l, \text{ - для праймерів більше 20 п.н.,}$$

де l - довжина праймера.

Вищезазначена формула дає приблизне значення $T_m (^{\circ}\text{C})$, із похибкою близько 5 $^{\circ}\text{C}$. Точне значення підбирається емпірично. Бажана температура плавлення праймерів 55 - 65 $^{\circ}\text{C}$, а вміст G + C основ - близько 50 %. Для праймерів із низьким вмістом G + C використовують більш довгі послідовності, щоб підвищити температуру плавлення. У реакцію додають зазвичай 0,2 - 0,5 мкмоль/л кожного праймера. Занадто низька концентрація праймерів може знижувати ефективність ампліфікації, а висока - приводити до неспецифічної ампліфікації.

6) T_a (температура відпалу (annealing temperature, це температура, при якій відбувається гібридизація праймера з матрицею) вибирається в діапазоні 55-70 °C (як правило, $T_a \approx T_m - 5$);

7) Вторинна структура праймерів і цільового фрагмента: зв'язування праймерів із матрицею буде утруднено, якщо в місці зв'язування ланцюг ДНК може утворювати вторинні структури - гомо-, гетеродимери та петлі. У зв'язку з цим необхідно підбирати праймери так, щоб олігонуклеотиди, які складають пару, не містили у своєму складі послідовності з 3-ма і більше нуклеотидами поспіль, комплементарних аналогічній послідовності цього ж (гомодимер) або іншого (гетеродимер) праймера, а також паліндромних послідовностей, які є причиною утворення петель («зажима» - «clamp»). Заздалегідь передбачити вторинну структуру амплікона практично неможливо, тому для його ефективної ампліфікації часто потрібно випробувати не одну, а дві - чотири й більше пар праймерів, поки не буде досягнутий шуканий результат. Використання таких програм, як «Oligo», «Generunner», «Genefisher» «GeneRunner», «Primer-BLAST» тощо, у дизайні праймерів робить вибір умов реакції набагато більш простим. Ці програми дозволяють вибрати послідовності, задавати довжину праймера, розмір продукту, G + C-вміст тощо, а подальший аналіз забезпечує вибір відповідних послідовностей праймерів. Без допомоги біоінформатики сьогодні вибір і дизайн праймерів забирає невинновдано багато часу.

Вільні дезоксинуклеотидтрифосфати (дНТФ). Розчини нуклеотидів дуже чутливі до процедури заморожування - розморожування. Щоб запобігти цьому необхідно розділити вихідний розчин на аліквоти та зберігати їх замороженими при - 20 °C. Сумарна концентрація дНТФ, як правило, становить 200 мкМ. При зростанні концентрації дНТФ у реакційній суміші необхідно збільшити й концентрацію іонів магнію, тому що зниження концентрації вільних катіонів за рахунок зв'язування з нуклеотидами впливає на температуру та специфічність відпалу праймерів. Слід пам'ятати, що надлишок дНТФ призводить до виникнення помилок при синтезі нового ланцюга, а брак

знижує ефективність ПЛР. Чистота препарату дНТФ має критичне значення для ефективності ПЛР.

Реакційний буферний розчин - створює оптимальні умови для роботи термостабільної ДНК-полімерази. До складу буферного розчину в класичному варіанті входять: 1) компоненти, які створюють буферну ємність розчину (оптимальний рН реакційної суміші залежить від типу полімерази і, зазвичай, знаходиться в межах від 8,0 до 9,0 за кімнатної температури): трис, трис – HCl, його рН суттєво змінюється при нагріванні, тому працювати фермент буде при відносно нейтральному рН $\sim 7,5$; трицин (від слів «трис» і «гліцин», N-(2-гідрокси-1,1-біс(гідроксиметил)етил)гліцин) тощо; 2) компоненти, що формують іонну силу розчину - частіше за інших використовують солі KCl, NaCl або NH_4SO_4 (підвищують активність полімерази на 40 - 60 %); неіонні детергенти, наприклад Tween 20 або Тритон X-100 (запобігають адсорбції ДНК-полімерази на поверхні пробірки).

Іони Mg^{2+} . Mg^{2+} (кофактор ДНК полімерази) утворює розчинні комплекси з дНТФ, формуючи субстрат для ДНК-полімерази. Найбільш часто використовують концентрацію в 2,0 мМ (оптимальний діапазон: 1 – 5 мМ) при сумарній концентрації дНТФ приблизно 200 мкМ. Концентрація вільних іонів магнію в реакційній суміші суттєво залежить від концентрації вільних дНТФ та інших сполук, які можуть зв'язувати магній (наприклад, ЕДТА). Вільні іони магнію помітно підвищують температуру плавлення (гібридизації) дволанцюгової ДНК, підвищення концентрації Mg^{2+} збільшує ефективність ПЛР, але знижує специфічність. Дуже висока концентрація магнію не лише збільшує ймовірність неспецифічного відпалу праймерів, але й інгібує полімеразу. Зниження концентрації реагенту викликає зменшення виходу ПЛР-продукту. Оптимальну концентрацію іонів Mg^{2+} необхідно емпірично підбирати для кожної системи праймерів.

Ферменти для ПЛР. На початку використання методу після кожного циклу нагрівання-охолодження доводилося додавати в реакційну суміш ДНК-

полімерази, так як вона швидко інактивувалась при високій температурі. Процедура була дуже неефективною, вимагала багато часу й ферменту.

Потім метод істотно модифікували за рахунок використання ДНК-полімерази з термофільних бактерій. Ці організми пристосувалися до життя в гарячій воді. Термостабільні ДНК полімерази – це білки, молекулярною масою біля 90 - 95 кДа, температурний оптимум роботи яких становить 72 - 84 °С. Основна вимога до полімерази, яка використовується в ПЛР, – це здатність зберігати активність після інкубування при 95 °С. У 1980 р. Городецький та ін. виділили з термостабільних бактерій *Thermus aquaticus* ДНК полімерази, названу *Taq*. У 1986 р. з використанням *Taq*-полімерази було запропоновано проводити ПЛР, і протягом довгого періоду використовували й інші термостабільні ДНК-полімерази: *Tth* (виділена з бактерій *Thermus thermophilus*, також має активність зворотної транскриптази), *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*, археї), *Pwo* (*Pyrococcus woesei*, архея) тощо. Найчастіше використовувана *Taq*-полімераза - це високопроцесивний фермент (як правило, ефективно ампліфікує фрагменти довжиною до 3 – 5 т.п.н.) із чітко вираженою 5' – 3' екзонуклеазною активністю та без 3' – 5' (корегуючої) екзонуклеазної активності (що є її недоліком, адже в цьому випадку неможливо видалили помилково приєднаний нуклеотид; також, на жаль, *Taq*-полімераза додає до 3' зайвий АМФ). Корегуючою активністю володіють полімерази *Pfu*, *Vent* тощо, проте вони більш вимогливі до умов реакції.

На сьогодні використовують суміші різних ферментів (наприклад, суміші *Taq* і *Pfu* ДНК полімерази, щоб домогтися одночасно високої швидкості та точності копіювання; а також для збільшення довжини ПЛР-продукту до 20 - 40 тис. (але все одно це значно менше довжини хромосомної ДНК еукаріотичної клітини), зокрема численні штучно отримані модифікації природніх ферментів.

Вода є компонентом всіх реакційних сумішей. Від ступеня її чистоти залежить ефективність реакції. У ПЛР використовують H₂O dist чи H₂O bi dist, чи комерційну, вільну від нуклеаз.

Інші компоненти, додавання яких впливає на ПЛР. Інколи в ПЛР додають компоненти, які «покращують» результат реакції. Узагальнюючи, їх можна поділити на три групи: 1) ті, що впливають на T_m ДНК й олігонуклеотидів (для ампліфікації GC-багатих матриць: формамід, ДМСО (диметилсульфоксид), концентрацією 3 - 5 %, при цьому потрібно знизити температура відпалу праймерів на 2 - 3 °C, адже при їх додаванні знижується ефективність спарювання молекул праймера й ДНК, тим самим зменшуючи кількість неспецифічних спарювань; спермідин; для підвищення ефективності гібридизації ДНК (РНК) і праймера використовують тетраметіламмонійхлорид (ТМАК), при цьому інгібування ДНК-полімерази не спостерігається); 2) ті, які впливають на ДНК (білок SSB (знижає температуру плавлення ДНК) тощо); 3) ті, які впливають на властивості ДНК-полімерази: стабільність (бетаїн (осмопротектор), БСА (альбумін сироватки бика, запобігає адсорбції полімерази на стінках пробірки), неіонні детергенти, желатин, гліцерин, ди- та олігосахариди тощо); і кінетику ферментативної реакції (пірофосфатаза).

Приготування реакційної суміші та проведення ПЛР. В останні 10-15 років для ПЛР широко застосовують готові до вживання суміші, що містять усі необхідні компоненти, крім праймерів (але, наприклад, найбільш широко вживані ПЛР суміші для виявлення ДНК патогенної мікрофлори містять також і праймери), що істотно заощаджує робочий час і знижує ймовірність помилок і контамінації.

Отже, ПЛР має такі **переваги**: висока чутливість і специфічність, відтворюваність; прямий метод діагностики (виявлення безпосередньо збудника), відносна простота й швидкість у виконанні; можливість роботи з практично будь-яким біологічним матеріалом; зручність для автоматизації / роботизації.

ПЛР широко використовується в біотехнологічних експериментах, наприклад, для напрацювання матеріалу для клонування генів (ампліфікований ген потім вбудовується у вектор (плазмиду, космиду тощо), який переносить чужорідний ген у той же самий або інший, зручний для вирощування,

організм), отримання мутацій, виділення нових генів, сиквенування (сиквенування за Сенгером відбувається за принципом нерівноважної ПЛР), генетичного картування. Також ПЛР використовується в біологічній і медичній практиці, промисловості, сільському господарстві, криміналістиці, а саме: для діагностики раку, різних захворювань (спадкових, інфекційних), для створення й визначення генетично модифікованих організмів і вірусного навантаження, для контролю за мікробіологічним забрудненням навколишнього середовища, для ідентифікації особистості та встановлення батьківства. Зокрема, у деяких галузях, наприклад, у персоналізованій медицині (попереднє генотипування пацієнта перед вживанням певних ліків), ПЛР застосовують поки що на підготовчому етапі, внаслідок відсутності валідованих протоколів.

До **недоліку** цього методу відносять високу ймовірність перехресного забруднення між досліджуваними зразками, **контамінація** ампліконами чи плазмідами (часто використовуються в якості позитивного контролю ПЛР), що призводить до **хибнопозитивних** результатів. Для запобігання контамінації дотримуються ряд вимог:

- етапи очищення НК, приготування реакційних сумішей та аналізу результатів реакції проводять в окремих приміщеннях (на сьогодні реакцію проводять у сертифікованих ПЛР-лабораторіях), із використанням окремих комплектів автоматичних дозаторів;

- використовують одноразові мікропробірки й «наконечники», бажано з аерозольними фільтрами, що не містять нуклеаз;

- усі етапи проводять у нових одноразових рукавичках без пудри;

- у кожен експеримент включають **позитивний** (зразок завідомо містить послідовність-мішень; дозволяє упевнитися, що всі компоненти, які входять до складу реакційної суміші, забезпечують нормальне проходження реакції; для цього використовують препарат ДНК, що містить сайти для відпалу праймерів: наприклад, ДНК шуканого мікроорганізму або клоновані специфічні ділянки його генома; неспецифічні амплікони відрізняються за розміром від ампліконів, утворених у результаті ампліфікації з контрольним препаратом ДНК; вони

можуть бути як більшого, так і меншого розміру порівняно з позитивним контролем); **негативний** (зразок завідомо не містить послідовність-мішень); і **бланк-контроль** (реакційна суміш, в якій присутні всі компоненти за винятком ДНК; бланк-контроль є індикатором забруднень).

Для подальшого контролю специфічності утвореного продукту ампліфікації можна використовувати **гібридаційним зонди**, мічені флуоресцентними мітками або радіоактивними ізотопами, які взаємодіють із ДНК за тими ж принципами, що й праймери.

Препарат ДНК, підготовлений до ПЛР із біологічного матеріалу, може містити **домішки інгібіторів**, які помітно знижують ефективність реакції, а в деяких випадках, це призводить до відсутності специфічних ампліконів навіть при наявності шуканого збудника. Тому стає необхідним контролювати хід ампліфікації в кожній пробірці з реакційною сумішшю. З цією метою **в кожную пробірку додають додатковий, так званий внутрішній контроль**. Він являє собою будь-який препарат ДНК, несхожий із ДНК шуканого мікроорганізму. Для інфекційних тест-систем іноді використовують, наприклад, β -глобіновий ген, до кінців якого за допомогою біотехнологічних маніпуляцій «пришивають» ділянки ДНК, гомологічні праймерам, що входять до складу тест-системи (розмір продукту ампліфікації внутрішнього контролю підбирають таким чином, щоб він відрізнявся від специфічних ампліконів в 2 і більше разів). При відсутності смуги внутрішнього контролю й специфічної смуги ДНК результат слід вважати недостовірним. У цьому випадку для відповідного досліджуваного зразка рекомендується перевиділити ДНК. Наявність ампліконів внутрішнього контролю в реакційній суміші буде свідченням нормального проходження реакції ампліфікації та відсутності інгібіторів. Важливо відзначити, що якщо в реакційній суміші знаходиться потрібна ДНК, то ефективність її ампліфікації може помітно знижуватися через конкуренцію за праймери з ДНК внутрішнього контролю. Це особливо помітно при низьких концентраціях ДНК у випробуваному зразку і може призводити до хибнонегативних результатів.

Тому концентрація внутрішнього контролю повинна бути такою, щоб не конкурувати з ампліфікацією навіть одиничних шуканих молекул ДНК.

Детекція результатів класичної ПЛР (після проходження реакції). Для аналізу ПЛР-ампліфікованої ДНК існують різні методи: **гель-електрофорез, дот-блот-гібридизація** (дає просту відповідь по типу «так - ні» і особливо корисна в тих випадках, коли проводиться аналіз великого числа зразків (див. далі)) та **Саузерн-блотинг** (використовуються ізотопно, так і неізотопно мічені зонди (див. далі)). З їх допомогою можна аналізувати більшість ПЛР-продуктів, але абсолютно точні результати одержують тільки при **сиквенуванні** (високонадійний метод доказу специфічності, але застосовується, в основному, для визначення точкових мутацій генів (див. далі)).

В останні роки для детекції та одночасно **кількісної оцінки** ампліфікованої ДНК все більше починають застосовувати **гібридизаційно-ферментний метод (The branched DNA system)** на мікропланшетах. Але існують й інші варіанти: використовуються олігонуклеотидний зонд, його мітять дігексигеніном або флуоресцеїном із подальшим проявом моноклональними антитілами до дігексигеніну або флуоресцеїну; мічені ферментами моноклональні антитіла до дволанцюгової ДНК; зонд, мічений рутенієм (електрохемілюмінесцентний метод). Дуже перспективна для кількісних детекцій ампліфіконів на гель-електрофореграмах мініатюрна відеокамера, що передає на екран монітора інтенсивність флуоресценції смуг ДНК ампліконів, що дозволяє одночасно отримати співвідношення смуг ДНК-стандарта та ДНК-ампліфіконов досліджуваного гена.

Результат ПЛР можна кваліфікувати як **позитивний** або **негативний** залежно від того, чи виявлена в зразку, що цікавить, послідовність-мішень чи ні. Однак порушення нормального ходу ампліфікації, недостатня чутливість методу та непередбачений поліморфізм послідовності-мішені в межах зв'язування праймерів або гібридизаційного зонда часом зумовлюють **хибнонегативні результати**. При забрудненні зразків і випадкової гомології

між зондом, праймерами і послідовністю, подібною з мішенню, виходять **хибнопозитивні результати**.

Існують численні **різновиди ПЛР**: вкладена ПЛР (ПЛР у два раунда, англ. Nested PCR), інвертована ПЛР (англ. Inverse PCR), ГІФА ПЛР, ПЛР-ПДРФ (англ. PCR-RFLP), ПЛР із зворотною транскрипцією (або ЗТ-ПЛР, англ. Reverse Transcription PCR, RT-PCR), асиметрична ПЛР (англ. Assymetric PCR), Step-out ПЛР, ПЛР у модифікації FLASH (FLuorescent Amplification-based Specific Hybridization – специфічна гібридизація в процесі ампліфікації з ДНК-зондами, міченими флуорофорами, але не кількісна), ПЛР довгих фрагментів (англ. Long-range PCR), Touchdown ПЛР (англ. Touchdown PCR), ПЛР із гарячим стартом (Hot start PCR), випадкова ампліфікація поліморфної ДНК (англ. Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) або AP PCR (англ. Arbitrarily primed), ПЛР у тканині (In situ PCR), ПЛР з аналізом результатів «по кінцевій точці» (англ. End-point PCR, модифікація методу ПЛР, яка дозволяє враховувати результати реакції за наявності флуоресценції після ампліфікації, не відкриваючи пробірки, не кількісна), множинна ПЛР (multiplex PCR), кількісна ПЛР (англ. Quantitative PCR, Q-PCR) - кількісна ПЛР у реальному часі (див. далі), цифрова ПЛР (Digital PCR, кількісна) тощо.

ПЛР із зворотною транскрипцією (або ЗТ-ПЛР, англ. Reverse Transcription PCR, RT-PCR) дозволяє здійснити ампліфікацію невеликої кількості матриці **РНК**. ЗТ-ПЛР є двостадійним процесом. На першій стадії відбувається копіювання РНК **зворотною транскриптазою** з утворенням комплементарної ДНК. Існують **термостабільні зворотні транскриптази** (наприклад, зворотна транскриптаза вірусу мієлобластома птахів), які можуть бути використані в ПЛР. На другій стадії одноланцюгова комплементарна ДНК експоненційно примножується термостабільною ДНК-полімеразою під час ПЛР з утворенням великої кількості ДНК для подальшого аналізу. Можливо також модифікувати протокол, додавши використання заякорених праймерів з оліго(dT)-модифікованим праймером. Це дозволяє здійснити транскрипцію й ампліфікацію з 3'-кінця полі (А) - «хвоста». Так як синтезований пул ДНК

утворюється на основі вихідної послідовності РНК, є можливість сиквенувати ДНК після клонування, тим самим визначаючи послідовність вихідної РНК.

ЗТ-ПЛР знаходить широке застосування в молекулярній біології, біотехнології та клінічних дослідженнях, де її можна застосовувати для напівкількісного детектування інфекційних агентів, генетичних маркерів, а також опосередковано для виявлення білків у малій кількості.

У розділі описано принцип класичної ПЛР: температурні цикли, режими; переваги, недоліки методу; різновиди ПЛР. Детально висвітлено призначення різних компонентів реакційної суміші; наведено алгоритми підбору праймерів для ПЛР. Також надано поради стосовно уникнення отримання хибнопозитивних та хибнонегативних результатів реакції, як і методи детекції даних класичної ПЛР.

Контрольні запитання:

- 1) Поясніть принцип ПЛР.
- 2) Охарактеризуйте температурні цикли та кроки класичної ПЛР.
- 3) Перелічіть алгоритми підбору праймерів для ПЛР.
- 4) Поясніть призначення кожного з основних компонентів реакційної суміші.
- 5) Інші компоненти, додавання яких впливає на ПЛР.
- 6) Як проаналізувати специфічність утвореного продукту ампліфікації. Хибнопозитивні та хибнонегативні результати ПЛР.
- 7) Детекція результатів класичної ПЛР.
- 8) Вкажіть різновиди ПЛР та її переваги як методу діагностики інфекційних захворювань.
- 9) ЗТ-ПЛР: принцип та застосування.
- 10) Переваги та недоліки ПЛР.

ПЛР у реальному часі

Після проведення класичної ПЛР наявність очікуваного фрагмента ДНК перевіряють за допомогою зазначених вище методів, першим і найбільш часто вживаним з яких є метод гел-електрофорезу з візуалізацією бромистим етидієм (рис. 17).

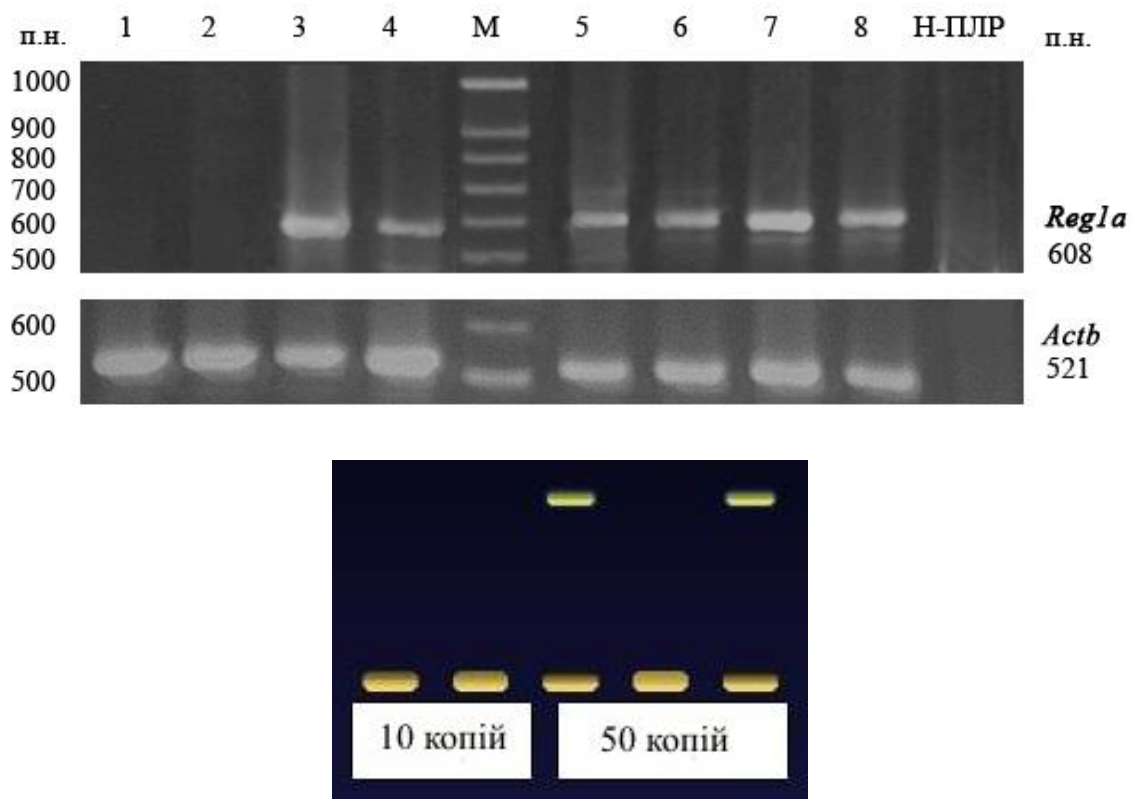


Рис. 17. Рівень експресії мРНК гена *Reg1a* в клітинах епітелію ворсинок і крипт дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпохлоргідрії та при введенні мультипробіотика «Симбітер»: М – молекулярний маркер (п.н.); групи епітеліоцитів ворсинок: 1 – контроль; 2 – «Симбітер»; 3 – омепразол; 4 – омепразол + «Симбітер»; групи епітеліоцитів крипт: 5 – контроль; 6 – «Симбітер»; 7 – омепразол; 8 – омепразол + «Симбітер»; Н-ПЛР – негативний контроль ПЛР. Пояснення в тексті

Як демонструє рисунок 17, результати реакції по її завершенню не дають достовірної інформації про її ефективність і справжню кількість продукту

(якщо одночасно не використовувати в реакції, наприклад, серійні розведення матриці з відомою концентрацією ДНК і потім порівнювати кількість продукту за допомогою денситометричного аналізу (кількість точок на одиницю площі поверхні)), тим самим знижуючи потенційну інформативність ПЛР.

ПЛР у реальному часі або кількісна ПЛР (ПЛР-РЧ, qPCR, Real-time PCR) — підвид ПЛР, за якої реєстрація накопичення певного продукту ампліфікації відбувається в ході реакції під час кожного циклу, тобто спостерігається «у реальному часі» (рис. 18). Це дозволяє виміряти кількісно вміст специфічного фрагменту ДНК у пробі, у той час як класична ПЛР дає тільки якісний аналіз — чи є в пробі відповідний фрагмент ДНК чи немає.

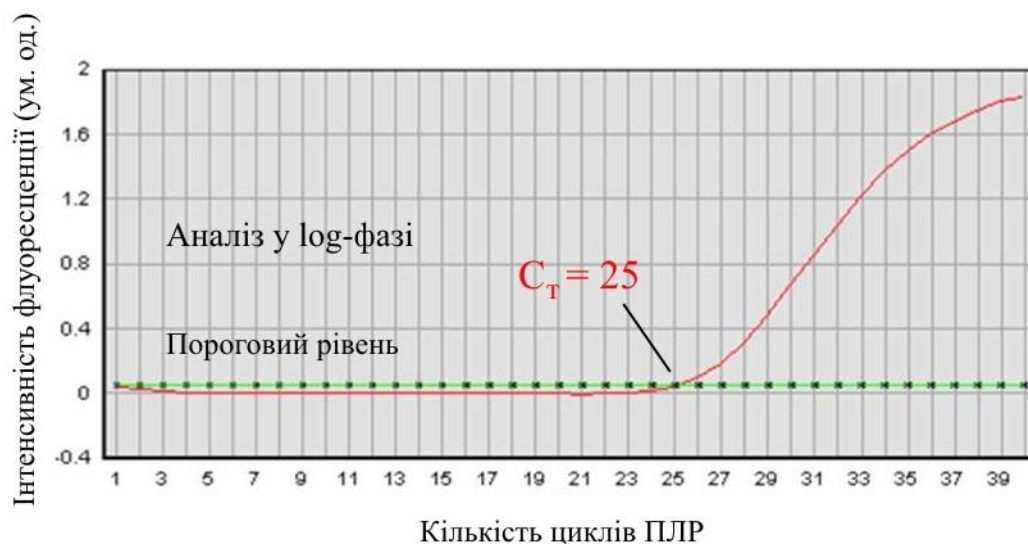


Рис. 18. Приклад графіка накопичення продуктів ампліфікації під час ПЛР у реальному часі. C_T – threshold cycle – точка перетину графіка накопичення ДНК і порогової лінії флуоресцентного сигналу на певному циклі (адаптовано з explorer.bio-rad.com)

Кількісний аналіз продукту ПЛР у реальному часі відбувається шляхом встановлення абсолютної кількості копій, визначення кількості копій відносно внесеної ДНК чи певних синтетичних конструкцій або додаткових генів, наприклад, генів домашнього господарства. Так, для **оцінювання рівня експресії певного гена** в клітині ЗТ-ПЛР поєднують із ПЛР у реальному часі

(ЗТ-ПЛР РЧ, qRT-PCR); одно- чи двостадійна реакція), адже просто ЗТ-ПЛР є тільки напівкількісною методикою.

ПЛР у реальному часі моніторить ампліфікацію певного фрагмента ДНК у кожному циклі вибірково за допомогою флуоресцентної реєстрації, підвищуючи тим самим достовірність дослідження. **Детектуючі ампліфікатори** - прилади для проведення ПЛР у реальному часі, які можна охарактеризувати як звичайні ампліфікатори ДНК, поєднані з вимірювачем флуоресценції (оптична частина), які дозволяють проводити вимірювання в реакційній суміші безпосередньо в ході ПЛР. Здатні до флуоресценції молекули – **флуорофори** – поглинають світло однієї довжини хвилі й випромінюють світло іншої, більшої за довжиною хвилі. Більшість таких сполук, які використовують у ПЛР у реальному часі, є гетероциклічними або поліароматичними вуглеводнями з певними спектрами поглинання й випромінювання (SYBR Green, пептидні НК – ПНК (peptide nucleic acid, PNA); 5-TAMRA, 5-ROX (ROX часто використовується як пасивний барвник, що компенсує різницю в об'ємі пробірок, прозорості кришок) тощо). При реєстрації накопичення декількох продуктів ПЛР в одній пробірці (**мультиплексна ПЛР**) потрібно звести до мінімуму перекриття спектрів різних флуорофорів із метою виключення перекриття окремих каналів реєстрації флуоресценції.

Оскільки інтенсивність флуоресценції барвників практично не залежить від зв'язування з ДНК та послідовності нуклеотидів для визначення моменту «спрацювання» флуоресцентно-міченого олігонуклеотида, використовують два підходи: **перенесення енергії репортерного (донорного, reporter) флуорофора на інший (акцепторний) флуорофор** із більш довгохвильовим спектром випромінювання («флуоресціюючий гасник»; реалізується в «Пробах, що примикають») або **перенесення енергії на «темновий гасник» флуоресценції** (сполука, що ефективно знижує інтенсивність флуоресценції барвника й розсіює енергію в тепло; реалізується в усіх інших видах проб). Гасники флуоресценції використовують у випадку неінтеркалюючих барвників,

у пробах, і поділяються на дві групи: **ті, що флуоресціюють, і темнові**. Також гасникам притаманні наступні фізичні процеси, які реалізуються в специфічних системах детекції (див. далі): 1) **контактне гасіння** (квантовий вихід донора та акцептора, які знаходяться на близькій відстані (3 нм) один від одного, знижується; 2) **флуоресцентно-резонансний перенос енергії** (FRET (англ.), квантовий вихід донора та акцептора, які знаходяться на відстані до 15 нм один від одного, не змінюється, також їм характерне гарне перекриття спектрів).

Розрізняють **специфічні** та **неспецифічні** системи детекції при проведенні ПЛР у реальному часі. **Неспецифічні**, у свою чергу, можна поділити на системи з використанням **інтеркалюючих барвників** і системи з **праймерами, міченими флуоресцентними барвниками**.

Використання **інтеркалюючих барвників** є дешевим і простим варіантом пофарбування ДНК за ПЛР у реальному часі. При вбудовуванні у дволанцюгову ДНК їх здатність до флуоресценції зростає в десятки й сотні раз [Ishiguro *et al.*, 1995]. Бромистий етидій не використовується, тому що знижує ефективність ПЛР. Найбільш розповсюдженим варіантом барвника для ПЛР у реальному часі є SYBR Green I, який вбудовується в малу борозну ДНК (рис. 19) або SYBR Gold.

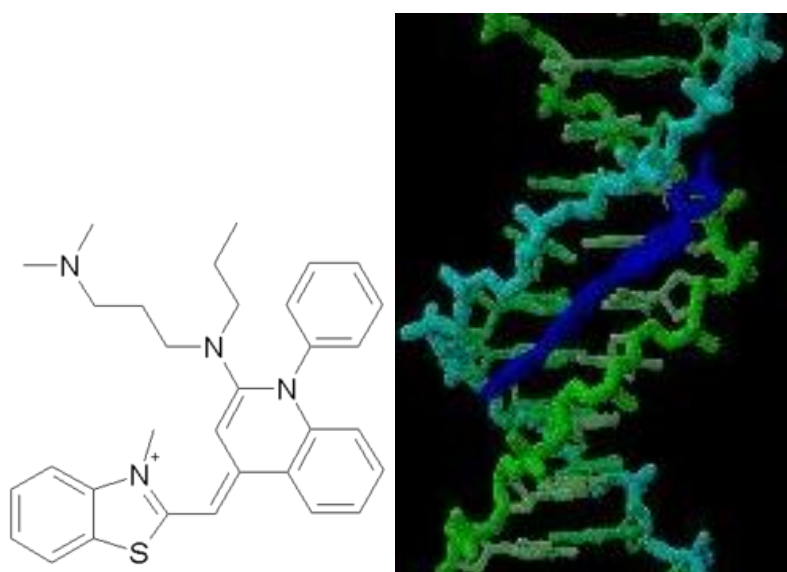


Рис. 19. Схема інтеркаляції SYBR Green I у ДНК (запозичено з explorer.bio-rad.com). Пояснення в тексті

До **недоліків** цієї системи детекції слід віднести те, що такі барвники демонструють накопичення будь-якої ДНК, включаючи димери праймерів. Специфічність отриманого продукту реакції можна перевірити за допомогою **кривих плавлення** (Melt curve analysis) [Ririe et al., 1997]. Для цього після закінчення ПЛР пробірку повільно охолоджують від 25 °С до 95 °С (чи навпаки нагрівають) і одночасно реєструють зміни флуоресценції. Фрагменти ДНК різного розміру й складу будуть плавитися (гібридизуватися) при різній температурі, що дозволяє оцінити склад реакційної суміші після ПЛР, але роздільна здатність цього підходу не є високою.

Мічені праймери з адапторною послідовністю («ампліфлури»). У найбільш простому варіанті праймери містять флуоресцентну мітку (флуорофор) і гасник флуоресценції, які розташовані так, що при утворенні шпильки (за рахунок того, що праймер має додаткову послідовність на 5'-кінці) флуорофор і гасник стають наближеними. У розчині праймери зберігають структуру шпильки, яка має низький рівень флуоресценції. У ході реакції шпилька міченого праймера розкривається (тому що він стає частиною дволанцюгового продукту), що призводить до посилення сигналу. Будь-яку систему з використанням мічених праймерів можна зробити специфічною, додавши флуоресцено-мічену гібридизаційну пробу з флуорофором (див. далі), що відрізняється від флуорофорів праймерів. Тоді специфічна ампліфікація приведе до зростання сигналу одночасно як від праймера, так і від проби. Сигнал від праймера буде свідчити лише про неспецифічний продукт реакції.

Специфічні системи детекції дозволяють достовірно реєструвати накопичення фрагмента ДНК лише визначеної послідовності. Оскільки навіть оптимально підібрана пара праймерів може давати небажані продукти ампліфікації (найчастіше, димери праймерів), використання методик із реєстрацією лише «потрібних» продуктів є більш надійним експериментальним підходом.

Праймери-проби («скорпіони»). Ця структура практично повністю

повторює праймери типу «ампліфлури» з тією лише різницею, що праймер і гібридаційна проба об'єднані в одну молекулу (механізм контактного гасіння). Для цього до 5'-кінця праймера приєднують адаптор зі структурою типу «стебло-петля», в якій петлева частина адапторної шпильки комплементарна внутрішній частині продукту ПЛР [Whitcombe *et al.*, 1999]. Таким чином, після утворення продукту петлева частина адаптора може гібридизуватися з внутрішньою частиною фрагмента, що призводить до роз'єднання флуорофора й гасника, і як наслідок – до зростання рівня флуоресценції (структура, що при цьому утворюється, нагадує хвіст скорпіона) (рис. 20).

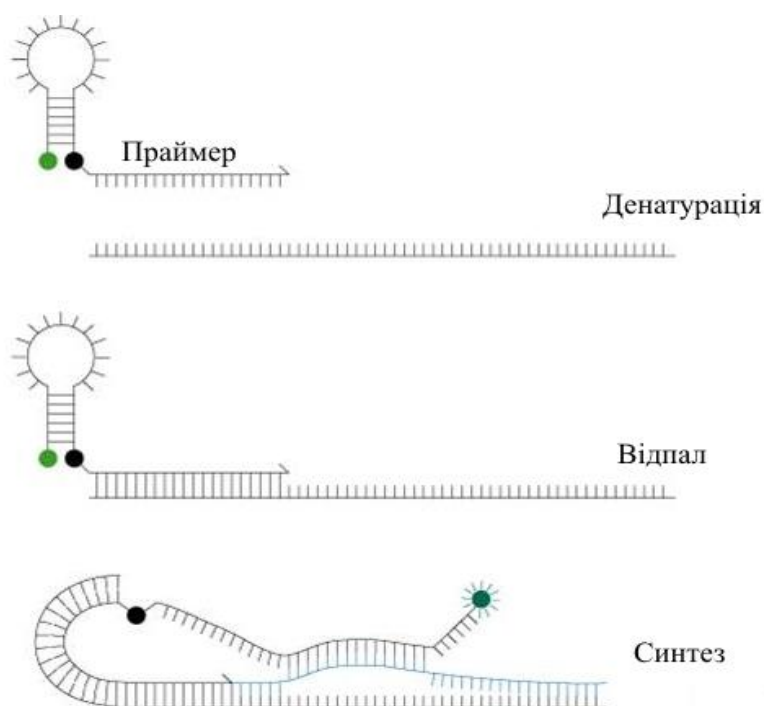


Рис. 20. Схема роботи праймерів «скорпіонів» (адаптовано з explorer.biogad.com). Пояснення в тексті

Вільні мічені проби. Лінійні проби, що руйнуються, - TaqMan. У цьому підході олігонуклеотид, комплементарний продукту ПЛР, мітять флуорофором і гасником флуоресценції (можливо використовувати як кінцеве, так і внутрішнє мічення) (рис. 21).

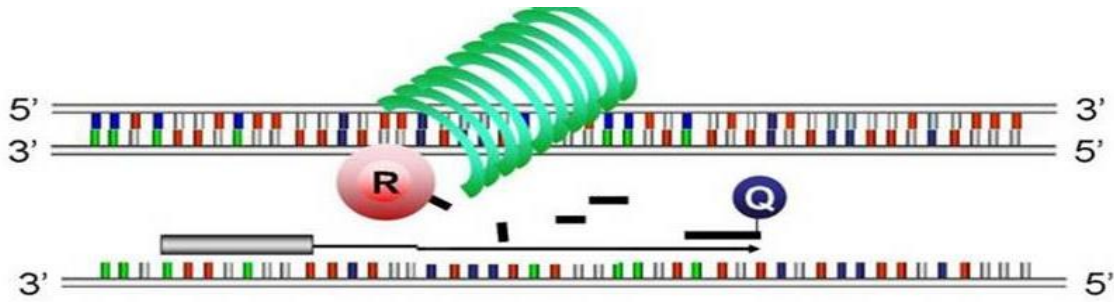


Рис. 21. Схема роботи лінійних проб, що руйнуються, - TaqMan (адаптовано з explorer.bio-rad.com). Умовні позначення: R - флуоресцентна мітка, Q - гасник флуоресценції. Після комплементарного зв'язування проби TaqMan з матрицею з'являється флуоресценція за рахунок 5'→3' екзонуклеазної активності *Taq*-полімерази

За відсутності мішені флуорофор і гасник наближені (за рахунок водневих зв'язків), і флуоресценція пригнічена (зазвичай за механізмом флуоресцентно-резонансного переносу енергії). При накопиченні певного продукту реакції проба гібридизується на ампліконі, що призводить до її руйнування за рахунок 5'→3' екзонуклеазної активності *Taq*-полімерази, тобто зонд гідролізується на нуклеотиди [Holland et al., 1991, Livak, 2003]. У результаті цього флуорофор і гасник потрапляють у розчин, де ймовірність знаходження цих речовин поряд буде невеликою, і флуоресценція відновиться. Інтенсивність сигналу зростає з кожним циклом ПЛР пропорційно накопиченню ампліконів. В одній реакції (мультиплексна ПЛР) можна використовувати кілька зондів, у яких флуорофори мають різні спектри випускання.

«Проби з інвертованим кінцевим повтором («молекулярні маячки», molecular beacons). Є варіантом попередньої технології (5'→3' екзонуклеазна активність *Taq*-полімерази не береться до уваги й не запатентовано її вплив). Проба має короткий (5 – 8 нуклеотидів) інвертований кінцевий повтор. Флуорофор і гасник розташовані по кінцях олігонуклеотида (відбувається контактне гасіння). У розчині проби при температурі нижче 55 – 60 °C

утворюють структуру типу стебло-петля з дуже низьким рівнем флуоресценції (за рахунок контактного гасіння (підходить для використання в мультиплексній ПЛР)). При гібридизації з ампліконом проба «розвертається», що призводить до суттєвого зростання рівня флуоресценції [Tyagi et al., 1996] (рис. 22).

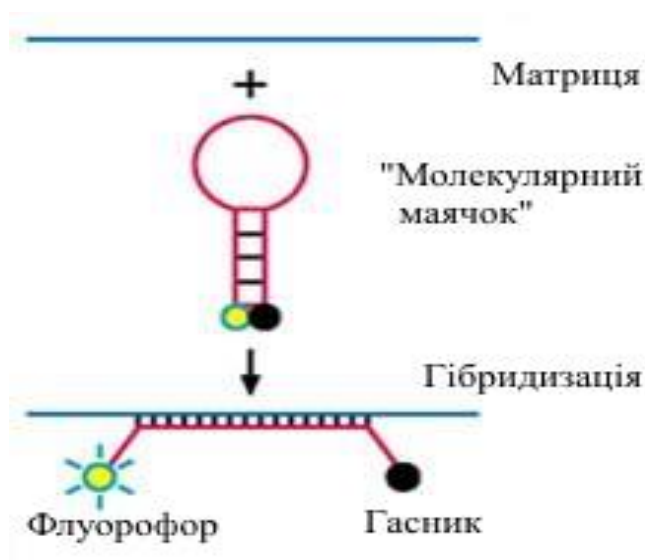


Рис. 22. Схема роботи лінійних «молекулярних маячків», beacon (адаптовано з explorer.bio-rad.com). Умовні позначення: R - флуоресцентна мітка, Q - гасник флуоресценції. Пояснення в тексті

«Проби, що примикають» (Light cycler; перенесення енергії репортерного (донорного, reporter) флуорофора на інший (акцепторний) флуорофор із більш довгохвильовим спектром випромінювання) - у цьому варіанті використовують два зонда, які зв'язують ДНК-мішень на невеликій відстані один від одного (механізм флуоресцентно-резонансного переносу енергії). 5'-кінець одного зонда та 3'-кінець другого містять флуорофор-донор і флуорофор-акцептор, відповідно. При їх близькому розташуванні флуорофор-донор поглинає світло певної довжини хвилі й переносить енергію на флуорофор-акцептор, за флуоресценцією якого детектують продукти ампліфікації. Застосування зазначених проб також дозволяє використовувати кілька флуорофорів, із різними спектрами випромінювання, та детектувати в одній

пробірці (мультиплексна ПЛР) сигнал від різних молекул ДНК [Lay et al., 1997]. Також до вільних мічених проб належать: «**Проби, що витісняють**» (механізм контактного гасіння) [Li et al., 2002].

Переваги ПЛР у реальному часі перед класичною ПЛР: аналіз результатів реакції відбувається одночасно із самою реакцією, у тій самій пробірці, у тому ж приладі, скасовується етап постреакційного аналізу продуктів реакції, що знижує ризик контамінації; економія витрат часу й праці; дозволяє проводити кількісний аналіз матриці; дозволяє проводити одночасний аналіз кількох різних мішеней в одній пробірці (мультиплексні реакції); більш висока чутливість (у 10000 більше ніж ІФА та в 100 раз, ніж звичайна ПЛР), специфічність і відтворюваність. За допомогою ПЛР у реальному часі, наприклад, виявляють та ідентифікують поліморфні локуси HLA, проводять моніторинг посттрансплантаційних взаємодій, генотипують (виявляють алелі та кількість копій алелей), проводять кількісний мікросателітний аналіз та пренатальну діагностику генетичних захворювань тощо.

У той же час **звичайна ПЛР** зберігає свої позиції в дослідженнях, які потребують напрацювання фрагментів ДНК із метою їх подальшого застосування (клонування, сиквенування тощо), адже додаткові компоненти реакції (інтеркалюючі барвники, проби) можуть заважати при зазначених маніпуляціях.

До **недоліків ПЛР** у реальному часі можна віднести: необхідність вищого рівня підготовки працівників; суттєво вищу вартість як устаткування, так і витратних реакційних матеріалів.

Перспективи розвитку ПЛР діагностики: збільшення загальної надійності методу, подальше спрощення процедури аналізу та скорочення часу аналізу; повний перехід на технологію з детекцією в реальному часі; розвиток «хімії» компонентів реакції (зондів, праймерів); поява нових схем, платформ реакції, конструкцій та приладів для ампліфікації НК; розвиток мультиплексних реакцій; роботизація всього процесу; впровадження в нові галузі медичної діагностики: діагностика розвитку плода, оцінка схильностей

до хвороб, спортивна медицина, онкологія, серцево-судинна медицина, типування по антигенам тканинної гістосумісності, трансплантологія.

У цьому розділі описано принцип кількісної ПЛР, її переваги над класичним методом та подальші перспективи розвитку. Для аналізу експресії певного гена в реальному часі надано методологічні поради: використання ЗТ-ПЛР РЧ і певних флуорофорів; відповідні підходи для визначення моменту «спрацювання» флуоресцентно-міченого олігонуклеотида; та детально охарактеризовано специфічні та неспецифічні системи детекції.

Контрольні запитання:

- 1) Принцип ПЛР у реальному часі.
- 2) Як оцінити рівень експресії певного гена в реальному часі?
- 3) Флуорофори та гасники флуоресценції.
- 4) Принцип контактного гасіння та флуоресцентно-резонансного переносу енергії.
- 5) На яких засадах базується ПЛР у реальному часі з використанням специфічних систем детекції (TaqMan, molecular beacons тощо)?
- 6) На яких засадах базується ПЛР у реальному часі з використанням неспецифічних систем детекції (SYBR Green)?
- 7) Переваги, недоліки та перспективи розвитку кількісної ПЛР.

Аналіз даних ПЛР у реальному часі

Аналіз даних ПЛР у реальному часі дозволяє судити як про присутність або відсутність шуканої НК, так і оцінити її початкову кількість за рахунок реєстрації накопичення продуктів ампліфікації протягом всієї реакції. Кількість досліджуваної НК виражають в абсолютних або відносних значеннях. Визначення **абсолютних значень** застосовують для розрахунку кількості копій НК у пробірці. Для цього необхідний зовнішній контроль із відомою концентрацією НК-мішені. **Відносні кількості** визначають для відповіді на питання: у скільки разів концентрація НК в одному зразку більше (або менше) ніж в іншому? Для корекції маси зразка, числа клітин і кількості загальної НК проводять **нормування** (вирівнювання) результатів. Нормування проводять за кількістю клітин, за сумарною ДНК, РНК, рибосомальною РНК тощо. У дослідженнях по визначенню рівня представленості транскриптів найбільшого поширення набуло використання так званих **генів «домашнього господарства»** (housekeeping genes). Вони експресуються на постійному рівні й слабо реагують на зовнішні впливи, оскільки необхідні для підтримання найважливіших життєвих функцій клітини. При виборі гена домашнього господарства однак слід враховувати, що рівень їх експресії може змінюватися в різних типах клітин. Гени домашнього господарства, які мають більш-менш стабільний рівень експресії, можуть бути використані в якості ендогенного контролю (транскрипти β -актину, GAPDH (гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназа), гістона H3, β -2-мікроглобуліна тощо), зокрема краще використовувати одразу декілька [Ребриков и др, 2009].

Розрахунки результатів ПЛР у реальному часі досить складні й проводяться в автоматичному режимі з використанням комп'ютерних програм. Однією з програм для розрахунку відносної кількості ДНК-мішені, що знаходиться у вільному доступі в мережі Інтернет, є «REST 2009». Розрахунки засновані на зв'язку інтенсивності флуоресцентного сигналу з концентрацією ДНК у пробірці. Порівнюють число циклів ампліфікації, необхідних для наростання сигналу флуоресценції в зразках до однієї і тієї ж величини.

Теоретично, як було зазначено, концентрація ампліконів при багаторазовому повторенні циклу повинна зростати експоненціально та описується формулою:

$$C_n = C_0 \times 2^n$$

C_0 - вихідна кількість ДНК-мішені, C_n - концентрація ампліконів після n циклів.

На практиці, синтез ампліконів поступово сповільнюється в міру виснаження компонентів реакційної суміші. Накопичення ДНК у ході ПЛР описують криві (рис. 23) і ділять на **4 стадії**: лінійна фонові фаза, стадія раннього експоненційного зростання кількості амплікона, стадія лінійного логарифмічного росту, стадія виходу на «плато» («**ефект плато**»).

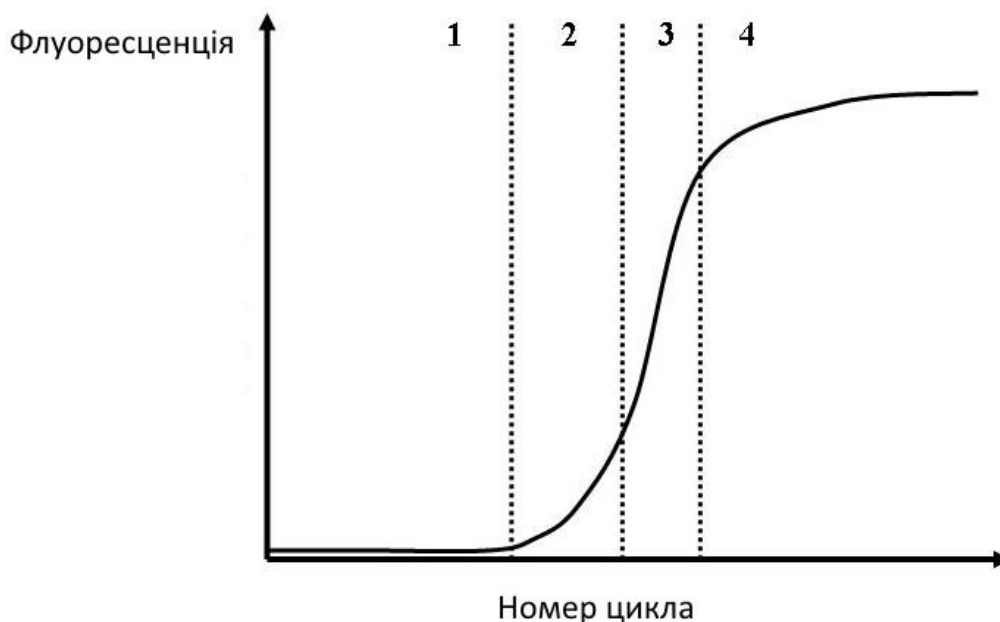


Рис. 23. Залежність флуоресценції від номера циклу: 1 - лінійна фонові фаза; 2 - раннє експоненційне зростання; 3 - лінійне логарифмічне зростання; 4 – «плато» (адаптовано з explorer.bio-rad.com).

На стадії **раннього експоненційного зростання** ефективність ампліфікації максимальна в порівнянні з іншими стадіями. Накопичення ДНК у ході ПЛР описується формулою:

$$C_n = C_0 \times (1 + E)^n$$

C_n - кількість продуктів реакції на циклі n ; C_0 - початкова кількість

досліджуваної ДНК на першому циклі; E - ефективність ампліфікації.

Значення E знаходиться в межах від 0 до 1 (або від 0 до 100 %), що відповідає подвоєнню початкової кількості ДНК за цикл, а при $E = 0$ утворення продукту не відбувається.

Термін «ефект плато» використовують для опису процесу накопичення продуктів ПЛР на останніх циклах ампліфікації, коли кількість ампліконів досягає 0,3 - 1 пкмоль. Залежно від умов і кількості циклів реакції ампліфікації на момент досягнення «ефекту плато» впливають:

- утилізація субстратів (дНТФ і праймерів);
- стабільність реагентів (дНТФ і ферменту);
- кількість інгібіторів, включаючи пірофосфати та ДНК-дуплекси;
- неспецифічні продукти або праймер-димери, які конкурують за праймери, дНТФ і полімерази;
- концентрація специфічного продукту та неповна денатурація при високій концентрації продуктів ампліфікації.

Чим менше початкова концентрація ДНК-мішені, тим вище ризик виходу реакції на плато. Цей момент може настати до того, як кількість специфічних продуктів ампліфікації буде достатньою, щоб їх можна було проаналізувати. Уникнути цього дозволяють лише добре оптимізовані тест-системи.

Для порівняння даних між зразками використовують один із 2 методів. У першому, для розрахунку величини n використовують **значення порогового циклу (C_T - від англ. **Threshold cycle**)** - точки перетину кривої накопичення флуоресценції, яка є однаковою для всіх зразків порогової лінії (рис. 18). Значення C_T визначається автоматично програмним забезпеченням до приладу або задається вручну в межах стадії раннього експоненціального зростання накопичення флуоресценції.

У другому, використовують **метод прямого порівняння графіків**. Для визначення величини n на кривій знаходять точку, положення якої відображає форму кривої (C_P - від англ. **Crossing point**). Зазвичай розраховують максимуми першої і другої похідних графіків накопичення флуоресценції.

Значення ефективності ампліфікації підбирається емпірично шляхом послідовних розведень зразка.

Будь-який із нижче описаних методів аналізу даних, отриманих у ПЛР у реальному часі, обирається до проведення ПЛР – під час планування досліджу, виходячи з кількості зразків, реактивів, умов експерименту та ефективності ПЛР.

1) Метод стандартної кривої. Цей метод використовується для визначення абсолютної кількості ампліфікованого фрагмента гена-мішені (кількість копій) у зразках на основі вимірювання рівня ампліфікації як у досліджуваному зразку-мішені, так і в стандартній серії розведень [«Applied Biosystems», 2010]. Дані із стандартної серії розведень використовуються для створення стандартної кривої. За допомогою стандартної кривої програмне забезпечення (наприклад, на приладі «StepOne™» («Life Technologies», США) інтерполірує абсолютну кількість (концентрацію) ампліфікованого фрагмента гена-мішені в зразках.

Наступні компоненти необхідні при аналізі результатів ПЛР у реальному часі за цим методом:

- Зразок** - зразок, в якому кількість ампліфікованого фрагмента гена-мішені невідома;

- Стандарт** - зразок, що містить відому стандартну величину, та **серія стандартних розведень** (послідовно розведені стандарти), які використовуються в кількісному експерименті для побудови стандартних кривих;

- Негативні контролю** - зразки, які містять воду або буферний розчин замість ДНК зразка, тому в них ампліфікація не відбуватиметься.

Дослідження проводяться в певній кількості ідентичних реакцій.

2) Метод відносної стандартної кривої. Метод відносної стандартної кривої використовується для визначення відносної кількості ампліфікованого фрагмента гена-мішені в зразку [«Applied Biosystems», 2010]. За його допомогою вимірюється рівень ампліфікації в досліджуваному зразку-мішені, у

зразках із внутрішнім (ендогенним) контролем, референсному зразку та в стандартній серії розведень. Вимірювання нормалізуються за допомогою ендогенного контролю (пояснення нижче). Дані зі стандартної серії розведень використовуються для побудови стандартної кривої. За допомогою стандартної кривої програмне забезпечення інтерполює кількість ампліфікованого фрагмента гена-мішені в досліджуваних та референсних зразках. Програмне забезпечення визначає відносну кількість ампліфікованого фрагмента гена-мішені в кожному зразку шляхом порівняння його кількості з референсним зразком.

Метод відносної стандартної кривої зазвичай застосовується для:

- Порівняння рівнів експресії гена в різних тканинах;
- Порівняння рівнів експресії гена в зразках, які піддавалися дії певного чинника з тими, які таких впливів не зазнавали (контрольна група тварин).
- Порівняння рівнів експресії алелів дикого типу з мутантними алелями.

Наступні компоненти необхідні при аналізі результатів ПЛР у реальному часі за цим методом:

•**Зразок** - зразок, в якому кількість ампліфікованого фрагмента гена-мішені невідома;

•**Референсний зразок (еталонний, reference, калібратор)** - зразок, який використовується в якості основи для розрахунку відносних результатів кількісного аналізу. Наприклад, при дослідженні впливу факторів на експресію генів контроль (зразок, який не зазнає впливів) буде відповідним референсним зразком.

•**Стандарт** - зразок, який містить відому стандартну величину, та **серія стандартних розведень** (послідовно розведені стандарти), які використовуються в кількісному експерименті для побудови стандартних кривих;

•**Ендогенний контроль** – певна молекулярна конструкція чи ген домашнього господарства, які повинні експресуватися на однаковому рівні в усіх дослідних зразках. Ендогенний контроль використовується для

нормалізації флуоресцентного сигналу для вимірювання кількості досліджуваного гена.

•**Негативні контролю** - зразки, які містять воду або буферний розчин замість ДНК зразка, тому в них ампліфікація не відбуватиметься.

Дослідження проводяться в певній кількості ідентичних реакцій.

Переваги: мінімальна валідація експерименту, адже ефективність ампліфікації фрагмента гена-мішені та ендogenous контролю може бути не еквівалентною (не однаковою), субоптимальною (низька ефективність ПЛР, не 100 %).

Недоліки: Калібрувальна крива повинна бути побудованою для кожного ампліфікованого фрагмента гена-мішені, що вимагає більшої кількості реагентів і більше місця в реакційній плашці.

3) Порівняльний метод C_T ($\Delta\Delta C_T$ метод) – відносно простий у виконанні метод апроксимації, який робить різні припущення, що, у свою чергу, зменшує велику кількість експериментальних зусиль, і в багатьох випадках дає результати, аналогічні іншим методам не на основі апроксимації. Метод використовується для визначення відносної кількості ампліфікованого фрагмента гена-мішені в зразку [Livak and Schmittgen, 2001; «Applied Biosystems», 2010].

За його допомогою вимірюється рівень ампліфікації в досліджуваному зразку, у зразках з ендogenous контролем та референсному зразку. За допомогою програмного забезпечення визначається відносна кількість ампліфікованого фрагмента гена-мішені в кожному зразку шляхом порівняння нормалізованої кількості ампліфікованого фрагмента гена-мішені в кожному зразку відносно нормалізованої кількості ампліфікованого фрагмента гена-мішені в референсному зразку.

Метод відносної стандартної кривої зазвичай застосовується для:

- Порівняння рівнів експресії гена в різних тканинах;
- Порівняння рівнів експресії гена в зразках, які піддавалися дії певного чинника з тими, які таких впливів не зазнавали (контрольна група тварин).

- Порівняння рівнів експресії алелів дикого типу з мутантними алелями.

Наступні компоненти необхідні при аналізі результатів ПЛР у реальному часі за цим методом:

- Зразок** - зразок, в якому кількість ампліфікованого фрагмента гена-мішені невідома;

- Референсний зразок (еталонний, reference, калібратор)** - зразок, який використовується в якості основи для розрахунку відносних результатів кількісного аналізу. Наприклад, при дослідженні впливу факторів на експресію генів контроль (зразок, який не зазнає впливів) буде відповідним референсним зразком.

- Ендогенний контроль** – певна конструкція чи ген домашнього господарства (транскрипти β -актину тощо (див. вище), які повинні експресуватися на однаковому рівні в усіх дослідних зразках. Ендогенний контроль використовується для нормалізації флуоресцентного сигналу для вимірювання кількості ампліфікованого фрагмента гена-мішені.

- Повтори** - загальна кількість ідентичних реакцій, що містять ідентичні зразки, компонентів та об'єми реакції;

- Негативні контролю** - зразки, які містять воду або буферний розчин замість ДНК зразка, тому в них ампліфікація не відбуватиметься.

Переваги: Не вимагає побудови стандартної кривої за умови, що ефективності ПЛР ампліфікованого фрагмента гена-мішені та ендогенного контролю є приблизно еквівалентними. Використовується менша кількість реагентів і, відповідно, є більше місця в реакційній плашці. Найкраще підходить для масштабних вимірювань відносної експресії численних генів у багатьох зразках.

Недоліки: Субоптимальна (низька ефективність ПЛР, не 100 %) може призвести до неточних результатів ПЛР.

У розділі представлено алгоритми методів аналізу даних ПЛР у реальному часі, які дозволяють судити як про присутність або відсутність шуканої НК, так і про її початкову кількість за рахунок реєстрації накопичення продуктів

ампліфікації протягом всієї реакції. Залежно від дизайну експерименту та обраного методу аналізу даних ПЛР у реальному часі кількість досліджуваної НК можна виразити в абсолютних або у відносних значеннях.

Контрольні запитання:

- 1) Опишіть криву накопичення ДНК у ході кількісної ПЛР.
- 2) Поясніть термін «ефект плато»?
- 3) Що таке пороговий цикл (C_T - від англ. Threshold cycle).
- 4) Охарактеризуйте відмінності порівняльного $\Delta\Delta C_T$ метода від методу стандартних кривих при кількісному аналізі даних ПЛР у реальному часі.
- 5) Навіщо визначати ефективність ПЛР у реальному часі при роботі із SYBR Green?

Гібридизація нуклеїнових кислот, ДНК-фінгерпринтинг

Гібридизація (відпал) НК – це об'єднання одноланцюгових молекул НК у дволацюгові структури (дуплекси), за принципом комплементарності. Гібридизація може відбуватися з утворенням дуплексів між молекулами ДНК, РНК або ДНК і РНК. Гібридизація відбувається, як при повній, так і при частковій комплементарності двох ланцюгів НК. Утворення дуплексу залежить від протяжності й ступеня комплементарності ланцюгів НК, температури та іонного складу розчину. Для опису дуплексу використовують температуру його плавлення (T_m), при якій, як уже зазначалось, ланцюги ДНК диссоційовані наполовину. Приблизно, T_m вираховують, виходячи з первинної структури НК. Наприклад, для коротких олігонуклеотидів можна застосовувати, окрім зазначеної у попередньому розділі, і наступну просту формулу:

$$T_m = 2(L+N_C+N_G), \text{ де}$$

L - загальна кількість нуклеотидів у послідовності (довжина олігонуклеотида), N_C - кількість цитозинів, N_G - кількість гуанінів.

Існують і більш складні формули, які враховують склад розчину, в якому проводиться гібридизація. Однак жодна формула не враховує всіх особливостей реакції, тому точне значення T_m визначають експериментальним шляхом. Визначення T_m має ключове значення при підборі олігонуклеотидів – праймерів (як зазначалось), або зондів у молекулярно-біологічних дослідженнях. Визначення T_m так само дозволяє визначати розбіжності (mismatch) основ усередині дуплекса, які призводять до зменшення його стабільності, що використовується при дослідженнях генетичної неоднорідності між видами або окремими представниками виду, при розробці нових молекулярно-біотехнологічних методів діагностики збудників. Порівняння T_m між зразками дозволяє детектувати присутність розбіжностей у нуклеотидних послідовностях.

На сьогодні широко використовується метод точного визначення T_m з використанням SYBR Green і приладу - програмованого термостата з реєстрацією флуоресценції в реальному часі. Метод полягає в тому, що готують

суміш дволанцюгової НК і флуоресцентного барвника для кожного зразка. За допомогою приладу знімають криві флуоресценції та аналізують їх. Виявлення відмінностей у значенні T_m дозволяє зробити висновок про розбіжності нуклеотидних послідовностей (рис. 25).

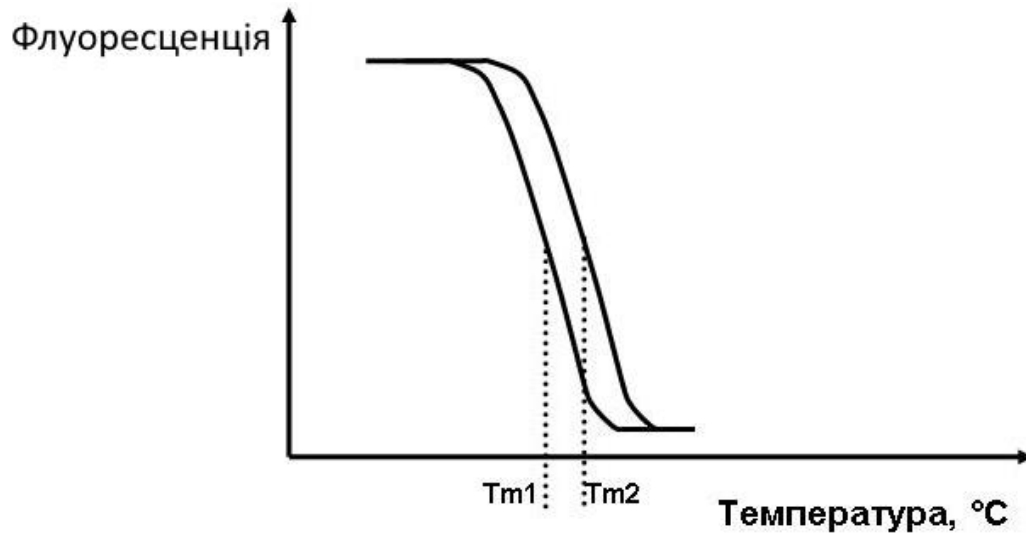


Рис. 25. Схема порівняння T_m дуплексів НК за кривими плавлення (адаптовано з explorer.bio-rad.com). Пояснення в тексті

Методи, засновані на гібридизації НК, широко використовують у молекулярної діагностики захворювань. До них відносять різні модифікації блотинга (від англ. Blot: Саузерн-блотинг (перенесення за Саузерном, Southern), нозерн-блотинг (northern), вестерн-блотинг (western), southwestern, eastern тощо та дот блот (dot blot, див. далі)) - в яких НК, білки переносять із гелю або прямо з розчину на мембрану, яка зв'язує. Далі проводять гібридизацію із зондом, що містить мітку, і реєструють результати реакції.

На гібридизації засновані методи детекції НК із використанням **мікрочіпів (microarray)**, в яких на твердій основі (підкладці) закріплюють велику кількість специфічних олігонуклеотидних зондів. Усю НК, що міститься в зразку, мітять і гібридизують із зондами чіпа. Після відмивання компонентів, які не зв'язалися, реєструють результати реакції.

Також гібридизація часто використовується в цитогенетиці для детекції НК у фіксованих препаратах одиничних клітин (**FISH** - fluorescence in situ hybridization) або зрізах тканин (TISH - tissue in situ hybridization).

З розвитком техніки молекулярного клонування генів і методів синтезу олігонуклеотидів практично будь-яка нуклеотидна послідовність може бути отримана у великій кількості для створення діагностичних зондів. В якості міток НК використовують радіоактивні ізотопи, флуоресцентні барвники та мітки з непрямою детекцією, наприклад, біотин або дігексигенін.

Мінісателіти (VNTR – variable number of tandem repeats - кількість тандемних повторів, яка може бути різною) – послідовності, які формуються тандемними повторами із довжиною “мотиву” (core) від декількох до сотень нуклеотидів кожний, кожен з яких повторюється від двох до декількох сотень разів. **Геномна дактилоскопія (ДНК-фінгерпринтинг)** – це метод аналізу гіперваріабельних тандемних повторів, або мінісателітів, описаних Джеффрісом та співавторами в середині 80-х років [Jeffreys, 1985]. Джеффрісу з співавторами вдалося вперше показати, що зонди на основі кор-послідовності тандемних повторів можуть бути використані для одночасної ідентифікації великої кількості генетичних локусів. Відповідні зонди, названі 33.6 та 33.15, існують у вигляді рекомбінантних форм векторів, отриманих на основі бактеріофага M13. Класично мінісателіти ідентифікують при розрізанні ДНК за допомогою **рестриктаз** (ендонуклеаз рестрикції), Саузерн-блотингу із специфічною пробєю ДНК (зондом), комплементарною до послідовності, яка повторюється.

Рестриктази - частина складної системи рестрикції-модифікації, яка використовується бактеріальними клітинами для регуляції вмісту та активності ДНК у клітині. У практичній молекулярній біології та біотехнології найчастіше використовують рестриктази II типу. Такі рестриктази (наприклад, *EcoRI*) впізнають певну послідовність і розрізають подвійну спіраль ДНК у фіксованій точці всередині цієї послідовності, яка в більшості випадків є паліндромом

(послідовність, яка має центральну вісь і зчитується однаково в обидві сторони від осі симетрії). Усі рестриктази II типу - Mg^{2+} -залежні.

Для ідентифікації певних ділянок ДНК також використовують зонди на основі рекомбінантних плазмід, наприклад, pUC19 (рис. 26).

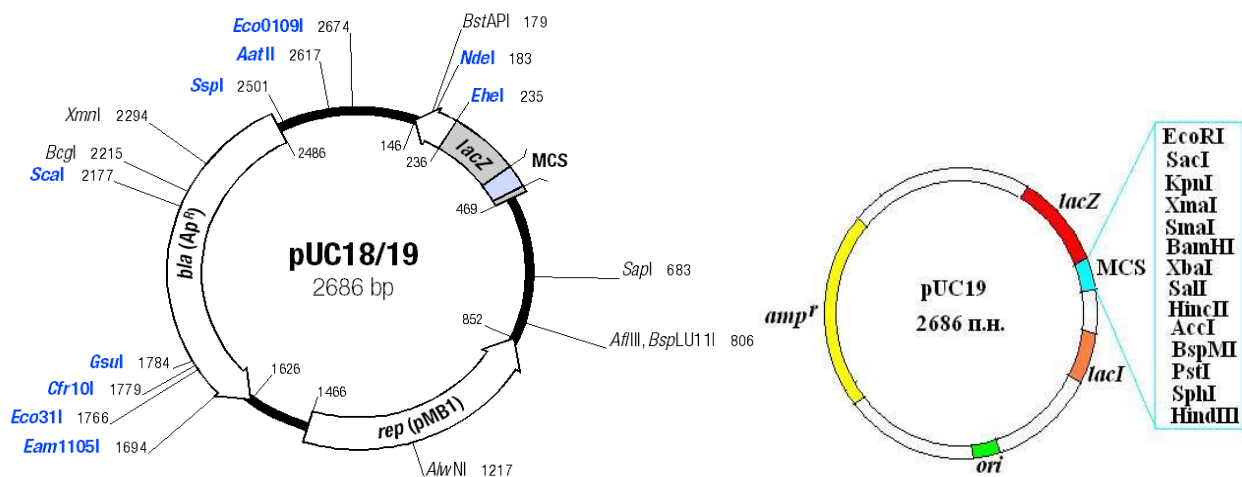


Рис. 26. Плазмідні вектори pUC18/19 (запозичено з каталогу продукції «Thermo scientific molecular biology tools product guide» за 2012-2013 pp.; ст. 441). Умовні позначення: *lacZ* - 5'-послідовність гену лактозного оперону, який кодує N-фрагмент β -галактозидази; MCS - від англ. Multiple Cloning Site - полілінкерна ділянка, яка містить ряд унікальних сайтів рестрикції.

Для цього плазмиду розрізають в одному сайті певним ферментом і проводять реакцію **лігування** (з'єднання двох молекул ДНК із утворенням нового хімічного зв'язку за участі ферменту лігази) із специфічною вставкою.

Наявність рекомбінантних плазмід визначають за допомогою наступних методів: **отримання компетентних клітин *E. coli* та їх трансформація плазмідною ДНК** (існує 2 базових методи трансформації бактерій: **хімічний метод** - із використанням $CaCl_2$ (або інших сполук) та подальшого «теплого шоку» або **електропорація** (введення екзогенної ДНК за умов короткого електричного розряду суспензії бактеріальних клітин); **біло-блакитної селекції на основі лактозного оперону *E. coli*** у її культурі. Як правило, після інкубації

на середовищі з **хромогенним субстратом - X-Gal** (синтетичний субстрат для β -галактозидази (5-бромо-4-хлоро-3-індоліл- β -D-галактопіранозид)), у присутності лактози (або її **синтетичного аналога ІПТГ** (ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид)), формуються блакитні колонії внаслідок утилізації X-Gal. Це відбувається за рахунок α -комплементції N-термінального фрагмента β -галактозидази лак оперону *E. coli* (5'- термінальна частина гена *lac Z*, джерело бактеріофаг *M13mp18/19*) плазмиди pUC19 із дефектною формою β -галактозидази (кодується бактерією-хазяїном), внаслідок чого синтезується фермент - β -галактозидаза. Але у випадку інсерції певної ДНК у полілінкер (MCS) плазмиди pUC19, у гені *lac Z*, інактивується синтез N-термінального фрагмента β -галактозидази, і α -комплементція пригнічена. Отже, у бактерій з рекомбінантними плазмідами pUC19 X-Gal не буде розщеплюватись, і будуть продукуватися білі колонії, з яких виділяють рекомбінантні плазміди (за допомогою **лужного лізису** (при pH 12 відбувається денатурація геномної ДНК бактерії, яка не може ренатурувати при поверненні до нейтрального середовища на відміну від ДНК плазмід, яка ніколи повністю не денатурує за таких умов) та подальшого очищення плазмід), які використовують як зонд для гібридизації з метою ідентифікації певної послідовності ДНК.

Полілокусні проби дозволяють виявляти одразу кілька гіперваріабельних послідовностей завдяки спорідненості повторів у деяких родин мінісателітів, що призводить до утворення високоіндивідуальної картини – **геномного дактиловідбитку** (DNA fingerprints) (рис. 27).

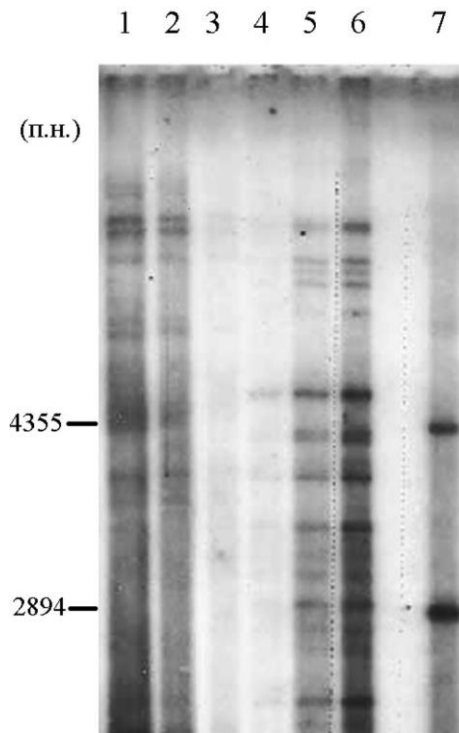


Рис. 27. ДНК-фінгерпринтний аналіз двох видів пінгвінів при встановленні оптимальної концентрації ДНК для батьківського аналізу (фотографія рентгенівської плівки): 1 – 20 мкг вихідної ДНК пінгвіна дженту № 1; 2 – 10 мкг ДНК пінгвіна дженту № 2; 3 – 2 мкг ДНК пінгвіна дженту № 3; 4 – 2 мкг вихідної ДНК пінгвіна Аделі (*P. adeliae*) № 1; 5 – 10 мкг ДНК пінгвіна Аделі № 2; 6 – 20 мкг вихідної ДНК пінгвіна Аделі № 3; 7 – молекулярний маркер (п.н.) – ДНК фага *M13mp7*, розщеплена ферментом *ClaI* (200 пг); 8 – молекулярний маркер (п.н.) – ДНК фага *M13mp7*, розщеплена ферментом *ClaI* (1 нг)

ДНК-фінгерпринтинг використовується в усьому світі переважно в криміналістиці при проведенні судово-медичних експертиз для ідентифікації особи, а також для встановлення батьківства. Сучасний метод ДНК-профілювання заснований на методі ПЛР і використовує **короткі тандемні повтори** (КТП, англ. STR (short tandem repeat), інші їх назви: **мікросателіти** або SSR (simple sequence repeat)). У цьому методі аналізуються ділянки з високим ступенем поліморфізму, які мають короткі повторювані послідовності ДНК (найбільш поширеним є 4 базових повтори, але зустрічаються й інші довжини повтору, в тому числі 3 і 5 пар основ). Так, у США ФБР

стандартизовало набір із 13 тандемних повторів для ДНК-профілювання, а також організувало об'єднану базу даних ДНК «**Combined DNA Index System (CODIS)**» для судово-медичної ідентифікації в кримінальних справах (крім того, розроблені комплекти інструментальних засобів, які дозволяють аналізувати одиночний нуклеотидний поліморфізм). Оскільки різні люди мають різну кількість повторюваних ланок, ці ділянки ДНК можуть використовуватися для встановлення відмінностей між індивідуумами. До ділянок геному, що містять КТП, підбирають специфічні олігонуклеотидних праймери, потім за допомогою ПЛР ампліфікують відповідні фрагменти ДНК. Ці фрагменти ДНК потім аналізуються за допомогою гелі-електрофорезу в ПААГ або за допомогою генетичного аналізатора, який є повністю автоматизованим капілярним приладом, здатним одночасно аналізувати декілька зразків.

У розділі висвітлено інформацію про методи, засновані на гібридизації НК, які широко використовують у біотехнології та молекулярній діагностиці захворювань (різні модифікації блотинга; метод геномної дактилоскопії на основі міні- та мікросателітів тощо). Надано загальні відомості про вектори (зокрема, плазміди) та ендонуклеази рестрикції. Описано методи лігування, отримання компетентних клітин, виділення плазмід та створення зондів.

Контрольні запитання:

- 1) Охарактеризуйте плазміди pUC18/19.
- 2) Опишіть умови проведення рестрикційного аналізу для певної рестриктази.
- 3) Загальна характеристика рестриктаз, що використовуються в біотехнологічному процесі.
- 4) В яких галузях застосовують аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів ДНК?
- 5) Що таке ДНК-фінгерпринтинг? Поясніть принцип методу геномної дактилоскопії.
- 6) Наведіть приклади ендонуклеаз рестрикції.

- 7) Коротко охарактеризуйте принципи гібридизації за Саузерном, Нозерном, Вестерном.
- 8) Навіщо використовують мікросателітний аналіз у детекції хромосомних делецій?
- 9) Опишіть ідентифікаційний аналіз при проведенні експертизи спірного батьківства.
- 10) Що таке тупі та липкі кінці рестриктів?
- 11) Чим відрізняється T4 лігаза від лігази *E. coli*?
- 12) Як можна перевірити наявність вставки?
- 13) Чому при перевірці наявності вставки потрібно використовувати, наприклад, рестриктазу *HincII*?
- 14) Що таке компетентні клітини? Як зробити клітини компетентними?
- 15) Які два базові методи трансформації бактерій?
- 16) Принцип біло-блакитної селекції на основі лак оперону *E. coli*.
- 17) Що таке X-Gal та IPTG і навіщо вони використовуються з огляду на біло-блакитну селекцію?
- 18) Поясніть принцип α -комплементації.
- 19) Які форми ДНК бактерій можна виявити після виділення плазмід?
- 20) Склад розчинів I – III при лужному лізисі.
- 21) Чому використовують саме лужний лізис для відокремлення геномної ДНК бактерій від плазмідної ДНК?
- 22) Які маніпуляції застосовують для подальшого очищення ДНК плазмід?
- 23) Які можуть бути подальші маніпуляції з рекомбінантною плазмідною?

Дот блот аналіз

Дот-гібридизація (дот блот) - система аналізу ДНК, за якої зразок ДНК безпосередньо наноситься у вигляді точки на мембрану (на відміну від процедури Саузерн-блоту, що включає ферментативне розщеплення, електрофорез і Саузерн-перенесення). У молекулярній діагностиці результати дот-гібридизації використовують для ідентифікації мутацій або для прямого підтвердження або спростування того, що в організмі є певна інфекція: вірусна або бактеріальна ДНК. Крім того, за допомогою цієї методики можна контролювати хід лікування та його ефективність.

Для виявлення сторонньої ДНК у досліджуваних зразках потрібно виявити сумарну ДНК. Із цією метою досліджувані та контрольні зразки виділеної ДНК денатурують за допомогою кип'ятіння або проводять апуринізацію ДНК за допомогою 0,2 N HCl. Потім їх потрібно зафіксувати на нітроцелюлозному чи нейлоновому фільтрі для подальшої гібридизації із заздалегідь підготовленим денатурованим ДНК-зондом, що містить, наприклад, біотин, дігексигенін (DIG), радіоактивну мітку (наприклад, [α -P₃₂]-dCTP) тощо. Той зонд, який не зв'язався, видаляють із матеріалу за допомогою відмивання фільтра. У наступній фазі фільтр потрібно обробити кон'югатом стрептовідина з лужною фосфатазою або антитілами (Анти-DIG) із пероксидазою хрому. Останній етап – це внесення субстратного розчину для лужної фосфатази чи пероксидази хрому (хромогенне фарбування) або візуалізація продуктів гібридизації шляхом авторадіографії (у разі радіоактивної проби). Якщо відповідні точки на мембрані забарвилися, це свідчить про те, що тестована ДНК є в досліджуваному біологічному матеріалі.

Дот блот – це експрес-метод, відносно простий і швидкий у використанні. Крім цього, він має досить багато переваг порівняно з іншими методами ідентифікації. Так, особливо цінна дот-гібридизація, коли зовнішня діагностична ознака проявляється слабо або взагалі відсутня. Оскільки в генетичному матеріалі глобальні зміни - це рідкісне явище, то помилково негативні результати є вкрай мінімальними. Також застосування зондів, на

якому заснована методика дот-гібридизації, дозволяє виявити ті мікроорганізми, які складно культивувати поза живим організмом. Зонд дозволяє відрізнити вірулентні штами від авірулентних. Це багато в чому визначає схему лікування. Ще одна з переваг – це оперативна ідентифікація (якісне визначення) вірусу або бактерії безпосередньо в біологічному матеріалі, незалежно від способу його зберігання. І це при високій достовірності виявлення навіть поодиноких мікробних і вірусних клітин.

На сьогодні, у випадках малоінформативності методу при зазначених задачах використовують імуноферментний аналіз (**ІФА**, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA (див. далі)) або аналіз РНК.

Окрім вищезазначеного, дот блот використовується як система аналізу наявності певних **білків** у зразку (рис. 28), зокрема, мутантних чи специфічних білків у клітинних екстрактах, отриманих від пацієнтів із генетичними чи інфекційними захворюваннями.

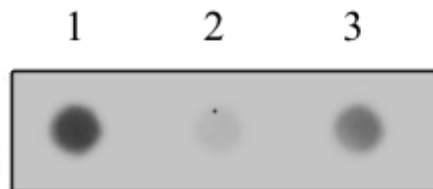


Рис. 28. Дот блотограма при підборі умов реакції для виявлення альбуміну в зразках сироватки крові щурів

При цьому підготовані певним чином зразки клітинних білків також безпосередньо наносяться у вигляді точок на мембрану (на відміну від процедури вестерн-блотингу (вестерн-блот, білковий імуноблот), що включає гель-електрофорез у ПААГ, перенесення на мембрану). Аналіз білків на мембрані здійснюється імунохімічно (імуноферментно: покрокове зв'язування з первинними антитілами, вторинними антитілами (кон'югатом із біотином або з репортерним ферментом, таким як лужна фосфатаза або пероксидаза хрому, або флуороформ, чи радіоактивною міткою), візуалізація з використанням 4-

хлоронафтольного фарбування в суміші з 1 % перекисом водню; за допомогою люмінесцентного випромінювання; флуоресценції або рідше - авторадіографії.

У розділі надано інформацію стосовно принципу методу дот-гібридизації та галузей його застосування, зокрема переваги цього експрес-методу та його сучасний стан.

Контрольні запитання:

- 1) Які відмінності дот-гібридизації при аналізі ДНК від Саузерн-блоту?
- 2) Назвіть принцип методу та основні етапи проведення дот блоту.
- 3) Які види антитіл використовуються в дот блоті при аналізі наявності певних білків у зразку?
- 4) Назвіть галузі використання дот блоту в молекулярній діагностиці.
- 5) Які переваги та недоліки методу дот блоту?

Методи імунного аналізу

При проведенні лабораторних досліджень часто виникає необхідність визначити наявність або кількісний вміст ряду біологічних компонентів (гормонів, ферментів, нейропептидів, продуктів імунної системи, антигенів (відповідь імунної організму хазяїна на дію збудника) тощо). Це завдання може бути вирішено з використанням методів імунного аналізу, заснованих на специфічному зв'язуванні антитіла з антигеном, при якому до одного з компонентів хімічно приєднана мітка. Зазначені методи дають можливість ідентифікувати досліджувані сполуки в низьких і дуже низьких концентраціях (до 5 пкг / мл). Залежно від типу використовуваної мітки та способу детекції сигналу імунний аналіз позначається як **імуноферментний (ІФА, ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (англ.)), радіоімунний (RIA), імунофлуоресцентний** тощо.

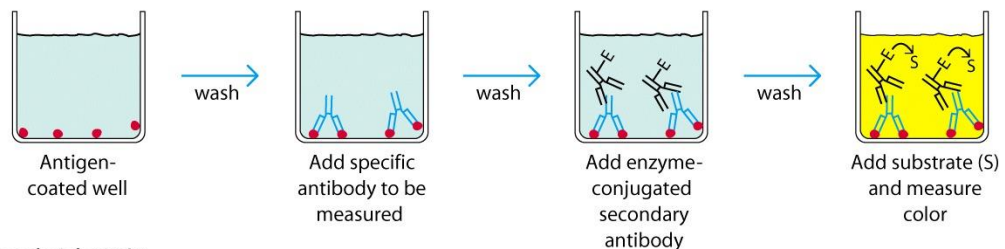
Найбільш поширеним на сьогодні є ІФА, який використовує в якості мітки фермент. При детекції в результаті реакції з відповідним хромогенним субстратом утворюється забарвлений продукт, **кількість якого можна визначити спектрофотометрично.** Використання ІФА в лабораторній практиці значно розширилося з появою можливості іммобілізації антигену й антитіла на твердих носіях із збереженням їх активності до зв'язування.

За стадіями проведення розрізняють **прямий (Direct ELISA) і непрямий (Indirect ELISA)** варіанти аналізу. У разі прямого ІФА використовують антитіла до антигену, який виявляють, з'єднані зі специфічною міткою, що є субстратом ферментативної реакції. У непрямому аналізі 2 етапи. При проведенні першого етапу використовують немічені антитіла до аналізуємих антигенів, а на другому етапі додають антивидові мічені антитіла. Найчастіше для першого етапу використовуються мишачі, а для другого - козячі антитіла (рис. 29).

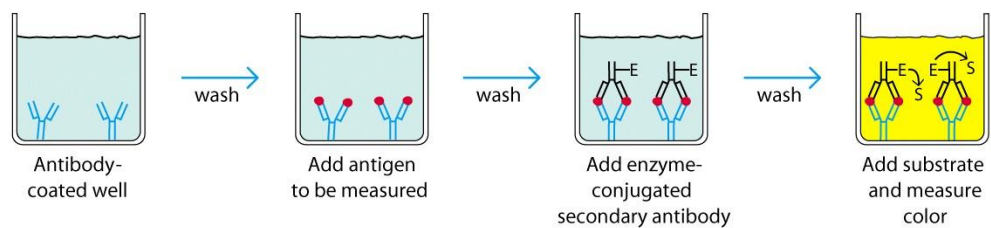
Найбільш зручним у постановці є **«сендвіч» -метод (Sandwich ELISA).** На першому етапі аналізу на полістироловому планшеті адсорбуються антигени або антитіла в заздалегідь обраній концентрації (рис. 29). При цьому реагенти,

що не зв'язалися з твердою фазою, видаляються відмиванням. У сенсibilізовані лунки вносяться досліджувані зразки. У лунці з позитивним і негативним контролем вносяться стандартні реагенти, які містять або не містять досліджуваний компонент. При необхідності аналізу кількісного вмісту білка вносяться калібрувальні розчини. Після цього планшет інкубують із використанням термошейкера або термостата. При цьому на поверхні твердої фази формуються імунні комплекси. Незв'язані компоненти видаляють відмиванням. На наступній стадії в лунки планшета вноситься кон'югат антитіло-фермент або антиген-фермент, який і зв'язується з іммобілізованим імунним комплексом, при цьому активний центр фермента залишається доступним для подальшої взаємодії із субстратом. Подальша інкубація субстрату в лунках з іммобілізованим кон'югатом призводить до розвитку кольорової реакції. Цю реакцію можна зупинити на потрібній стадії і по оптичній щільності оцінити насиченість фарбування.

(a) Indirect ELISA



(b) Sandwich ELISA



(c) Competitive ELISA

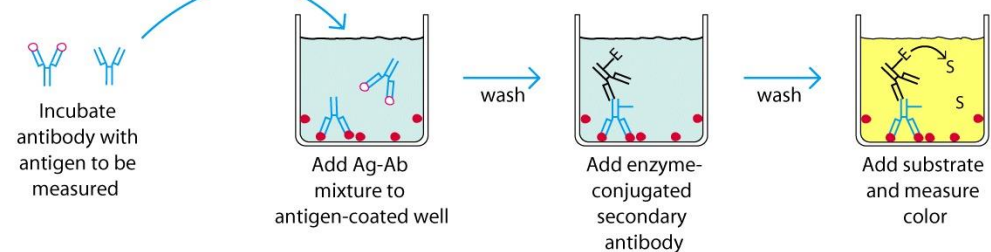


Рис. 29. Різновиди ІФА: (а) прямий ІФА, (б) «сендвіч» -метод, (в) конкурентна ІФА (адаптовано з [https:// http://www.microbiologynotes.com/elisa-principle-types-and-applications/](https://http://www.microbiologynotes.com/elisa-principle-types-and-applications/)). Пояснення в тексті

За типом хімічної взаємодії на першій фазі аналізу при зв'язуванні компонента, який визначається, методи імунного аналізу можна розділити на **конкурентні** та **неконкурентні**. У разі використання неконкурентного способу в системі присутні тільки аналізований компонент і специфічні антитіла з відповідними центрами зв'язування. При конкурентному варіанті ІФА мічений ферментом аналізований компонент мобілізують на твердій фазі, а в системі присутній ще і його аналог, який конкурує за центри специфічного зв'язування (рис. 29). Отже, ІФА буде мати назву - **конкурентний (інгібуючий) ІФА (Competition/inhibition ELISA, also known as a blocking ELISA)**.

Розвитку ІФА сприяло створення **моноклональних антитіл**, які продукуються гібридомою, отриманої в результаті злиття імунокомпетентної клітини В-лімфоцита та клітини мієломи мишей. Моноклональні антитіла несуть тільки одну хімічно однорідну популяцію антитіл, комплементарну специфічній детермінанті антигену, що дозволяє здійснювати тонку диференціацію білків.

На сьогодні розвиток імуноферментного аналізу йде як у бік підвищення чистоти антигенів та антитіл, так і в бік створення автоматизованих систем постановки реакцій та їх інструментального обліку.

Існують й інші **різновиди ІФА**; DAS-ELISA (A Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay); TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich-ELISA); метод EliSpot enzyme – linked ImmunoSpot тощо.

Також на сьогодні набуває популярності **ІФА з використанням магнітних частинок (MPEIA)**. У цьому випадку утворення імунних комплексів здійснюється на полістиролових магнітних кульках діаметром близько 0,8 мкм, які поміщають у лунки планшета. Особливістю зазначеного методу є те, що стадії промивання й детекції результатів проводять із

додатковим використанням магнітного сепаратора, за допомогою якого кульки фіксується на дні лунки. Для цього методу також існує модифікація з використанням флуоресцентних міток, що дозволяє збільшити число компонентів, які визначаються в одному вимірі, за рахунок використання кульок різного кольору, детектуємих за допомогою спеціального аналізатора (технологія «Bio-Plex»).

На доданок, варто згадати про молекулярна діагностику **ImmunoCAP** на основі методики UniCAP (на базі автоматизованого імунологічного аналізатора «ImmunoCAP250», «Phadia AB») задля серологічної діагностики й диференціювання механізму алергічної реакції (IgE-опосередкований або не IgE-опосередкований), яка здійснюється за допомогою *in vitro* тесту на виявлення імуноглобулінів класу E, специфічних для конкретних алергенів, не тільки в молекулах індивідуальних (мажорних) алергенів, але й до паналергенів (споріднені, високо консервативні білки) молекул перехресно-реагуючих (мінорних) алергенів, що багаторазово підвищує точність алергологічної діагностики; а також визначення рівня загального імуноглобуліну E. Зазначена методика використовує імунофлуоресцентний метод детектування, а також спеціально розроблену матрицю на основі спіненого матеріалу для взаємодії антиген-антитело, що забезпечує можливість виявлення занадто низьких концентрацій IgE-антитіл та інших показників у надто малій кількості крові пацієнта. Точність визначення рівня антитіл таким чином складає 0,01кЕ/л (кЕ - кілоодиниця).

У цьому розділі надано інформацію стосовно принципів методів імунного аналізу (заснованих на специфічному зв'язуванні антитіла з антигеном, при якому до одного з компонентів хімічно приєднана мітка), зокрема імуноферментний метод. Наведено варіанти методів ІФА за стадіями проведення та типом хімічної взаємодії на першій фазі аналізу при зв'язуванні компонента, який визначається; та інші різновиди. Також описано загальні положення про молекулярну діагностику – ImmunoCAP.

Контрольні запитання:

- 1) Які відмінності ІФА від вестерн-блотингу?
- 2) Класифікація ІФА.
- 3) Які види антитіл використовуються в ІФА?
- 4) Як кількісно проаналізувати вміст певного білка методом ІФА?
- 5) Принцип конкурентного (інгібуючого) ІФА.
- 5) Назвіть та охарактеризуйте різновиди ІФА.

Сиквенування нуклеїнових кислот

1) Під сиквенуванням ми розуміємо визначення точної послідовності нуклеотидів у ланцюгах ДНК та РНК. Визначення нуклеотидної послідовності ДНК стало можливим у другій половині 1970-х років завдяки стрімкому розвитку методів молекулярної біології (використання ендонуклеаз рестрикції, плазмідних векторів, молекулярного клонування та електрофоретичного розділення НК тощо). На сьогодні виділяють 3 основні покоління розвитку методів сиквенування НК. До найбільш ранніх (перше покоління) відносять винайдені в 70-их рр. минулого сторіччя методи **хімічної деградації** (наприклад, **Максама-Гілберта**) і **дидезоскинуклеотидний підхід, відомий як метод Сенгера (сиквенування з обривом ланцюга, що зростає)**. Метод Сенгера в модифікованому та більш технологічному вигляді набув найбільшого поширення.

До другого покоління відносяться більш ефективні методи середини 90-их років, які було розроблено за допомогою розвитку молекулярної біології та суміжних областей (хімія, фізика та інформатика), у тому числі й заради комерційного застосування. Однак у цьому випадку в основі цих методів, незважаючи на їх різноманітність, лежить принцип отримання сигналу від великої кількості молекул ДНК. Третє ж покоління методів сиквенування направлено на реєстрацію сигналу від лише однієї молекули ДНК, яка і піддається аналізу. Саме останнє на сьогодні покоління методів сиквенсу в сучасній літературі дуже часто згадується як **NGS (next-generation sequencing)**, або, якщо простіше, **високоєфективне сиквенування**, що відрізняються більш високою продуктивністю. NGS включає в себе кілька різних технік: Illumina (Solexa) sequencing, Roche 454 pyrosequencing, Ion torrent: Proton / PGM sequencing, SOLiD sequencing. Все це разом з Nanopore Sequencing, Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-seq) та ще багатьма різними методами та платформамим відноситься до **High-Throuput Sequencing (HTS)** [Ребриков, 2015; Heather and Chain, 2016;]. Хоча, варто зазначити, що під високоєфективними методами деякі дослідники об'єднують методики як

другого, так і третього поколінь. Серед основних відмінностей між другим і третім поколінням методів є відсутність етапу ампліфікації бібліотеки або окремого фрагменту ДНК в останньому. Це суттєво змінює процес сиквенування, дозволяючи прочитати одночасно дуже багато фрагментів за принципом sequencing by synthesis (одночасно відразу кілька ділянок геному). Вказана особливість дозволила значно прискорити, спростити та здешевити оброблення геномних даних. Найбільш продуктивні методи, забезпечують читання мільярдів нуклеотидів у день. Саме через це HTS зараз є основним методом дослідження повних геномів, а крім того грає помітну роль у розробці програм персоналізованої медицини для людей. Однак, незважаючи на наявність технологій із високою пропускнуою здатністю, дидезоксинуклеотидний метод до сих пір залишається «золотим стандартом» визначення нуклеотидної послідовності ДНК і широко використовується в науково-дослідних роботах.

1) Метод Максама-Гілберта. Один із найбільш ранніх методів, в основі якого лежить нуклеотид-специфічна хімічна деградація, ініційована обробкою зразків різними агентами. На даний час метод майже не використовується через високу шкідливість для дослідника використаних речовин і відносно низьку ефективність.

2) Метод Сенгера. Являє собою сиквенування, що базується на 2-х етапах: 1) можливості генерації з однієї нуклеотидної послідовності, яку треба прочитати із серії послідовностей різних довжин із кроком в 1 нуклеотид за допомогою додавання мічених дидезоксинуклеозидтрифосфатів (ддНТФ), які є результатом спеціальної модифікації звичайних нуклеотидів, тому не можуть бути використані для подальшого синтезу ланцюга завдяки відсутності гідроксильної групи у третьому положенні нуклеотидного моноцукру. У результаті синтезується набір фрагментів ДНК різної довжини, 3'-кінець яких закінчується одним із термінаторів. Ф. Сенгером було запропоновано проводити 4 реакції для кожного з ддНТФ і однією з умов для визначення послідовності ДНК було те, що сиквенуєма ДНК повинна бути саме в

одноланцюговій формі; 2) розділення отриманих фрагментів у гелі з високою роздільною здатністю. Історично використовувались радіоактивні мітки й високощільний ПАА-гель (нуклеотидна послідовність зчитувалася по розташуванню смуг на гелі).

На сьогодні дидезоксинуклеотидний метод сиквенування ДНК за Сенгером зазнав численних модифікацій (рис. 30), заснованих на сучасних досягненнях (наприклад, заміна фрагмента Кленова на видозмінену версію ДНК-полімерази, яка кодується бактеріофагом Т7 (цей фермент відомий під торговою назвою «сиквеназа»; він має високу процесивність, високу швидкість протікання реакції та не проявляє екзонуклеазної дії - 5'→3').

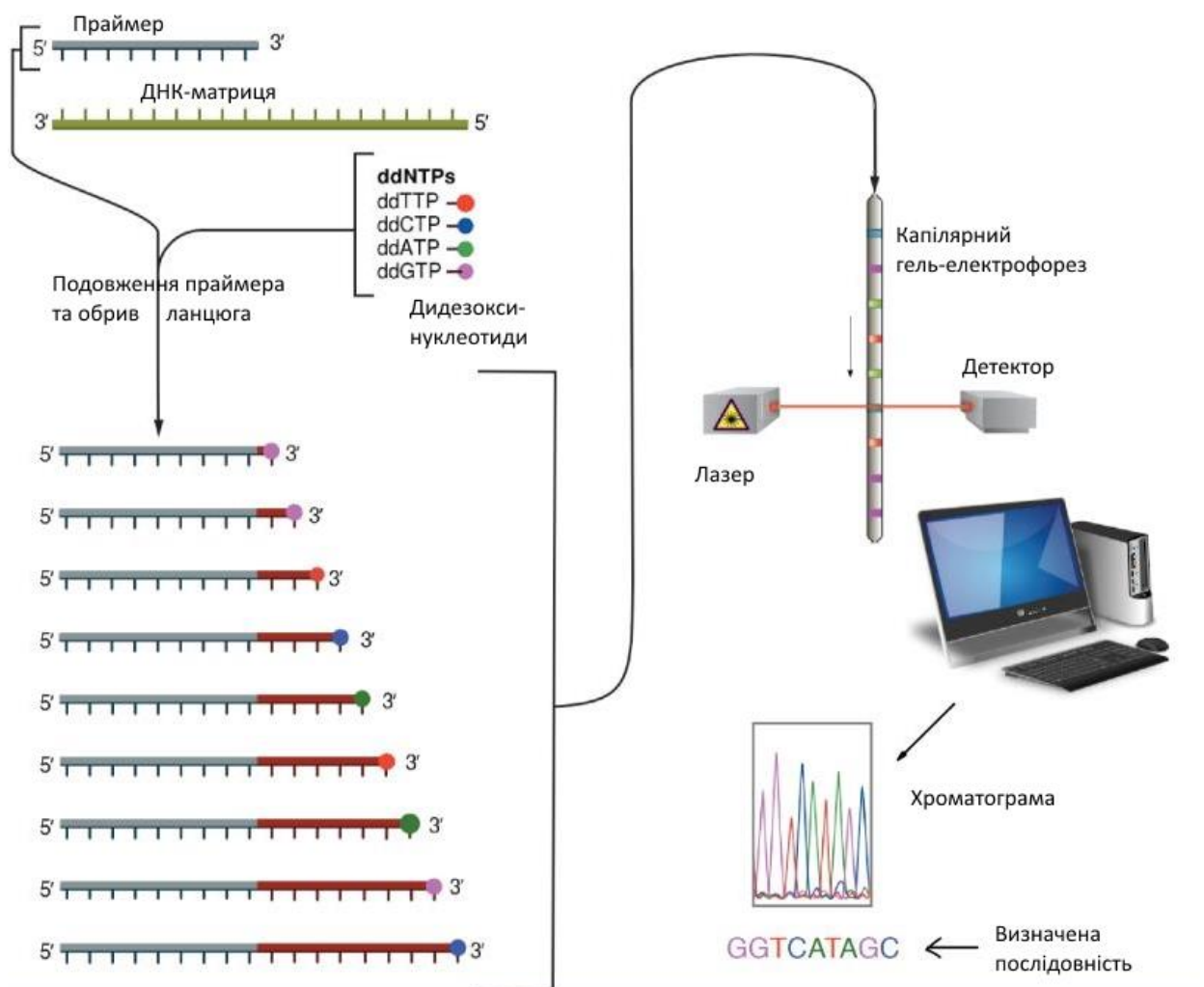


Рис. 30. Схема проведення сиквенування ДНК за Сенгером (пояснення в тексті)

Ферментативний синтез комплементарного ланцюга ДНК проводиться в ході ПЛР, в якій поряд із дНТФ використовують ддНТФ. Кожен із ддНТФ позначений окремим флуоресцентним барвником (флуорофором), що дозволяє проводити реакцію в одній пробірці. Результатом такої ПЛР є синтез пулу одноланцюгових фрагментів ДНК різного розміру й закінчуються одним із флуоресцентно-мічених ддНТФ. Отримані фрагменти ДНК очищають від компонентів реакційної суміші, денатуриують і розділяють за довжиною в лінійному ПААГ методом високовольтного капілярного електрофорезу, що дозволяє розділяти фрагменти ДНК, які відрізняються всього на 1 нуклеотид.

Електрофоретичний поділ фрагментів ДНК проводять в автоматичних капілярних сиквенаторах («GE - MegaBACE», «Beckman Coulter - SEQ», «Applied Biosystems»). При проходженні міченого флуоресцентним барвником фрагмента через зону сканування лазер, що генерує безперервне випромінювання, збуджує флуорофор, наступна за цим емісія (випромінювання) флуоресценції вловлюється детектуючим пристроєм. Отримані дані перетворюються за допомогою програмного забезпечення в текстову інформацію (нуклеотидну послідовність).

Визначення нуклеотидної послідовності ДНК за Сенгером є найточнішим методом сиквенування, проте з невеликою продуктивністю. Наприклад, проект «Геном людини» зайняв приблизно 13 років і коштував близько 3 мільярдів доларів. Однак, розроблені при реалізації проекту технічні рішення, привели до стрімкого розвитку технологій сиквенування наступного покоління. Наприклад, спосіб підготовки ДНК, названий **методом «дробовика»** («shotgun-sequencing», фрагментація ДНК, клонування отриманих коротких фрагментів), став основою для створення потужного паралельного сиквенування, використовуваного в наступних поколіннях секвенування (NGS).

Технології NGS мають високу продуктивність, швидкість, високу точність та дозволяють вирішувати різноманітні завдання (повногеномне сиквенування, сиквенування геномів і транскриптомів *de novo*, ресиквенування з пошуком

заданої мутації, метагеномне дослідження тощо). Велике значення для NGS відіграє біоінформатика, тому що оброблення отриманих даних та збирання нуклеотидних послідовностей вимагає високопродуктивного програмного забезпечення.

Масивне паралельне сиквенування є новим етапом у вдосконаленні технологій визначення нуклеотидних послідовностей. Часто їх відносять до методів другого покоління NGS. Принципова відмінність технологій масивного паралельного сиквенування полягає в можливості одночасного визначення первинної структури пулу НК, виділених із різних зразків. Для диференціювання досліджуваних проб використовують набори штрих-кодів або індексів, які являють собою олігонуклеотиди відомої послідовності. Серед найбільш відомих методів сиквенування нуклеїнових кислот **другого покоління** варто виділити наступні:

1) Гібридизація на твердій фазі, заснована на принципі комплементарності ланцюгів ДНК. Як видно з назви, метод заснований на гібридизації міченої одноланцюгової ДНК у вигляді коротких фрагментів із синтетичними олігонуклеотидами відомих складу та довжини. Такі нуклеотиди повинні міститися у всіх можливих комбінаціях послідовності для певної довжини, і фіксуються на спеціальній матриці. Після проведення гібридизації відбувається відновлення вихідної послідовності нуклеотидів за рахунок збирання ділянок спрацювавших зразків, які перекриваються між собою.

2) Мас-спектрометрія MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight). Дозволяє ідентифікувати компоненти гетерогенної суміші олігонуклеотидів за рахунок різниці їх молекулярних мас. Зразок для аналізу розміщується на підложку, що поглинає ультрафіолетові промені та піддається впливу короткого лазерного імпульсу. Завдяки цьому іонізовані молекули НК рухаються в електричному полі в напрямку детектора, причому час його досягнення залежить від співвідношення маса/заряд кожного з компонентів суміші. Цей метод наразі не використовується в комерційних сиквенаторах.

3) Сиквенування лігуванням (циклічне лігазне сиквенування (SOLiD sequencing / «Applied Biosystems» - «Life Technologies», США). Вважається однією з найперших методик саме вискоєфективного сиквенування, розробленого в 90-их роках минулого сторіччя. Метод засновано на сиквенуванні з використанням лігування з подальшим видаленням приєднаного олігонуклеотиду за допомогою набору рестриктаз. Для лігування використовуються короткі (8-10 мономерів) флуоресцентно-мічені молекули олігонуклеотидів, а також спеціальні мікросфери, розташовані на матриці (підложці). Флуоресцентна мітка, яка вивільняється, детектується пристроєм (<http://www.lifetechnologies.com/>).

4) Піросиквенування (Roche 454 pyrosequencing, технологія 454 («Roche», Швейцарія). Цей метод, як видно з його назви, заснований на реєстрації пірофосфату, який утворюється під час приєднання чергового нуклеотиду до ланцюга в ході полімеразної реакції (детекція хемілюмінесцентного сигналу). Метод реєстрації полягає в каскаді послідовних ферментативних реакцій, які запускаються формуванням фосфодієфірного зв'язку та закінчуються випромінюванням кванта світла. Такі реакції здійснюються під контролем АДФ-сульфурилази, люциферази та аспірази з використанням аденозинсульфофосфату та люциферину, а утворений світловий сигнал детектується за допомогою спеціальних фотоматриць (<http://www.454.com/>).

5) Метод зворотніх термінуючих нуклеотидів (сиквенування на молекулярних кластерах (Sequencing by synthesis, «Illumina» (Solexa) sequencing, США). У цьому методі, запропонованому Баласубраманю та Кленерманом, також застосовується принцип реєстрації утворення фосфодієфірного зв'язку, але не за продуктами реакції, а за безпосереднім сигналом від основи у складі приєднаного нуклеотиду. При цьому повинно бути забезпечене приєднання лише одного нуклеотиду за цикл за рахунок використання 3'-блокованих трифосфатів, а також мітка основи повинна відносно легко від'єднуватися. У ході роботи додаються чотири термінуючі

флуоресцентно-мічені нуклеотиди, на яких синтез зупиняється завдяки блокованим 3'-фосфатам. Детекція відбувається завдяки зчитуванню флуоресцентного сигналу спеціальною фотоматрицею (<http://www.illumina.com/>).

6) Напівпровідникове сиквенування («Ion torrent: Proton / PGM sequencing» / «Life Technologies», «Thermo Fisher Scientific», США). Засноване на реєстрації йонів водню, виділених в середовище у ході синтезу ДНК полімеразою в реальному часі. Дуже нагадує піросеквенування, але у цьому випадку оптичний детектор сигналу не використовується, а проходження реакції контролюється реєстрацією протона, виділеного разом із пірофосфатом у ході реакції полімеризації. Для такої реєстрації зазвичай використовують сенсор pH середовища (<http://www.iontorrent.com/>).

Сиквенування третього покоління (Next-Next Generation Sequencing - NNGS) засновано на визначенні первинної структури одиничних молекул і характеризується відсутністю стадії ампліфікації фрагментів ДНК. Серед методів сиквенування НК **третього покоління** розрізняють:

1) Сиквенування методом спектроскопії комбінаційного розсіювання. Ця методика заснована на так званому ефекті Рамана, а саме – комбінаційному розсіюванні світла, що являє собою непружне розсіювання оптичного випромінювання на молекулах речовин у будь-якому агрегатному стані. Такий ефект, як правило, супроводжується помітними змінами частоти випромінювання, що може застосовуватися з метою детекції послідовностей нуклеотидів. У ході визначення формується спектр, користуючись числом і розташуванням смуг якого можна зробити припущення про молекулярну будову речовини. У 2007 році була розроблена модифікація зазначеного методу під назвою TERS (tip-enhanced raman spectroscopy), якою, використовуючи наночастки золота та срібла для посилення сигналу комбінаційного розсіювання, можна за спектрами визначити послідовність ДНК навіть з модифікованими нуклеотидами.

2) Сиквенування за допомогою електронного мікроскопа («ZS Genetics»). Ці методи можна розділити на три «гілки»: скануюча електронна мікроскопія (SEM), просвічуюча електронна мікроскопія (TEM) та скануючо-просвічуюча електронна мікроскопія (STEM). Для візуалізації процесу в електронному мікроскопі основи нуклеотидів мітяться за допомогою атомів важких металів. Ця методика поки що знаходиться в стані розробки, хоча можливість «прочитування» достатньо довгих послідовностей нуклеїнових кислот уже була показана («ZS Genetics», США).

3) Використання зворотніх термінуючих нуклеотидів на одиничних молекулах нуклеїнових кислот із реєстрацією кожного нуклеотида завдяки мітці, що відщеплюється в ході реакції (сиквенування однієї молекули (true Single Molecule Sequencing, tSMS; «Helicos BioSciences», США). Цей метод є аналогічним описаному вище в методиках другого покоління, але без етапу створення клональної бібліотеки. На сьогодні компанія «Helicos BioScience»s припинила своє існування, і зазначена технологія не підтримується.

4) Сиквенування одиничних молекул у реальному часі (Single Molecule RealTime, SMRT; «Pacific BioSciences», США). Принцип методу заснований на добудові в режимі реального часу комплементарної одноланцюгової матриці ланцюга ДНК-полімеразою, закріпленої на дні спеціальних комірок, при цьому сигнал від кожного приєднаного нуклеотиду, міченого певною міткою, яка світиться, фіксується приладом (<http://www.pacificbiosciences.com/>).

5) Сиквенування за рахунок переміщення ДНК через нанопори («Oxford Nanopore Technologies», Англія). В основі методу лежить реєстрація електродними змінами йонного струму, що викликаються проходженням одноланцюгової ДНК через нанопору в тонкій плівці під дією електричного поля. Причому самі пори можуть мати як природне (у клітинних мембранах), так і штучне походження. Для кожного з нуклеотидів зміна струму є специфічною, що і можна використати для визначення послідовності ланцюгів

довжиною до декількох сотень мономерів. (<https://nanoporetech.com/>). Існують також інші варіанти реалізації сиквенування ДНК через нанопори, але на сьогодні науково-дослідні розробки нанопорних сиквенаторів знаходяться на стадії розробки.

Окрім вищенаведених методів на сьогодні також розробляються інші підходи, як то **метод коливань, сиквенування в полі, яке обертається** тощо. Але ці методики поки що не дали достатньо позитивних результатів для того, щоб вважати їх сучасними популярними методами визначення послідовності ДНК і РНК.

Таким чином, сучасні методи сиквенування продовжують активно розвиватися й вдосконалюватися для виконання різнопланових завдань, пов'язаних із визначенням нуклеотидної послідовності ДНК, а також із метою збільшення продуктивності, швидкості та точності сиквенування.

Первинні («сирі») дані сиквенування - це величезний набір невеликих послідовностей, довжина та якість яких залежать від технічних характеристик сиквенаторів, а також від способу приготування конкретних зразків. Якість послідовностей можна контролювати, наприклад, за допомогою програмного пакету «FastQC». Отримані послідовності по можливості фільтруються: відрізаються кінцеві ділянки, які часто мають велике число помилок через недосконалість технологій сиквенування, і видаляються адаптерні послідовності, які потрібні для здійснення реакцій при сиквенуванні, однак не несуть змістового навантаження для подальшого аналізу (наприклад, за допомогою «Trimmomatic» або «sickle»); потім коригуються помилки («Bloom», «Lighter»). Наприклад, при повноекзомному сиквенуванні (сиквенування всіх білок-кодуючих генів у геномі (тобто екзома) відфільтровані послідовності картуються на геном людини (тобто визначається місце в геномі, якому відповідала б кожна конкретна послідовність), потім вони по можливості складаються в більш довгі послідовності, які відповідають окремим екзомам. Далі в екзонах можна шукати поліморфізми, інсерції, делеції та інші мутації. На сьогодні існує безліч програм, які здійснюють кожен

етап підготовки даних сиквенування та їх аналізу, але більшість із них вимагає значних обчислювальних потужностей, так як об'єм одержуваних даних дуже великий.

У цьому розділі розкрито поняття сиквенування нуклеїнових кислот; детально, з прикладами, описано 3 основні покоління розвитку методів сиквенування НК, а також загальний алгоритм оброблення первинних даних сиквенування.

Контрольні запитання:

- 1) Наведіть методи визначення нуклеотидної послідовності ДНК різних поколінь.
- 2) Що таке методи сиквенування нового покоління (NGS, HTS)?
- 3) Яке програмне забезпечення використовується для порівняльного аналізу сиквенованих продуктів?
- 4) Вкажіть алгоритм порівняння сиквенсу виявленої гіпотетичної унікальної мутації з уже існуючими в базах послідовностями, зокрема у базах для SNP (однонуклеотидний поліморфізм).
- 5) У чому суть поєднання методів біоінформатики з методами молекулярної діагностики?

Опис лабораторних робіт

1. Порівняння якості та кількості тотальної ДНК при виділенні за допомогою рідкофазних і твердофазних методів

Мета роботи. Порівняти якість і кількість тотальної ДНК при виділенні за допомогою рідкофазних і твердофазних методів.

Матеріали та реактиви. Солі й компоненти буферних розчинів марок “о.с.ч.”, “ч.д.а.”, research grade, analytical grade.

При роботі використовуються: автоклавована охолоджена H_2O dist (взагалі може бути H_2O bi dist, демінералізована, деіонізована (наприклад, millipore – Milli-Q), із комерційних наборів, вільна від ДНК, РНК, РНКаз, ДНКаз, пірогенів); скляний посуд, митий у хромовій суміші (суміш концентрованої сірчаної кислоти та біхромату калію ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)); маніпуляції проводять в одноразових рукавичках без пудри.

Розчини для виділення ДНК:

0,9 % NaCl, буферний розчин для лізису клітин (10 mM ЕДТА; 50 mM трис – HCl, pH 7,6; 100 mM NaCl), 0,5 M ЕДТА, 10 % ДСН, протеїназа К (20 мг/мл), 5 M NaCl, водонасичений нейтральний фенол, водонасичений хлороформ, ізопропанол, $\text{CH}_5\text{N}_3^+\text{HCl}$ (гуанідин гідрохлорид), 3 M CH_3COONa , 70 % етанол, 96 % етанол.

Кров щура та його органи: печінка, підшлункова залоза, нирки, селезінка.

Увага! Техніка безпеки: при роботі з тваринним біоматеріалом на перших етапах екстракції НК (деструкція чи подрібнення матеріалу, лізис) необхідно використовувати засоби індивідуального захисту такі як маски та окуляри для уникнення алергічних реакцій на тваринні чужорідні білки.

Обладнання. Одноразові мікропробірки типу еппендорф на 1,5 і 2 мл (надалі – еппендорф) та одноразові «наконечники» із запобіжними фільтрами, штативи для еппендорфів, силікагелеві колонки, автоматичні дозатори змінного об'єму від 20 мкл до 200 мкл та від 200 мкл до 1000 мкл (сAMPLери), термостат, центрифуга для еппендорфів, перманентний маркер, скальпель, вакуумний

насос з колбою-пасткою, одноразові рукавички без пудри, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи.1) Виділення за допомогою **а) стандартної хлороформ-фенольної екстракції** та **б) сольового методу** належать до методик першого типу.

Виділення ДНК із крові. У білого щура масою 150 - 300 г отримати кров шляхом декапітації. Свіжу цільну кров обережно перемішати з 0,5 М ЕДТА (1:10 – 1 об'єм ЕДТА на 9 об'ємів крові). Для виділення ДНК перенести 200 - 300 мкл цільної крові з антикоагулянтном в еппендорф на льоду та додати 600 мкл стерильного охолодженого фізіологічного розчину - 0,9 % NaCl, ретельно перемішати й осадити клітини крові центрифугуванням на мікроцентрифузі 1 хв при 10000 g за кімнатної температури. Повторити етап відмивання ще раз. До осаду додати 600 мкл буферного розчину для лізису клітин, 10 % ДСН до концентрації 1 % (60 мкл). Ретельно перемішати й інкубувати отриману суміш впродовж 1 - 2 год при 65 °С або 18 год при 37 °С у термостаті. Перейти до підпунктів а) і б).

Виділення ДНК із тканини: Відрізати 30-40 мг замороженої тканини щура (печінка, підшлункова залоза, селезінка, нирки), подрібнити на малі шматочки та перенести до еппендорфу. До осаду додати 1 мл розчину для лізису клітин, ретельно перемішати шляхом пропускання шматочків тканини крізь «наконечник» самплера, додати 10 % ДСН до концентрації 1 % (100 мкл); бажано - протеїназу К до кінцевої концентрації 30 мкг/мл. Ретельно перемішати й інкубувати отриману суміш впродовж 1 - 2 год при 65 °С чи 18 год при 37 °С у термостаті. Надалі виділення проводять з використанням 2-х методів:

а) стандартної фенол – хлороформної екстракції [Blin and Stafford, 1976];

б) виділення ДНК із застосуванням NaCl (сольовий метод) [Малюта, 1996].

Для цього отриману за першим методом суміш після інкубації (0,660 мл для крові та 1,1 мл для тканини) змішати з рівним об'ємом суміші фенолу – хлороформу. Центрифугувати 5 хв при 10000 g на центрифuzі за кімнатної температури, перенести верхній водний шар у новий еппендорф, додати рівний

об'єм хлороформу, змішати, центрифугувати 3 хв при 10000 g. Аналогічно перенести верхню фазу в новий еппендорф. Після цього знову додати рівний об'єм хлороформу та провести всі маніпуляції відповідно до вищезазначених. Потім переосадити зразки ДНК: додати по 2,5 об'єми 96° етанолу та 3 М CH_3COONa до 0,15 М. Центрифугувати 7 хв при 10000 g та злити супернатант. Осад промити 500 мкл 70 % етанолу, потім 500 мкл 96 % етанолу, підсушити на повітрі (або за допомогою вакуумного насоса з колбою-пасткою) та розчинити в 200 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist. Отримані зразки ДНК (біля 10000 – 8000 п. н.) зберігати при -20°C до наступних маніпуляцій або від року до 3 років належним чином (без частих розморожувань-заморожувань тощо). Визначити вихід (якість і кількість) ДНК – див. пункт 4, 5.

Згідно з другим методом після інкубування з ДСН до суміші (0,660 мл для крові та 1,1 мл для тканини) додати 5 М NaCl (до кінцевої концентрації 1 М – 0,130 і 0,220 мл відповідно), ретельно перемішати, центрифугувати на центрифугі при кімнатній температурі 10000 g упродовж 10 хв. До супернатанту додати 1:0,7 об'єм ізопропанолу, потім вимотати ДНК скляною паличкою, промити в 70 % етанолі, 96 % етанолі і, підсушивши, розчинити в 500 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist. Отримані зразки ДНК (біля 10000 – 8000 п. н.) зберігати при -20°C від року до 3 років. Визначити вихід ДНК – див. пункт 4, 5.

2) Виділення ДНК за допомогою **силікагелевих технологій** належить до твердофазних методик.

Виділення ДНК із крові. Виділення високо-якісної геномної ДНК (більше 30000 п. н.) за допомогою силікагелевих мембран (комерційний набір) відбувається без використання токсичних матеріалів (фенол, хлороформ тощо) та довготривалих етапів преципітації в етанолі.

До 200 мкл цільної крові з антикоагулянтом додати 20 мкл протеїнази К, перемішати пробу. Додати 400 мкл буферного розчину для лізису клітин (містить $\text{CH}_5\text{N}_3^+\text{HCl}$ (гуанідин гідрохлорид)), ретельно перемішати, щоб отримати однорідну суспензію. Інкубувати отриману суміш при 65°C

упродовж 10 хв у термостаті для досягнення повного лізису проби. Додати 200 мкл 96° етанолу й перемішати суміш шляхом піпетуванням. Перенести суміш у колонку, центрифугувати на центрифuzі 1 хв при 6000 g, при кімнатній температурі. Зняти колонку з пробірки-еппандорф (в ній лишається розчин, який пройшов крізь колонку) і помістити в новий еппандорф на 2 мл. Додати 500 мкл буферного розчину для промивання I (містить $\text{CH}_5\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$, 96 % етанол), центрифугувати на центрифuzі 1 хв при 8000 g, вилити розчин і помістити колонку назад в еппандорф. Додати 500 мкл буферного розчину для промивання II (містить 96 % етанол), центрифугувати на центрифuzі 3 хв при 12000 g, вилити розчин, повторити центрифугування (1 хв) і помістити колонку в стерильний еппандорф на 1,5 мл. Налити 200 мкл буферного розчину для елюції на центр мембрани колонки, інкубувати 2 хв при кімнатній температурі, центрифугувати на центрифuzі 1 хв при 8000 g. Зняти колонку з еппандорфа. Використовувати виділену ДНК для подальших маніпуляцій або зберігати при $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (від року до 3 років). Визначити вихід ДНК – див. пункт 4, 5.

Оформлення результатів експерименту: у зошитах зробити висновок про візуальну успішність виділення ДНК (чи намоталась на скляну паличку); її колір та здатність до розчинення у H_2O dist (у разі незадовільного розчинення описати можливі чинники, які можуть заважати процесу).

2. Особливості роботи з РНК.

Виділення РНК за допомогою різних методів

Мета роботи. Виділити РНК за допомогою різних методів.

Матеріали та реактиви.

При роботі використовуються: автоклавована охолоджена $\text{H}_2\text{O dist}$ (взагалі може бути $\text{H}_2\text{O bi dist}$, демінералізована, деіонізована (наприклад, millipore – Milli-Q), із комерційних наборів, вільна від ДНК, РНК, РНКаз, ДНКаз, пірогенів); скляний посуд, митий у хромовій суміші (суміш концентрованої сірчаної кислоти та біхромату калію ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)); маніпуляції проводять в одноразових рукавичках без пудри.

Розчини для виділення РНК:

Розчин Д (4 М $\text{NH}_2\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2 \cdot \text{HSCN}$ (гуанидин ізотіоціанат), 25 мМ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (цитрат натрію), 0,5 % саркозил, 0,1 М 2-меркаптоетанол); водонасичений кислий фенол (до розплавленого при 68 °С фенолу додати 8-гідроксихінолін до кінцевої концентрації 0,1 %, розфасувати на аліквоти та зберігати при –20 °С; для приготування розчину фенолу додати рівний об'єм автоклавованої охолодженої $\text{H}_2\text{O dist}$ та ретельно перемішати); 2 М CH_3COONa рН 4,0; суміш хлороформ/ізоаміловий спирт у співвідношенні 49:1, ізопропанол, 70 % етанол, 96 % етанол, рідкий азот.

Кров щура та його органи: печінка, підшлункова залоза, нирки, селезінка.

Увага! Техніка безпеки: при роботі з тваринним біоматеріалом на перших етапах екстракції НК (деструкція чи подрібнення матеріалу, лізис) необхідно використовувати засоби індивідуального захисту, такі як маски та окуляри, для уникнення алергічних реакцій на тваринні чужорідні білки.

Обладнання. Одноразові еппендорфи на 1,5 і 2 мл та одноразові «наконечники» із запобіжними фільтрами, штативи для еппендорфів, силікагелеві колонки, автоматичні дозатори змінного об'єму від 200 мкл до 1000 мкл (самплери), термостат, центрифуга для еппендорфів, перманентний маркер, центрифуга для еппендорфів з охолодженням, ступка з товкачиком,

одноразові рукавички без пудри, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи.

1) Отримання РНК за методом Chomczynski [Chomczynski, 1987] належить до методик першого типу.

Виділення РНК із тканини. Після евтаназії щура потрібну тканину (до 100 мкг) швидко помістити в рідкий азот і гомогенізувати в ступці товкачиком також у рідкому азоті, негайно перенести гомогенат в еппендорфи об'ємом 2 мл та швидко додати 1 мл розчину Д при кімнатній температурі. Після чого суміш перенести на лід і послідовно додати 0,1 мл 2 М ацетату натрію, 1 мл водонасиченого кислого фенолу, 0,2 мл суміші хлороформ-ізоаміловий спирт. Після додавання кожного з компонентів суміш обережно перемішувати шляхом перевертання еппендорфа в руках до отримання однорідної суспензії. Отриману суспензію витримати на льоду 15 хв і центрифугувати на центрифугі при 10000 g і 4 °C протягом 20 хв. Верхню фазу, яка містить РНК, відібрати в інший еппендорф, додати 1 мл ізопропанолу (об'єм рівний до верх. фази), обережно перемішати, витримати 1 год при – 20 °C. Центрифугувати на центрифугі при 10000 g і 4 °C протягом 20 хв. До осаду РНК додати 0,3 мл розчину Д та 0,3 мл ізопропанолу (якщо ми брали спочатку саме 1 мл розчину Д), обережно перемішати, витримати 1 год. при – 20 °C (якщо працюємо з тканиною з підшлункової залози або тонкого кишечника – вищезазначений етап повторюємо ще раз). Центрифугувати за тих самих умов. Осад промити 70 %, потім 96 % етанолом, повністю позбавитися від етанолу за допомогою сэмплера та неповністю висушити осад, залишивши еппендорфи відкритими на декілька хвилин. Отриману тотальну РНК розчинити в 100 мкл автоклавованої охолодженої H₂O dist, додати 2,5 об'єми 96 % етанолу та зберігати при –20 °C до наступних маніпуляцій чи впродовж року. Визначити вихід РНК – див. пункт 4, 5.

2) Виділення РНК за допомогою **силікагелевих технологій** належить до методик другого типу.

Виділення РНК із крові. Виділення високо якісної РНК (OD_{260}/OD_{280} між 1,7 та 1,9, значення цілісності РНК (RIN, визначається на біоаналізаторі за допомогою відповідних наборів) ≤ 8) за допомогою силікагелевих мембран (комерційний набір) відбувається без використання токсичних матеріалів (фенол, хлороформ тощо) та довготривалих етапів преципітації в етанолі.

Центрифугувати 50 – 500 мкл цільної крові з антикоагулянтом (не можна заморожувати!) на центрифугі 400 g і 4 °C упродовж 5 хв. Злити супернатант. Ресуспендувати осад в 600 мкл буферного розчину для лізису клітин (містить гуанидинізоціанат), перемішати пробу на центрифугі-вортексу. Додати 200 мкл 96 % етанолу, ретельно перемішати, як зазначено на попередньому етапі. Перенести половину отриманого лізату в колонку на еппендорфі, центрифугувати на центрифугі 1 хв при 12000 g, при кімнатній температурі. Вилити розчин, що пройшов крізь колонку, і помістити колонку назад в еппендорф. Перенести лізат, що залишився, в колонку й центрифугувати, як описано вище. Зняти колонку з пробірки-еппендорф (у ній лишається непотрібний розчин, що пройшов крізь колонку) і помістити в новий еппендорф на 2 мл. Додати 700 мкл буферного розчину для промивання I (містить $CH_5N_3 \cdot HCl$ (гуанидин гідрохлорид), 96 % етанол), центрифугувати на центрифугі 1 хв при 12000 g, вилити розчин і помістити колонку назад в еппендорф. Додати 500 мкл буферного розчину для промивання II (містить 96 % етанол), центрифугувати на центрифугі 1 хв при 12000 g, знову 500 мкл буферного розчину для промивання II, центрифугувати на центрифугі 2 хв при 12000 g. Вилити розчин, помістити колонку назад в еппендорф, повторити центрифугування - 1 хв, але при 17000 g, вилити розчин і помістити колонку в стерильний, без РНКаз, еппендорф на 1,5 мл.

Налити 50 мкл H_2O dist без нуклеаз на центр мембрани колонки, центрифугувати на центрифугі 1 хв при 12000 g. Зняти колонку з еппендорфа. Використовувати виділену РНК для подальших маніпуляцій (тримати РНК на льоду) або зберігати при -20 – 80 °C залежно від строків використання (від року

до 3 років - відповідно до рекомендацій фірми-виробника). Визначити вихід РНК – див. пункт 4, 5.

Оформлення результатів експерименту: у зошитах зробити висновок про візуальну успішність виділення РНК (чи видно осад на стінці еппендорфа); чи розчинилась РНК у H_2O dist (у разі незадовільного розчинення запропонувати можливі чинники, які можуть заважати процесу).

3. Виділення ДНК із клітин *E. coli*

Мета роботи. Освоїти метод очищення ДНК бактерії від білків і ліпідів із використанням **стандартної фенол – хлороформної екстракції**.

Матеріали та реактиви. Поживне середовище Лурія-Бертані (LB) наступного складу (г / л): бактотріптон - 10 г / л, дріжджовий екстракт - 5 г / л, NaCl - 5 г / л, NaOH - 0,008 М, рН 7,5, ампіцилін - 100 мг / л (середовище стерилізують в автоклаві при 105 °С протягом 1 год); 0,9 % NaCl, суміш фенолу, насиченого водою, рН 8,0, із хлороформом в співвідношенні 1: 1; H₂O dist; штам *E. coli* Top 10, *XL1-Blue CanR* тощо.

Обладнання. Одноразові еппендорфи на 1,5 мл та одноразові «наконечники» із запобіжними фільтрами, штативи для еппендорфів, самплери від 20 мкл до 200 мкл та від 200 мкл до 1000 мкл, термостат-шейкер, центрифуга для еппендорфів, перманентний маркер, одноразові рукавички без пудри, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи. Інкубувати клітини *E. coli* в рідкому середовищі LB при помірному струшуванні (100-120 об/хв), при +37 °С, протягом 6 - 8 год., до стаціонарної фази росту. В еппендорф об'ємом 1,5 мл помістити 1 мл суспензії клітин. Клітини осадити центрифугуванням протягом 30 с при 10000-14000 g. Видалити супернатант.

Осад ресуспендувати в 1 мл 0,9 % NaCl. Клітини повторно осадити центрифугуванням протягом 30 с при 10000-14000 g і видалити супернатант. Осад ресуспендувати в 100 мкл 0,9 % NaCl і додати 100 мкл суміші фенолу з хлороформом. Ретельно перемішати й центрифугувати при 10000-14000 g протягом 15 хв.

Результатом проведеної роботи має стати поділ фаз в еппендорфі (рис. 31): нижня фаза містить суміш фенолу з хлороформом; ледь помітна інтерфаза - зруйновані клітини (клітинний дебрис) і денатуровані білки, ліпіди, мРНК; верхня (водна) фаза - розчин НК (ДНК та залишки деградованої РНК). Водну фазу в об'ємі 50 мкл перенести в стерильний еппендорф (бажано промити - переосадити - ДНК етанолом (див. вище)).



Рис. 31. Розподіл фаз в еппендорфі після центрифугування (запозичено з Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual).

Використовувати виділену ДНК для подальших маніпуляцій або зберігати при -20°C (від року до 3 років). Визначити вихід ДНК – див. пункт 4, 5.

Оформлення результатів експерименту: у зошитах зробити висновок про візуальну успішність виділення ДНК із клітин *E. coli* (чи відбувся розподіл фаз після центрифугування, чи присутня верхня (водна) фаза).

4. Якісний і кількісний аналіз препаратів нуклеїнових кислот за допомогою гель-електрофорезу в агарозному гелі

Мета роботи. Проаналізувати якість і кількість препаратів ДНК і РНК за допомогою гель-електрофорезу в агарозному гелі.

Матеріали та реактиви.

Електрофоретичні буферні розчини та розчини:

- 5 кратний TBE буферний розчин (1 кратний трис-боратний буферний розчин містить 0,089 М трис-борат, 0,089 М борну кислоту, 0,002 М ЕДТА, рН 8,0);
- розчин бромистого етидію (20 мг/мл): робоча концентрація для пост фарбування гелів – 10 мкг/мл;
- 6 кратний буферний розчин для нанесення проб (0,25 % бромфеноловий синій, 0,25 % ксилолціанол, 30 % гліцерин у H₂O dist);
- 1,0 % агарозний гель (до 1,0 г агарози додати 10 мл 5 кратного TBE буферного розчину, 90 мл H₂O dist та кип'ятити в мікрохвильовій печі до повного розчинення агарози).

Виділені препарати НК, 3 М CH₃COONa, 96 % етанол.

Обладнання. Джерело напруги, центрифуга для еппендорфів, резервуар для пластинки та буферного розчину, пластинка для заливання розпавленої агарози, мікрохвильова піч, гребінки, автоматичні дозатори змінного об'єму від 2 мкл до 20 мкл та від 20 мкл до 200 мкл (сAMPLери), одноразові еппендорфи на 1,5 мл та «наконечники», штативи для еппендорфів, перманентний маркер, транслюмінатор, цифровий фотоапарат, одноразові рукавички без пудри, посудина для скидання відпрацьованих «наконечників».

Хід роботи. Для визначення кількості та якості НК у препаратах застосовують два методи: попереднє визначення концентрації ДНК і РНК та їх якості за допомогою гель-електрофорезу в агарозному гелі та спектрофотометричний (див. пункт 5).

Приготувати 50 мл 1,0 % агарозного геля в 0,5 кратному TBE буферному розчині (до 1,0 г агарози додати 5 мл 5 кратного TBE буферного розчину, до 50 мл H₂O dist і кип'ятити в мікрохвильовій печі до повного розчинення агарози).

Підготувати форму для заливки агарозного геля: встановити форму на горизонтальній поверхні, певним чином закріпити над формою гребінку для формування лунок для проб - щоб між зубцями гребінки і дном форми залишалось 1 - 1,5 мм гелю. Обережно вилити розплавлений і дещо охолоджений розчин агарози в підготовану форму для формування геля, уникаючи утворення пухирців біля лунок. Після того, як гель остаточно затвердіє (приблизно 30 - 20 хв за кімнатної температури), повільно й обережно видалити гребінку під невеликим кутом нахилу (щоб не деформувати луночки) і помістити гель на платформі приладу для електрофорезу. Додати 350 мл буферного розчину для проведення гель-електрофорезу – TBE. Шар буферного розчину повинен покривати агарозний гель приблизно на 1 мм.

Виділені високомолекулярні зразки ДНК змішати перед нанесенням. По 5 мкл кожного із зразків виділеної РНК перед нанесенням переосадити в 2,5 об'ємах 96 % етанолу з додаванням 3 М CH₃COONa до 0,15 М (див. пункт **1, 1), а**)).

Змішати 1 мкл молекулярного маркера довжин (п.н.) разом із 9 мкл робочого TBE буферного розчину та 1,5 мкл 6-ти кратного буферного розчину для нанесення проб. Внести приготовану пробу в 2 лунку геля під електрофорезним буферним розчином. У 3 лунку внести 5 мкл плазмід (pBR322, pUC19 чи рекомбінантної плазмід на основі pUC19 із клонованою вставкою (наприклад, розмір – 6 т.п.н.)) з 5 мкл робочого TBE буферного розчину та 1,5 мкл 6-ти кратного буферного розчину для нанесення проб. У 4 і 5 лунки внести маркер молекулярних мас: ДНК щура або фага λ , або великої рогатої худоби тощо в кількості 200 нг і 400 нг разом із вищезазначеними компонентами у відповідній кількості. У наступні лунки внести 5 мкл проб виділених ДНК і РНК з іншими вищезазначеними компонентами у відповідній кількості.

Закрити прилад для електрофорезу покриттям та підключити до джерела напруги. Встановити відповідні показники сили струму та напруги (показник напруженості - не більше 5 В/см (рахується як відношення показника напруги до відстані між електродами приладу). Розділення проб ДНК проводити 60 - 80 хв, спостерігаючи за рухливістю барвників (наприклад, ксилолціанолу та бромфенолового синього) у гелі.

Пофарбувати гель водним розчином бромистого етидію (10 мкг/мл) упродовж 15 хв, промити проточною водою. Можна знизити фонову флуоресценцію (обумовлену незв'язаним барвником) шляхом витримання гелю в проточній H_2O протягом 10 хв.

Увага! Техніка безпеки: маніпуляції з розчином бромистого етидію проводять в одноразових нітрилових рукавицях (обов'язково використовуються й інші засоби індивідуального захисту – маска і окуляри і, звісно ж, халат). Він є сильним мутагеном (також вважається канцерогеном и тератогеном), тому необхідно попередити його потрапляння на шкіру або слизові оболонки. У випадку потрапляння бромистого етидію на шкіру або слизові оболонки необхідно промити їх водою з милом і звернутися до викладача за подальшими вказівками.

Помістити гель на вікно прилада з ультрафіолетовою лампою (трансілюмінатор) із довжиною хвилі 254 нм, закрити захисний пластиковий екран, увімкнути прилад та сфотографувати в УФ – світлі цифровим фотоапаратом або іншим електронним пристроєм із камерою.

Увага! Техніка безпеки: фотографування гелів і візуальний контроль розділення НК за допомогою трансілюмінатора здійснюють у спеціальних окулярах або за допомогою захисного пластикового екрану. Ультрафіолетове випромінювання згубно впливає на слизові оболонки ока!

Зробити висновок про якість виділеної ДНК та залежність швидкості міграції НК від певних параметрів. Кількісну обробку отриманих результатів здійснити за допомогою комп'ютерної програми «TotalLab», «RFLP Scan», «Image J» тощо. Якість отриманих препаратів РНК визначити за наявністю

електрофоретично розділених недеградованих смуг, що відповідають 18S та 28S рРНК.

Оформлення результатів експерименту: у зошит вклеїти фото з отриманими результатами та зробити висновок про кількість (порівняти кількість виділеної НК із маркером певної концентрації) та якість (відсутність фрагментації, шлейфа замість мажорної смуги для ДНК; та наявність двох смуг рРНК (28 S і 18 S) для препаратів тотальної РНК) отриманих ДНК і РНК.

5. Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК і РНК

Мета роботи. Визначити спектрофотометрично концентрацію нуклеїнових кислот.

Матеріали та реактиви. Виділені препарати НК, H₂O dist.

Обладнання. Спектрофотометр, кювети, самплери від 2 мкл до 20 мкл, від 20 мкл до 200 мкл та від 200 мкл до 1000 мкл, одноразові еппендорфи на 1,5 мл та «наконечники», штативи для еппендорфів, перманентний маркер, одноразові рукавички без пудри, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи. Для тотального визначення кількості НК встановлення концентрації проводять на спектрофотометрі.

Узяти кварцеву кювету на 1 мл, довжина оптичного шляху – 1 см. Ретельно її відмити детергентом, ополоснути H₂O dist (якщо кювета дуже забруднена, вимочити ~2 год у суміші метанол: HCl = 1:1).

Виділені високомолекулярні зразки ДНК розмішати перед нанесенням. По 5 мкл кожного із зразків виділеної РНК перед нанесенням переосадити в 2,5 об'ємах 96 % етанолу з додаванням 3 М CH₃COONa до 0,15 М (див. пункт 1, 1), а)). Розвести виділені зразки ДНК у 40 разів (25 мкл ДНК і 975 мкл H₂O dist), а отримані препарати РНК у 10 разів (100 мкл РНК і 900 мкл H₂O dist).

Правила роботи зі спектрофотометром:

1. При проведенні процедури вимірювання концентрації препарату НК необхідно чітко дотримуватися інструкції до приладу.

2. Кювети та нерухомий модуль приладу слід тримати в чистоті. Після вимірювання необхідно ретельно вимити кювети в H₂O dist, бажано обполоснути в H₂O bi dist і висушити на повітрі, поклавши кювету догори дном на фільтрувальний папір. У спектрофотометра для мікрооб'ємів протерти нерухомий модуль змоченою в H₂O dist серветкою та витерти насухо.

На приладі виміряти поглинання D H₂O dist, яка використовується в якості референса, в областях із довжинами хвиль 260, 280 і 230 нм. Виміряти

поглинання отриманих розчинів ДНК і РНК при вищезазначених довжинах хвиль. Ретельно відмити кювету детергентом, ополоснути H₂O dist. Виміряти поглинання H₂O dist в області з довжиною хвилі 330 нм. Виміряти поглинання отриманих розчинів ДНК і РНК при вищезазначеній довжині хвилі. Розрахувати концентрацію ДНК і РНК в пробах на основі поглинання при 260 нм і довжині оптичного шляху – 1 см: **OD₂₆₀** = 1 відповідає 50 мкг/мл дволанцюгової ДНК і 40 мкг/мл РНК. Концентрацію НК розрахувати за формулою:

$$C_{\text{ДНК}} (\text{мкг/мкл}) = [\text{OD}_{260} \times 50 \text{ мкг/мл} \times 40 (\text{ступінь розведення})] / 1000 (\text{мкл});$$

$$C_{\text{РНК}} (\text{мкг/мкл}) = [\text{OD}_{260} \times 40 \text{ мкг/мл} \times 10 (\text{ступінь розведення})] / 1000 (\text{мкл}).$$

Розрахувати відношення величини **OD**, що вимірювали при 260, до величини **OD**, яку одержували при 280 нм (**OD₂₆₀/OD₂₈₀**), і відношення величини **OD**, що вимірювали при 260, до величини **OD**, яку одержували при 230 нм (**OD₂₆₀/OD₂₃₀**), що свідчать про чистоту НК. Потім розвести зразки ДНК і РНК H₂O dist до концентрації 50 нг/мкл і зберігати при – 20 °С до наступних маніпуляцій або впродовж року (зокрема, РНК зберігати під 96 % етанолом – див. пункт 2.).

Оформлення результатів експерименту: в зошитах зробити висновок про кількість (на основі отриманих значень **OD₂₆₀**) та якість (на основі отриманих значень **OD₂₆₀/OD₂₈₀**, **OD₂₆₀/OD₂₃₀** та **OD₃₃₀**) отриманих ДНК і РНК. Порівняти одержані результати з даними, отриманими після гель-електрофорезу в агарозі (див. пункт 4).

6. Рестрикційний аналіз геномної та векторної ДНК для ДНК фінгерпринтингу. Віртуальна рестрикція

Мета роботи. Провести рестрикційний аналіз геномної та векторної ДНК для ДНК фінгерпринтингу. Провести віртуальну рестрикцію.

Матеріали та реактиви. Виділені препарати ДНК, рестриктази, плазміди, 3 М CH_3COONa , 96 % етанол, H_2O dist.

Обладнання. Одноразові еппендорфи на 1,5 мл та одноразові «наконечники» із запобіжними фільтрами, штативи для еппендорфів, самплери від 2 до 20 мкл та від 20 мкл до 200 мкл, перманентний маркер, центрифуга для еппендорфів, одноразові рукавички без пудри, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи. **Рестрикція геномної ДНК для отримання геномних «дактиловідбитків».** При рестрикції **важливо, щоб концентрація ДНК була не більше 1 мкг в 5 мкл реакційної суміші, а концентрація фермента не більше 5 % суміші.** По 10 мкг (100 нг/мкл) кожного зразка геномної ДНК у стерильному еппендорфі перед рестрикцією переосадити 2,5 об'ємах 96 %етанолу та додати CH_3COONa до 0,15 М (див. пункт 1, 1), а)). Центрифугувати 7 хв на мікроцентрифузі при 10000 g, при кімнатній температурі. Промити осад 200 мкл 96 % етанолу, висушити впродовж 15 хв.

Вийняти реактиви (окрім фермента - *дотримуватись правил зберігання!*) із морозильної камери (-20°C), помістити їх на лід, розморозити й обережно перемішати.

Внести 106 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist, залишити осад ДНК (10 мкг) розчинятися впродовж 20 хв при кімнатній температурі, обережно просуспендувати. Додати до суміші 12 мкл 10-ти кратного буферного розчину R^+ (містить 10 мМ трис – HCl (рН 8,5 при 37°C)), 10 мМ MgCl_2 , 100 мМ KCl , 0,1 мг/мл БСА) і швидко, тримаючи на льоду, 2 мкл (20 одиниць активності, активність - 10 одиниць активності/мкл) рестриктази *MvaI*. Сумарний об'єм

суміші повинен становити 120 мкл. Перемішати вміст еппендорфа, обережно постукуючи пальцем по дну пробірки.

Потрібно знати, що **1 одиниця рестриктази - це кількість фермента, необхідна для повного розщеплення 1 мкг ДНК бактеріофага λ за 1 годину в певному буферному розчині за оптимальної температури (специфічної для певної рестриктази) в об'ємі 20 мкл.** Як правило, розщеплення рестриктазами впродовж більш довгого періоду часу не призводить до ускладнень (наприклад, «зіркової» активності фермента (рестрикція за будь-якими неспецифічними сайтами), якщо в препараті рестриктази відсутні домішки ДНКаз чи екзонуклеаз (що буває дуже рідко у фірм-виробників). Також часто кількість фермента може бути зменшено за рахунок збільшення часу інкубування. При обробці великих кількостей ДНК це дає суттєву економію, адже рестриктази – дорогі ферменти.

Після внесення рестриктази інкубувати суміш упродовж 18 год при 37 °С. Реакцію частково зупинити прогріванням при 80 °С упродовж 10 хв. Переосадити отримані рестрикти в 300 мкл 96 % етанолу з 8 мкл 3 М CH_3COONa , центрифугувати 7 хв при 10000 g, за кімнатної температури, обережно відібрати супернатант, без промивання висушити та розчинити в 25 мкл автоклавованої охолодженої $\text{H}_2\text{O dist}$. Отримані фрагменти ДНК зберігати при -20° С до проведення гель-електрофорезу.

Проаналізувати продукти рестрикції (по 15 мкл) за допомогою горизонтального гель-електрофорезу в 1 % агарозному гелі, в 0,5 кратному TBE буферному розчині, 38 год (при меншому часі розділення продукти рестрикції не будуть мати вигляд чітких смуг, а лише «шлейф») при 2 В/см (див. пункт 4). Такі умови забезпечували розділення смуг у діапазоні 2 - 25 т.п.н.

Рестрикція плазмід. Перед рестрикцією плазмиду pUC18/19 (2 мкг) переосадити в 2,5 об'ємах 96 % етанолу з додаванням CH_3COONa до 0,15 М (див. вище).

Вийняти реактиви (окрім ферментів - *дотримуватись правил зберігання!*) із морозильної камери (-20° С), помістити їх на лід, розморозити й обережно

перемішати. Внести 17 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist, обережно просуспендувати. Додати до суміші 2 мкл 10-ти кратного буферного розчину «Tango™» (містить 33 мМ трис – ацетат (рН 7,9 при 37 °C)), 10 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 66 мМ CH_3COOK , 0,1 мг/мл БСА) і швидко, тримаючи на льоду, 1 мкл (10 одиниць активності, активність - 10 одиниць активності/мкл) рестриктази *HincII*, яка щепить плазмиду за одним сайтом. Сумарний об'єм суміші повинен становити 20 мкл. Перемішати вміст еппендорфа, обережно постукуючи пальцем по дну пробірки. Інкубувати суміш упродовж 1 год при 37 °C у термостаті.

Реакцію зупинити прогріванням при 65 °C упродовж 10 хв, переосадити рестрикти в 2,5 об'ємах 96 % етанолу з додаванням CH_3COONa до 0,15 М.

Проаналізувати продукти рестрикції (по 15 мкл) за допомогою горизонтального **гель-електрофорезу** в 1 % агарозному гелі, в 0,5 кратному TBE буферному розчині, 1 год при 5 В/см (див. пункт 4).

Оформлення результатів експерименту: після проведення гель-електрофорезу в зошит вклеїти фото з отриманими результатами та зробити висновок про успішність виконання рестрикційного аналізу плазмиди та геномної ДНК (наявність у гелі відповідної кількості рестриктів (смуг) для кожної певної рестриктази).

Додаткове завдання. За каталогом «Thermo scientific molecular biology tools product guide» підібрати оптимальні умови проведення рестрикційного аналізу (кількість ферменту, буферний розчин, температура та час інкубування, умови зупинення реакції) для плазмиди pUC18/19 рестриктазами *MspI*, *HinfI* та *HindIII* (рис 32, 33).

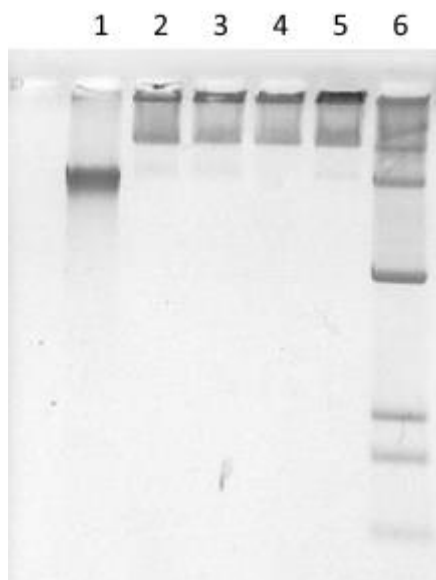


Рис. 32. 1 – ДНК корови; 2 – 6 рUC19/*HinfI* (різний ступінь “недовару” внаслідок інкубування впродовж меншої кількості часу, ніж рекомендовано фірмою-виробником), 2 % агароза (люб’язно надано Дибковим М. В.).

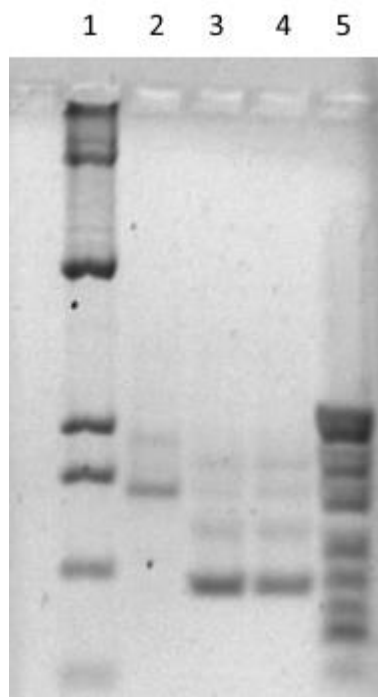


Рис. 33. 1 - рUC19/*HinfI* (оптимальні умови рестрикції, краще розділено електрофоретично та пофарбовано; 3 - 4 (рUC19/*MspI* різний ступінь “недовару” внаслідок інкубування впродовж меншої кількості часу, ніж

рекомендовано фірмою-виробником); 5 — pUC19/MspI - оптимальні умови рестрикції, проте нанесено забагато в лунку (люб'язно надано Дибковим М. В.).

Користуючись даними з вищезазначеного каталогу стосовно сайтів рестрикції для зазначених рестриказ намалювати карти рестрикції pUC18/MspI, pUC19/MspI, pUC18/HinfI, pUC19/HinfI, pUC18/HindIII, pUC19/ HindIII.

На їх основі обрахувати розмір одержаних фрагментів. Порівняти отримані результати з даними, одержаними при віртуальній рестрикції за допомогою інтернет-ресурсу (наприклад, <http://www.restrictionmapper.org/>).

Для віртуальної рестрикції потрібно ввести повну нуклеотидну послідовність плазміди (**Sequence Info**), зазначити, що конформація – **кільцева** (**Conformation**), обрати бажаний фермент (**Select Individual Enzymes**), назвати обрану послідовність для рестрикції (**Name your sequence**) (рис. 34).

The screenshot displays the RestrictionMapper web application interface. At the top, a yellow banner reads "Welcome to RestrictionMapper - on line restriction mapping the easy way." Below this, a subtitle states: "Maps sites for restriction enzymes, a.k.a. restriction endonucleases, in DNA sequences. Also does virtual digestion." The main interface is divided into four vertical panels:

- Conformation:** Features a radio button for "Circular" (selected) and "Linear". Below, a "Sort By" section lists "frequency", "overhang", and "name". A "Filter By" section includes "Maximum Cuts" set to "all" and "Minimum Site Length" set to "5".
- Include:** Contains a "Select Individual Enzymes" dropdown menu with "HinfI" selected. Below the menu are radio buttons for "All Commercial" (selected), "NEB only", and "Prototypes Only". Checkboxes for "5' overhang", "3' overhang", and "blunt" are all checked. At the bottom, radio buttons for "All Isoschizomers" are visible.
- Sequence Info:** Includes instructions "No non-base letters. Numbers and spaces OK." and a text area labeled "Paste Sequence Here" containing the pUC18 plasmid sequence. Below the text area is a field labeled "Name your sequence" with "pUC18" entered.
- Menu:** Contains three buttons: "Map Sites", "Virtual Digest", and "Reset Form".

A sidebar on the left contains links for "Help", "FAQ", "What's New?", "Code", "Contact", "Automate RestrictionMapper", "Other Free Molecular Biology Resources", and "Dilution Calculator".

Рис. 34. Вікно з інформацією про вибір певної рестриктази (*HinfI*) та алгоритм введення певної послідовності (плазміда pUC18) для віртуальної рестрикції з інтернет-ресурсу RestrictionMapper. Пояснення в тексті

Або обрати певні характеристики ферментів (**Filter By**): максимальна кількість розрізів (**Maximum Cuts**), мінімальний розмір сайту рестрикції (**Minimum Site Length**) тощо; якщо всі ферменти, то лише прототипи чи можна застосувати **ізошизомери** (це пари ендонуклеаз рестрикції, які мають специфічність до розпізнавання однакових послідовностей, але іноді відрізняються наявністю метилованих нуклеотидних залишків, і ріжуть ці послідовності в однакових місцях; їх виділяють із різних штамів бактерій і тому різні ізошизомери можуть вимагати різних умов реакції) - (**Prototypes Only. All Isoschizomers**) (рис. 35).

Welcome to RestrictionMapper - on line restriction mapping the easy way.

Maps sites for restriction enzymes, a.k.a. restriction endonucleases, in DNA sequences. Also does virtual digestion.

Conformation

Circular ☒ Linear ☐

Sort By

1. frequency 2. overhang 3. name

Filter By

Maximum Cuts all Minimum Site Length 5

Include

Select Individual Enzymes

AccII
AccIII
Acc16I
Acc36I
Acc65I
Acc113I
AccB1I

☒ All Commercial ☐ NEB only

☒ 5' overhang ☒ 3' overhang ☒ blunt

☒ Prototypes Only ☐ All Isoschizomers

Sequence Info

No non-base letters. Numbers and spaces OK.

Paste Sequence Here

atgttgaaactcactactctt
cctttttcaatattattgaag
catttat
cagggttattgtctcatgagc
ggatacatatttgaatgtatt
tagaaaaataaacaataagg
gttcgc
gcacatttccccgaaaagtgc
cacctgacgtctaagaacca
ttattatcatgacattaacct
ataaaaa
taggcgtatcacgaggccctt
tcgtc

Name your sequence

pUC18

Menu

Рис. 35. Вікно з інформацією про різні характеристики ендонуклеаз рестрикції та засоби для отримання карт рестрикції та результатів віртуальної рестрикції з інтернет-ресурсу RestrictionMapper. Пояснення в тексті

Далі перейти (рис. 35) в меню (**Menu**), де потрібно обрати: **Map Sites** – карта сайтів рестрикції обраної послідовності обраним ферментом, де деталізовано наступну інформацію: перш за все, чи «ріже» обраний фермент задану послідовність (у цьому випадку буде позначка біля опції Noncutters); відомості стосовно послідовності сайту рестрикції, його довжини (**Sequence**).

Site length); кількості сайтів рестрикції (частоти), місць їх знаходження на послідовності, що зазнала віртуальної рестрикції (**Frequency. Cut Positions**); а також типу кінців, які утворилися (**Overhang** (тупі чи липкі – blunt or sticky)) (рис. 36).

Name: pUC18

Conformation: circular

Enzymes: AluI

Noncutters:



Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
AluI	AGCT	4	blunt	16	44, 63, 308, 401, 446, 471, 566, 630, 748, 974, 1064, 1110, 1367, 1888, 1988, 2051

Name: pUC18

Conformation: circular

Enzymes: HinfI

Noncutters:

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
HinfI	GATC	4	five_prime	6	420, 641, 706, 781, 1177, 1694

Рис. 36. Карта сайтів рестрикції на плазміді pUC18 для ендонуклеаз рестрикції *HinfI* та *AluI* (інтернет-ресурс RestrictionMapper). Пояснення в тексті

Або обрати **Virtual Digest** – саме результати віртуальної рестрикції: **Length** (довжина відрізаного фрагменту послідовності, що утворився), **5' Enzyme**, **3' Enzyme** (назва обраного ферменту, який фланкує послідовність з обох боків), **5' Base** (місце закінчення рестрикції на послідовності); **3' Base** (місце початку рестрикції на послідовності); **Sequence** (послідовність полінуклеотидного відрізаного фрагмента) (рис. 37).

pUC18 digest

Enzymes: *Hin*I

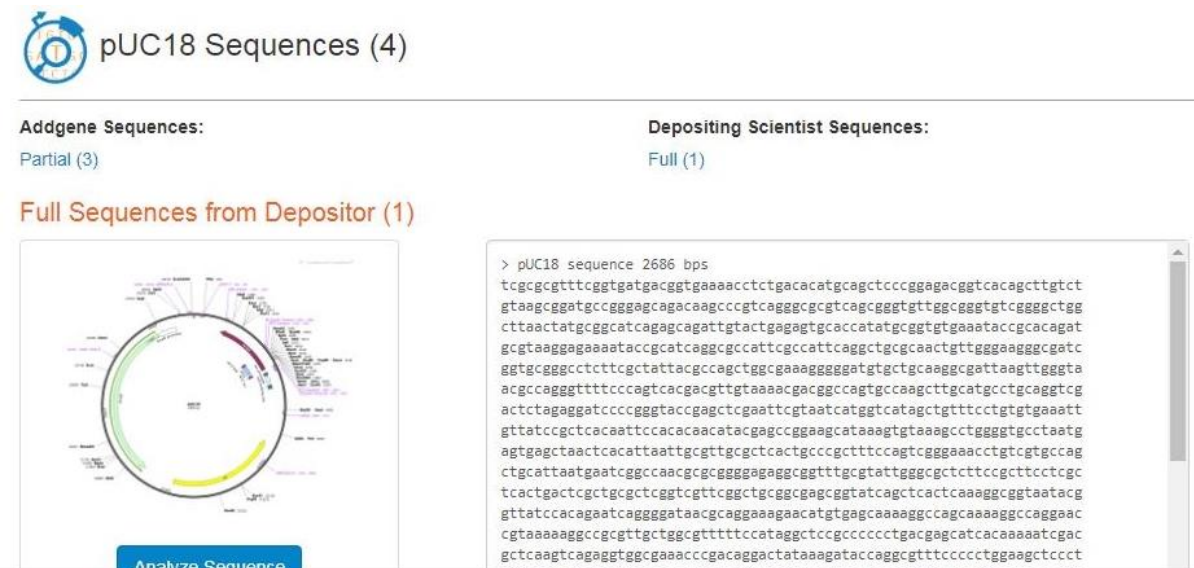
Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
1412	<i>Hin</i> I	1695	<i>Hin</i> I	420	ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGGCTTA CCATCTGGCC
					
					CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCAGGC TCCAGATTTA
					TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC
					AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG
					TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA
					GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG
					TTCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG
					CGGTTAGTTC TTTCGGTCTT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA
					GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAAGTTCAT
					GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT

Рис. 37. Фрагмент результатів віртуальної рестрикції плазмиди pUC18 рестриктазою *Hin*I з інтернет-ресурсу RestrictionMapper. Пояснення в тексті

Сайти рестрикції ферментів, як і повну нуклеотидну послідовність для віртуальної рестрикції, можна знайти на сайті:

для pUC18 (рис. 37):

<https://www.addgene.org/50004/sequences/>



pUC18 Sequences (4)

Addgene Sequences:
Partial (3)

Depositing Scientist Sequences:
Full (1)

Full Sequences from Depositor (1)

> pUC18 sequence 2686 bps

```

tcgcgcgtttcggatgacggtagaaacacctctgacacatgcagctccggagacgggtcacagcttgcct
gtaagcggatgccggagcagacaagcccgtcaggcgcgtcagcgggtgttcgggtgttcgggctgg
cttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtcacacatagcgggtgtgaaataccgacagat
gcgtaaggagaaaataaccgcatcagcggcattcgcattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatc
gggtcgggctcttctgctattacgcccagctggcgaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttggta
acgcccagggtttcccgatcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaaagcttgcatgctgcaggtcg
actctagaggatccccgggtaccgagctcgaattcgaatcatgggtcatagctgtttcctgtgtgaaatt
gttatccgctcacaaattccacacacatcagcgggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaag
agtgagctaactcacattaattgctgtgcgtcactgccgctttccagtcgggaacacctgtcgtgccag
ctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagagggcggttgcgtattggcgctcttccgcttccctgc
tcactgactcgtgcgtcgttcgttcggctgcggcgagcggatcagctcactcaaaaggcggtataacg
gttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaac
cgtaaaaggcggtgtgctggcgttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaaaatcgac
gctcaagtcagaggtggcgaaccgcagaggactataaagatacaggcggtttccctggagctccct

```

Analyze Sequence

Рис. 37. Частина вікна з інформацією про різні характеристики плазмиди pUC18 (повна послідовність, сайти рестрикції, ферменти рестрикції тощо) з інтернет-ресурсу addgene. Пояснення в тексті

для pUC19:

<https://www.addgene.org/50005/sequences/>

Також на зазначеному ресурсі можна провести аналіз обраної плазміди: знайти потрібні праймери для ПЛР (з урахуванням майбутньої лігваної вставки в MCS); дізнатися про місце розташування та джерело походження кожного структурно елемента плазміди (ori (оріджин), AmpR (ген стійкості до ампіциліну) тощо), провести BLAST аналіз (див. далі) тощо.

Оформлення результатів експерименту: у зошиті порівняти обраховані результати рестрикційного аналізу векторної ДНК, одержані за допомогою даних у каталозі, із результатами віртуальної рестрикції за допомогою інтернет-ресурсу, як запропоновано вище (порівняти кількість рестриктів (смуг) для кожної певної рестриктази та отриманий розмір фрагментів).

7. Реакція лігування за тупими кінцями

Мета роботи. Провести лігування за тупими кінцями плазмід рUC19 після рестрикції та певної послідовності гена (або синтезованої конструкції з бажаною послідовністю, наприклад, на основі синтезованих праймерів)

Матеріали та реактиви. Розрізана плазміда рUC19, лігаза бактеріофага T4 (на відміну від лігази *E. coli* дозволяє лігувати послідовності як за тупими, так і за липкими (один із ланцюгів дволанцюгової молекули ДНК виступає)), певна вставка (наприклад, на основі лігованих праймерів); 50 % розчин поліетиленгліколю (PEG 4000 solution), водонасичений хлороформ, 3 М CH_3COONa , 96 % етанол, автоклавована H_2O dist.

Обладнання. Одноразові еппендорфи на 1,5 мл та одноразові «наконечники» із запобіжними фільтрами, штативи для еппендорфів, самплери від 2 до 20 мкл та від 20 мкл до 200 мкл, перманентний маркер, термостат, одноразові рукавички без пудри, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи. Лігування за тупими кінцями провести, використовуючи 10 кратний буфер для T4 лігази – 2 мкл, 1 мкл розрізаної плазмід рUC19 (50 нг), 2 мкл вставки на основі лігованих праймерів (80 нг), 2 мкл 50 % PEG 4000 solution, 1 мкл фермента (5 од.) та 14 мкл. автоклавованої H_2O dist. Реакційну суміш інкубувати 18 год при +18 °C.

Потім провести екстракцію рекомбінантної плазмід шляхом додавання 20 мкл хлороформу та переосадити зразки в 2,5 об'ємах 96° етанолу з додаванням CH_3COONa до 0,15 М.

Наявність вставки (ліговану послідовність, наприклад, – приблизно 450 п.н.) перевірити спочатку за допомогою **гель-електрофорезу** (порівнювали розмір розрізаної нативної плазмід з рекомбінантною розрізаною (рестриктаза *HincII*) у 0,8 % агарозному гелі у 0,5 кратному TBE буфері, при напруженості 5 - 10 В/см). А потім наявність вставки перевірити за допомогою **класичної ПЛР**.

Оформлення результатів експерименту: після проведення гел-електрофорезу в зошит вклеїти фото з отриманими результатами та зробити висновок про успішність виконання лігування (порівняти розмір розрізаної нативної плазмід з рекомбінантною розрізаною).

8. Отримання компетентних клітин *E. coli* та їх трансформація плазмідною ДНК

Мета роботи. Отримати компетентні клітин *E. coli* та трансформувати їх плазмідною ДНК.

Матеріали та реактиви. Амінопептидне рідке поживне середовище середовище (на 150 мл: 100 мл води, 50 мл амінопептиду, 1,5 г NaCl); амінопептидне поживне середовище з 1,6 % агаром (на 150 мл: 100 мл води, 50 мл амінопептиду, 1,5 г NaCl, 2,4 г агару); поживне середовище Лурія-Бертані (LB) наступного складу (г / л): бактотріптон - 10 г / л, дріжджовий екстракт - 5 г / л, NaCl - 5 г / л, NaOH - 0,008 М, рН 7,5, ампіцилін - 100 мг / л (середовище стерилізують в автоклаві при 105 °С протягом 1 год); 40 % глюкоза, канаміцин, ампіцилін, стерильний CaCl₂ (50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, рН 8,0), 10 % X-Gal, 0,4 М IPTG, плазмід рUC19; штам *E. coli XL1-Blue CanR* або інші.

Обладнання. Одноразові еппендорфи на 1,5 мл та одноразові «наконечники» із запобіжними фільтрами, штативи для еппендорфів, сэмплери від 2 мкл до 20 мкл, від 20 мкл до 200 мкл та від 200 мкл до 1000 мкл, центрифуга для еппендорфів із примусовим охолодженням, перманентний маркер, чашки Петрі, термостат-шейкер, ламінарний бокс, льодова баня, водяна баня, одноразові рукавички без пудри, шпатель, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи. Усі маніпуляції з клітинами проводити в ламінарному боксі. Культуру *E.coli* (штам *XL1-Blue CanR*, що має стійкість до канаміцину) інкубувати 18 год при +37 °С (у термостаті) у 3 мл амінопептидного рідкого поживного середовища з канаміцином. Отримані клітини розвести, за Маніатісом [Maniatis et al, 1982], в 100 разів: для цього до 25 мл поживного середовища LB додати 250 мкл культури *E. coli*, 125 мкл 40 % глюкози, 8 мкл канаміцину (робоча концентрація 30 мкг/мл) та інкубувати 3 год при помірному струшуванні (100-120 об/хв), при +37 °С, до оптичної густини клітин $D=0,3$.

***Визначення щільності та кількості клітин у клітинних культурах:** за допомогою спектрофотометра можна визначити кількість клітин у середовищі (концентрація клітин), використовуючи світлопоглинальні (абсорбція) властивості клітинної культури, як бактеріальної, так і еукаріотичної. Клітинна культура має певні оптичні властивості, що визначають її стан, щільність тощо. У разі бактеріальної або еукаріотичної культури клітин оптична густина, виміряна при 600 нм, відображає концентрацію клітин у середовищі. По суті, в цьому випадку оптичну густину культури при 600 нм визначає ефект світлорозсіювання; яке, у свою чергу, прямо пропорційне концентрації клітин у середовищі. Визначення концентрації клітин у середовищі можна проводити в кюветах об'ємом 200 мкл (довжина оптичного шляху 1 мм) або 1000 мкл (довжина оптичного шляху 10 мм). Наприклад, для штамів *E.coli DH5a*, *XL1 Blue* оптична густина при концентрації 5×10^7 клітин / мл становить 0,6 при 600 нм ($OD_{600} = c[\text{кліт./мл}] \times 108/k$; для *XL-1Blue* $k = 2.0$).

Вирощену культуру перенести в льодову баню на 5 хв, після чого клітини осадити при 4500 g на центрифугі із примусовим охолодженням +4 °C, 5 хв. Злити супернатант та розчинити осад у 0,5 вихідного об'єму охолодженого стерильного CaCl_2 . Тримати клітини на льоду 20 хв, центрифугувати при 4500 g 5 хв із примусовим охолодженням +4 °C, розчинити осад у 2 мл охолодженого стерильного CaCl_2 .

Після отримання компетентних клітин провести їх трансформацію плазмідною рекомбінантною ДНК (певна інсерція ДНК у полілінкер (MCS) плазміди pUC19 (див. пункти 6 - 7) за допомогою «теплого шока» [Maniatis et al, 1982]. Додати по 200 мкл клітин до пробірок із 2 нг та 10 нг плазміди pUC19 і до контрольної пробірки без ДНК плазміди, помістити еппендорфи на льод на 30 хв, потім піддати клітини «тепловому шоку»: тримати 1,5 хв при + 42,0 °C (водяна баня) і швидко помістити еппендорфи на льод на 5 хв.

Для проведення біло-блакитної селекції на повністю залиті та підсушені чашки Петрі (1,6 % амінопептидне поживне середовище з агаром із додаванням ампіциліну, тому що плазміда pUC19 має ген стійкості до ампіциліну (робоча

концентрація 100 мкг/мл)) втерти шпателем 20 мкл 10 % X-Gal та 25 мкл 0,4 М IPTG і підсушити їх у ламінарі. Висіяти трансформовані клітини на середовище та інкубувати чашки Петрі 18 год при +37 °C.

Оформлення результатів експерименту: в зошиті зробити висновок про візуальну успішність отримання компетентних клітин *E. coli* та їх трансформації плазмідною ДНК.

9. Детекція рекомбінантних клонів на основі біло-блакитної селекції

Мета роботи. Виявити рекомбінантні клони на основі біло-блакитної селекції.

Матеріали та реактиви. Амінопептидне поживне середовище з 1,6 % агаром (на 150 мл: 100 мл води, 50 мл амінопептиду, 1,5 г NaCl, 2,4 г агару); поживне середовище Лурія-Бертані (LB) наступного складу (г / л): бактотріптон - 10 г / л, дріжджовий екстракт - 5 г / л, NaCl - 5 г / л, NaOH - 0,008 М, рН 7,5, ампіцилін - 100 мг / л (середовище стерилізують в автоклаві при 105 °С протягом 1 год); ампіцилін.

Обладнання. Чашки Петрі, термостат-шейкер, ламінарний бокс, перманентний маркер, одноразові рукавички без пудри, шпатель.

Хід роботи. Наявність рекомбінантних плазмід визначити за допомогою біло-блакитної селекції на основі лак оперону *E. coli*. Як правило, після інкубації на середовищі з хромогенним субстратом - X-Gal, у присутності IPTG, формуються блакитні колонії (рис. 38) внаслідок утилізації субстрату (X-Gal). Це відбувається за рахунок α -комплементції N-термінального фрагмента β -галактозидази лак оперону *E. coli* (5'- термінальна частина гена *lac Z*, джерело бактеріофаг M13mp18/19) плазмиди pUC19 з дефектною формою β -галактозидази (кодується бактерією-хазяїном), внаслідок чого синтезується фермент - β -галактозидаза. Але в нашому випадку інсерція ДНК у полілінкер (MCS) плазмиди pUC19, у гені *lac Z*, інактивує синтез N-термінального фрагмента β -галактозидази, і α -комплементція пригнічена [Maniatis et al, 1982]. Отже, бактерії з рекомбінантними плазмідами pUC19 продукують білі колонії (рис. 38).

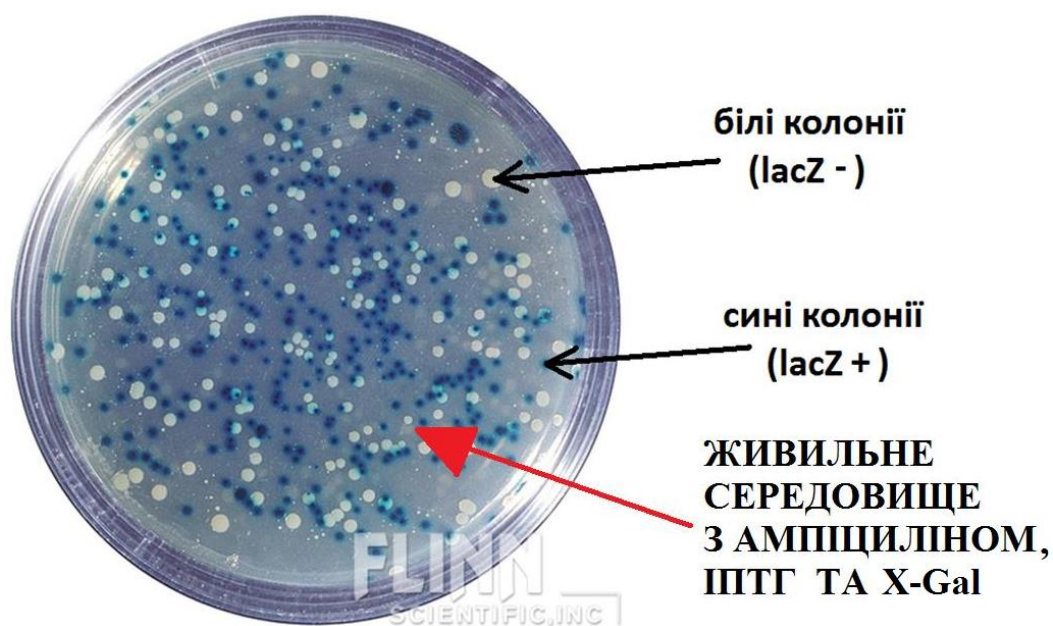


Рис. 38. Детекція рекомбінантних клонів за допомогою біло-блакитної селекції на основі лак оперону *E. coli* (адаптовано з www.flinnsci.com). Пояснення в тексті.

Після детекції рекомбінантних білих клонів їх одиничні колонії потрібно пересадити на чашки Петрі з 1,6 % амінопептидним поживним середовищем, із додаванням ампіциліну (робоча концентрація 50 мкг/мл). Після інкубації (18 год) інокулювати одиничну колонію в 50 мл колбу з LB із додаванням ампіциліну (робоча концентрація 50 мкг/мл) та інкубувати 18 год при помірному струшуванні (100-120 об/хв), при +37 °C, для подальшого виділення ДНК плазмід (див. далі).

Оформлення результатів експерименту: в зошиті зробити висновок про успішність трансформації клітин *E. coli* плазмідною ДНК на основі біло-блакитної селекції (наявність білих колоній замість синіх).

10.Виділення ДНК плазмід за допомогою лужного лізису та очищення ДНК плазмід.

Мета роботи. Виділити ДНК плазмід за допомогою лужного лізису та провести очищення ДНК плазмід.

Матеріали та реактиви. Нічна культура *E.coli* з рекомбінантною плазмідною рUC19 у LB; нативна плазмідна рUC19; розчин I із лізоцимом (50 mM глюкозу, 25 mM трис-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA), лізоцим концентрацією 5 мг/мл; розчин II (0,2 N NaOH, 1% SDS); розчин III (3 M CH₃COONa); суміш фенолу, насиченого водою, pH 8,0, із хлороформом в співвідношенні 1: 1; хлороформ, панкреатична РНК-аза, 70 % етанол, 96 % етанол, ізопропанол, H₂O dist.

Обладнання. Одноразові еппендорфи на 1,5 мл та одноразові «наконечники» із запобіжними фільтрами, штативи для еппендорфів, самплери від 20 мкл до 200 мкл, від 200 мкл до 1000 мкл, термостат, центрифуга із примусовим охолодженням для еппендорфів, перманентний маркер, одноразові рукавички без пудри, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи. 50 мл нічної культури *E. coli* з плазмідною рUC19 після термостата тримати 5 хв на льоду та центрифугувати 5 хв на центрифугузі із примусовим охолодженням (+ 4°C), при 1000 об/хв. Осад ресуспендувати в 2 мл стерильного охолодженого розчину I із лізоцимом (5 мг/мл) та тримати клітини на льоду 15 хв. Після цього до сферопластів додавати 4 мл лужного розчину II та тримати 10 хв на льоду. Додати 3 мл розчину III, тримати на льоду 30 хв та центрифугувати 10 хв при 2500 об/хв. Злити супернатант у нові еппендорфи, додати 2 об'єми 96° етанолу або 0,7 об'ємів ізопропанолу, центрифугувати 10 хв при 2500 об/хв, злити супернатант, промити осад 2 мл 70° етанолу, висушити на повітрі та розчинити в 500 мкл H₂O dist [Maniatis et al, 1982]. Отримані зразки зберігати при – 20 °C до наступних маніпуляцій .

Очищення ДНК плазмиди: обробка РНК-азою та екстракція фенолом та хлороформом. До проб із плазмідною ДНК додати 40 мг панкреатичної

РНК-ази (робоча концентрація 20 мг/мл) та інкубувати при +37 °С 30 хв. Після інкубації отриману суміш змішати з рівним об'ємом (500 мл) суміші фенол – хлороформ [Maniatis et al, 1982]. Центрифугувати 5 хв при 10000 g на центрифугу, при кімнатній температурі, та перенести верхній водний шар у новий еппендорф. Потім до проби ДНК додати рівний об'єм хлороформу, змішували, центрифугувати 3 хв при 10000 g, при кімнатній температурі. Аналогічно перенести верхню фазу в нову пробірку. Після цього знов додати рівний об'єм хлороформу і провести послідовні маніпуляції відповідно до вищезазначених. Потім провести переосадження зразків ДНК: додати по 2,5 об'єми 96° етанолу та CH_3COONa до 0,15 М. Центрифугувати 7 хв при 10000 g, при кімнатній температурі, та злити супернатант. Осад промити 500 мкл 70° етанолу, підсушити на повітрі та розчинити в 300 мкл H_2O dist. Отримані зразки зберігали при –20 °С до подальших маніпуляцій.

Наприклад, мічення рекомбінантної плазмиди дигоксигеніном (DIG) для використання в якості зонда для гібридизації; гібридизація отриманих зондів із геномною ДНК (перед цим має бути проведено її рестрикцію за допомогою певних рестриктаз ((див. пункт 6); та капілярне (або електроперенесення) перенесення фрагментів ДНК на мембрану (Саузерн-блотинг) для визначення певних послідовностей; детекція гібридизації DIGa з геномною ДНК; аналіз отриманих результатів за допомогою статистичних методів.

Якщо ж рекомбінантна плазміда – це експресуючий вектор, то після напрацювання хімерного білка з бажаними характеристиками відбуваються процедури вилучення його з клітини, очищення та аналізу його нативності та/або ферментативної активності стандартними методами протеоміки.

Проаналізувати інтактність виділеної рекомбінантної плазмиди (можлива наявність різних форм молекул ДНК бактерій: бактеріальна нативна; плазмідні: нікована (релаксована під час реплікації); лінійна (розщеплена рестриктазою за одним сайтом кільцева суперспіралізована молекула або отримана також внаслідок певних помилок при лужному лізису); кільцева дволанцюгова; кільцева суперспіралізована (нативна молекула, стабілізована

білками, використовується для клонування); кільцева одноланцюгова) за допомогою гель-електорофорезу в агарозному гелі (див. пункт 4) та порівняти її розмір із нативною плазмідною рUC19.

Оформлення результатів експерименту: після гель-електрофорезу в зошиті зробити висновок про успішність виділення ДНК плазмід за допомогою лужного лізису та їх очищення (чи інтактна виділена рекомбінантна плазміда, чи відрізняється її розмір від нативної плазмиди рUC19; які форми молекул ДНК бактерій присутні в отриманому препараті, і як відрізняється їх швидкість переміщення).

11. Кількісний аналіз експресії мРНК певного гена за допомогою ПЛР у реальному часі

Мета роботи. Визначити рівень експресії певного гена за допомогою ПЛР у реальному часі.

Матеріали та реактиви. Виділені препарати нуклеїнових кислот, складові комерційних наборів для синтезу кДНК і ПЛР, 3 М CH₃COONa, 96 % етанол.

Обладнання. Самплери від 2 до 20 мкл та від 20 мкл до 200 мкл, одноразові еппендорфи на 1,5 мл та «наконечники», штативи для еппендорфів, перманентний маркер, ПЛР-бокс під УФ-лампю (бажано), центрифуга для еппендорфів, стріпи (специфічні, з'єднані одна з одною мікропробірки з оптично прозорими плоскими кришками для ЗТ-ПЛР), програмований детектуючий ампліфікатор (термоциклер), комп'ютер із входом до мережі інтернет, одноразові рукавички без пудри, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи. Перед кількісним аналізом експресії мРНК певного гена за допомогою ПЛР у реальному часі необхідно підібрати праймери, які будуть специфічними до послідовності гена, який буде аналізуватися.

При підборі оптимальної пари праймерів (прямого й зворотного) зручно використовувати програмне забезпечення, наприклад, «GeneRunner» від «Hastings Software Inc.», «Primer-BLAST» (також за її допомогою можна перевірити специфічність обраної пари праймерів до заданої послідовності), доступний на сайті NCBI. Дуже хороші праймери підбирає програма «Primer Express» («Applied Biosystems»), якщо ставити температуру плавлення 58 - 60 °C. Однак ця програма задає дуже високі критерії пошуку, в результаті чого вона часто не може підібрати жодної пари до заданої послідовності. Гарні результати виходять також із праймерами, підібраними за допомогою «Vector NTI». Однак працювати має сенс тільки з праймерами, яким програма присвоює максимальний рейтинг (при стандартних умовах пошуку він

дорівнює 171). Програму «Primer3» використовувати не рекомендується - у неї занадто м'які критерії відбору.

Підбір послідовностей праймерів для кількісного аналізу експресії мРНК гена *Ptgs2* (COX2 – циклооксигеназа 2) за допомогою ПЛР у реальному часі. Перш за все, на сайті **NCBI** знайти послідовність гена *Ptgs2* для щура (*Rattus norvegicus*) (рис. 39).

Ptgs2 prostaglandin-endoperoxide synthase 2 [*Rattus norvegicus* (Norway rat)]

Gene ID: 29527, updated on 4-Mar-2017

Summary

Official Symbol	Ptgs2 provided by RGD
Official Full Name	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 provided by RGD
Primary source	RGD:620349
See related	Ensembl:ENSRNOG00000002525
Gene type	protein coding
RefSeq status	PROVISIONAL
Organism	Rattus norvegicus
Lineage	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Muridae; Murinae; Rattus
Also known as	Cox2; COX-2

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29527#genomic-regions-transcripts-products> in of arachidonic acid products to

Table of contents

- Summary
- Genomic context
- Genomic regions, transcripts, and products
- Expression
- Bibliography
- Variation
- Pathways from BioSystems
- Interactions
- General gene information
 - Markers, Homology, Gene Ontology
- General protein information
- NCBI Reference Sequences (RefSeq)

Рис. 39. Вікно з інформацією про послідовність гена *Ptgs2* щура на сайті NCBI. Пояснення в тексті

Ретельно проглянути інформацію стосовно гена на сторінці (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29527>), поки не буде знайдено підзаголовок: «mRNA and Protein(s)» (рис. 40).

RefSeqs maintained independently of Annotated Genomes

These reference sequences exist independently of genome builds. [Explain](#)

mRNA and Protein(s)

1. [NM_017232.3](#) → [NP_058928.3](#) prostaglandin G/H synthase 2 precursor

[See identical proteins and their annotated locations for NP_058928.3](#)

Status: PROVISIONAL

Source sequence(s)	U04300
UniProtKB/Swiss-Prot	P35355
Related	ENSRNOP00000003567 , ENSRNOT00000003567
Conserved Domains (2)	summary

cd09816	prostaglandin_endoperoxide_synthase; Animal prostaglandin endoperoxide synthase and related bacterial proteins
Location:75 → 562	
pfam00008	EGF; EGF-like domain
Location:21 → 53	

RefSeqs of Annotated Genomes: *Rattus norvegicus* Annotation Release 106 details...

Рис. 40. Вікно з інформацією про мРНК гена *Ptgs2* щура на сайті NCBI.

Пояснення в тексті

Натиснути мишкою на напис на сторінці - **NM_017232.3** і перейти до послідовності мРНК цього гена. Продивитись інформацію про мРНК гена і в правому верхньому куті сторінки у меню – «**Analyze this sequence**» натиснути мишкою на - «**Pick Primers**» (рис. 41).

GenBank

Send: [Change region shown](#)

Rattus norvegicus prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2), mRNA

NCBI Reference Sequence: [NM_017232.3](#)

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ☒

LOCUS	NM_017232	1815 bp	mRNA	linear	ROD 01-SEP-2016
DEFINITION	Rattus norvegicus prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2), mRNA.				
ACCESSION	NM_017232				
VERSION	NM_017232.3				
KEYWORDS	RefSeq.				
SOURCE	Rattus norvegicus (Norway rat)				
ORGANISM	Rattus norvegicus				

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Rattus.

[Analyze this sequence](#)

Run BLAST

[Pick Primers](#)

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Articles about the Ptgs2 gene

Type of supplemented simple sequence [Am J Physiol Heart Circ Physiol 274:R1000-R1006 (1992)]

Chronic intermittent hypoxia affects airway hyperresponsiveness in mice

Рис. 41. Вікно з інформацією про послідовність мРНК гена *Ptgs2* щура на сайті NCBI. Пояснення в тексті.

У вікні, яке відкриється (рис. 42), обрати чи вписати відповідні критерії підбору праймерів.

Рис. 42. Вікно з інформацією про критерії підбору праймерів на сайті NCBI. Пояснення в тексті.

Звернути увагу на те, що рівень експресії гена *Ptgs2* буде аналізуватися за допомогою ПЛР саме у реальному часі, тому критерії наступні:

- 1) довжина 18 – 30 нуклеотидів;
- 2) розмір продукта ПЛР – 70 – 150 п.н.
- 3) ГЦ вміст: 30 – 60 %;
- 4) концентрація праймерів: 0,1 – 0,5 мкМ; оптимальна концентрація – 0,3 мкМ у більшості випадків
- 5) три і більше 3'-нуклеотида не повинні бути комплементарними самому праймеру, праймеру в парі, пробі тощо задля уникнення формування «шпильок» і димерів праймерів;
- 6) не має бути більше 2 гуанінів чи цитозинів серед останніх п'яти нуклеотидів 3'-кінця праймера задля уникнення формування петель, «шпильок» і димерів праймерів; в ідеалі всі 4 нуклеотида мають бути більш менш рівномірно розподілені по всій довжині праймера;

7) T_m (температура плавлення - melting) праймерів, які працюють у парі, у більшості випадків має бути подібною (не повинна відрізнятися більше ніж на 2 °C), крім певних випадків; оптимальна T_m – 60 °C;

8) T_a (температура відпалу (annealing temperature) вибирається в діапазоні 55-70 °C (як правило, $T_a \approx T_m - 5$); не повинна відрізнятися у праймерів, що становлять пару для ПЛР, більш ніж на 2 °C;

9) уникати появи вторинної структури в ампліконі;

10) у меню «**Exon/intron selection**» знайти підменю – «**Exon junction span**» і обрати – «**Primer must span an exon-exon junction**» (праймери мають охоплювати місце з'єднання екзонів для того, щоб уникнути можливої ампліфікації ДНК, яка містить інтрони);

11) у меню «**Primer specificity stringency**» обрати відповідні значення стосовно розбіжностей праймерів, які будуть підбиратися, з неспецифічною матрицею, у нашому випадку – з будь-якою послідовністю мРНК, окрім мРНК гена *Ptgs2* задля уникнення неспецифічної ампліфікації;

12) для підвищення специфічності праймерів, які обираються, у меню «**Advanced parameters**» зазначити відповідні критерії, зокрема обрати моделі (термодинамічну тощо) для уникнення формування «шпильок» і димерів праймерів; опція «**Internal hybridization oligo parameters**» обирається для створення гібридизаційного зонда для подальшого детектування майбутнього ПЛР-продукта та перевірки його специфічності; тощо;

13) Натиснути «**Get primers**».

У вікні, яке з'явилося, розглянути інформацію стосовно обраної пари чи обраних пар праймерів (довжина, температура плавлення, ГЦ вміст, чи три і більше 3'-нуклеотида не комплементарні самому праймеру тощо), обрати одну з них. Також перевірити, чи підібрано праймери саме до мРНК гена *Ptgs2* (чи є напис – «**Products on intended target**») (рис. 43).

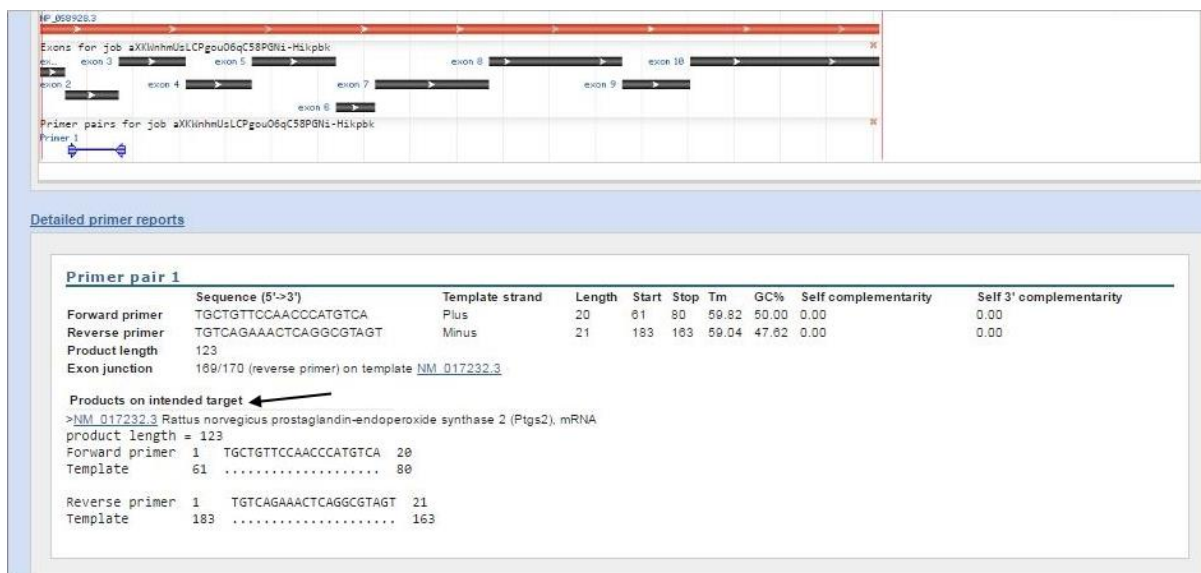


Рис. 43. Вікно з інформацією про підбрані специфічні праймери для послідовності мРНК гена *Ptgs2* щура на сайті NCBI. Пояснення в тексті

Якщо замість зазначено напису, є напис – «**Products on inintended target**», це свідчить про неспецифічність праймерів до мРНК гена *Ptgs2*, потрібно потворити процедуру підбору, надавши більш високі критерії відбору праймерів. Якщо підбрано специфічні праймери (рис. 43), їх синтезують у певній фірмі-виробнику та використовують для визначення експресії гена *Ptgs2* за допомогою ПЛР у реальному часі.

Двостадійна кількісна ЗТ-ПЛР. 1) По 100 мкг виділених зразків РНК (2 мкл), що зберігаються в 2,5 об'ємах 96 % етанолу (див. пункт 2), переосадити (див. пункт 1, 1), а)) у стерильних еппендорфах, додавши 0,1 мкл CH_3COONa до 0,15 М (по 2 мкл РНК + 5 мкл 96 % етанолу = 7 мкл). Центрифугувати 7 хв на мікроцентрифузі при 10000 g, при кімнатній температурі, промити осад 100 мкл 96 % етанолу, центрифугувати 2 хв на мікроцентрифузі, висушити, розчинити в 2 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist та помістити проби РНК на лід.

Синтез кДНК. Вийняти реактиви (окрім ферментів – *дотримуватись правил зберігання!*) із морозильної камери (-20 °C), помістити їх на лід, розморозити й обережно перемішати.

У стерильний еппендорф послідовно додати на льоду наступні

компоненти: 0,5 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist, 4 мкл відповідного 5-кратного буферного розчину (250 мМ трис – HCl (рН 8,3 при 25 °C), 250 мМ KCl , 25 мМ MgCl_2 , 50 мМ ДТТ – дітіотреїтол), 10 мкл 2 мМ dNTP (1 мМ), 2 мкл (1 мкмоль/л) зворотного праймеру, 0,5 мкл (20 од.) рибонуклеазного інгібітору, 1 мкл зворотної транскриптази (200 од.), 2 мкл РНК (2 мкг), обережно перемішати суспендуванням. Фінальний об'єм реакційної суміші - 20 мкл. Як варіант, синтез кДНК проводити за допомогою комерційного набору.

Синтез проводити за таких умов: 65 °C – 5 хв., 45 °C – 60 хв на ампліфікаторі.

Кількісна ПЛР у реальному часі. Кількісну ПЛР у реальному часі проводити за допомогою комерційного набору.

Вийняти реактиви (окрім ферментів - *дотримуватись правил зберігання!*) із морозильної камери (-20 °C), помістити їх на лід, розморозити й обережно перемішати. У стерильний еппендорф (у ньому буде стоковий розчин) послідовно додати на льоду наступні компоненти (кількість кожного з них помножити на кількість різних проб РНК, що будуть у ЗТ-ПЛР, наприклад, якщо 4 проби, кожен компонент множити на 4): 10,5 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist, 12,5 мкл (2X) суміші, яка містить буферний розчин для ПЛР як із KCl (100 мМ трис- HCl , рН 8,8 при 25 °C, 500 мМ KCl , 0,8 % нонідет Р40), так і з $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (750 мМ трис- HCl , рН 8,8, 200 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 % твін 20), 1 од. *Taq* ДНК полімерази, по 200 мМ кожного дНТФ, до 2,5 мМ MgCl_2 , флуоресцентний барвник – SYBR Green I, пасивний референсний барвник – ROX; по 1 мкл прямого й зворотного праймерів (0,4 мкмоль/л). 23 мкл суміші (або по 23 мкл суміші у випадку декількох проб РНК) додати в стріп/стріпи. У кожен стріп додати 2 мкл (200 нг) синтезованої кДНК (не більше 10 % від фінального об'єму реакційної суміші) –, а у випадку негативного контролю реакції – 2 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist, обережно перемішати суспендуванням, запобігаючи утворенню бульбашок. Кінцевий об'єм реакційної суміші - 25 мкл.

ЗТ-ПЛР проводити за таких, рекомендованих фірмою-виробником,

температурних умов: синтез кДНК 50 °С – 30 хв; ініціююча денатурація 95 °С – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95 °С – 15 с; гібридизація праймерів 50 °С – 35 с; добудова ланцюга 72 °С – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72 °С – 5 хв на ампліфікаторі.

Одностадійна кількісна ЗТ-ПЛР. Синтез кДНК і кількісну ПЛР у реальному часі проводити в тій же самій пробірці за допомогою комерційного набору.

Переосадити по 100 мкг (2 мкл) виділених зразків РНК (як описано вище).

Вийняти реактиви (окрім ферментів - дотримуватись правил зберігання! Їх не розморожувати заздалегідь, а виймати з морозильної камери безпосередньо перед внесенням у реакційну суміш!) із морозильної камери (-20 °С), помістити їх на лід, розморозити й обережно перемішати. У стерильний еппендорф (у ньому буде стоковий розчин) послідовно додати на льоду наступні компоненти (кількість кожного з них помножити на кількість різних проб РНК, що будуть у ЗТ-ПЛР, наприклад, якщо 4 проби, кожен компонент множити на 4): 7 мкл автоклавованої охолодженої H₂O dist, 12,5 мкл 2х суміші, яка містить буферний розчин для ЗТ-ПЛР, 1 од. Taq ДНК полімерази, по 1 мМ кожного дНТФ, до 3 мМ MgCl₂, флуоресцентний барвник – SYBR Green I, пасивний референсний барвник – ROX (фінальна концентрація - 500 nM); 1,25 мкл RT Enhancer (стабілізує ревертазу й підвищує її чутливість); по 1 мкл прямого й зворотного праймерів (0,4 мкмоль/л); 0,25 мкл суміші ферментів (містить ревертазу і рибонуклеазний інгібітор). 23 мкл суміші (або по 23 мкл суміші у випадку декількох проб РНК) додати в стріп/стріпи (специфічні з'єднані одна з одною мікропробірки з оптично прозорими плоскими кришками для ЗТ-ПЛР). У кожен стріп додати 2 мкл (від 1 пг до 100 нг) певної проби РНК (у випадку негативного контролю реакції – 2 мкл автоклавованої охолодженої H₂O dist). Фінальний об'єм реакційної суміші - 25 мкл.

ПЛР у реальному часі проводити за таких, рекомендованих фірмою-виробником, температурних умов: синтез кДНК 50 °С – 30 хв, ініціююча денатурація 95 °С – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95 °С – 15 с;

гібридизація праймерів 50 °C – 35 с; добування ланцюга 72 °C – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72 °C – 5 хв на ампліфікаторі.

У реакціях використовувати, наприклад, такі послідовності праймерів: для **Ptgs2** (COX2 – циклооксигеназа 2) – прямий – TGCTGTTCCAACCCATGTCA та зворотний - TGTCAGAAACTCAGGCGTAGT; **Slc9a3** (NHE3 – електронейтральний натрій–водневий транспортер 3) – прямий - CCTGATGGGCGAACTGAAGA та зворотний - GCAGTGACTCCCCAAAAACA; для **Actb** (ген β-актину, що використовується в якості внутрішнього (ендогенного) контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT.

Відтворюваність результатів ампліфікації перевірити в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів. Після кожного циклу ампліфікації зчитується флуоресценція барвника SYBR Green I, а по закінченні реакції будується крива плавлення (25 – 95 °C) для контролю утворення димерів праймерів та специфічності реакції.

Специфічність отриманих продуктів ПЛР також перевірити за допомогою горизонтального **гель-електрофорезу** в 2 % агарозному гелі, в 0,5 кратному TBE буферному розчині 1,5 год при 5 В/см (див. пункт 4).

Оформлення результатів експерименту: у зошиті зробити висновок про успішність отримання ПЛР-продукту (чи було отримано після реакції значення порогових циклів - C_T тощо); після аналізу кривих плавлення (відсутність додаткових піків із неспецифічною температурою плавлення) та гель-електрофорезу (відсутність неспецифічних додаткових смуг в гелі, димерів праймерів тощо) зробити висновок про специфічність отриманих продуктів ПЛР.

Аналіз даних ПЛР у реальному часі. Порівняльний метод C_T ($\Delta\Delta C_T$ метод).

Відкрити файли з описом проведеної ПЛР у реальному часі на приладі

«StepOne™», зокрема вкладку – «Analysis», «Amplification Plot» (рис. 44).

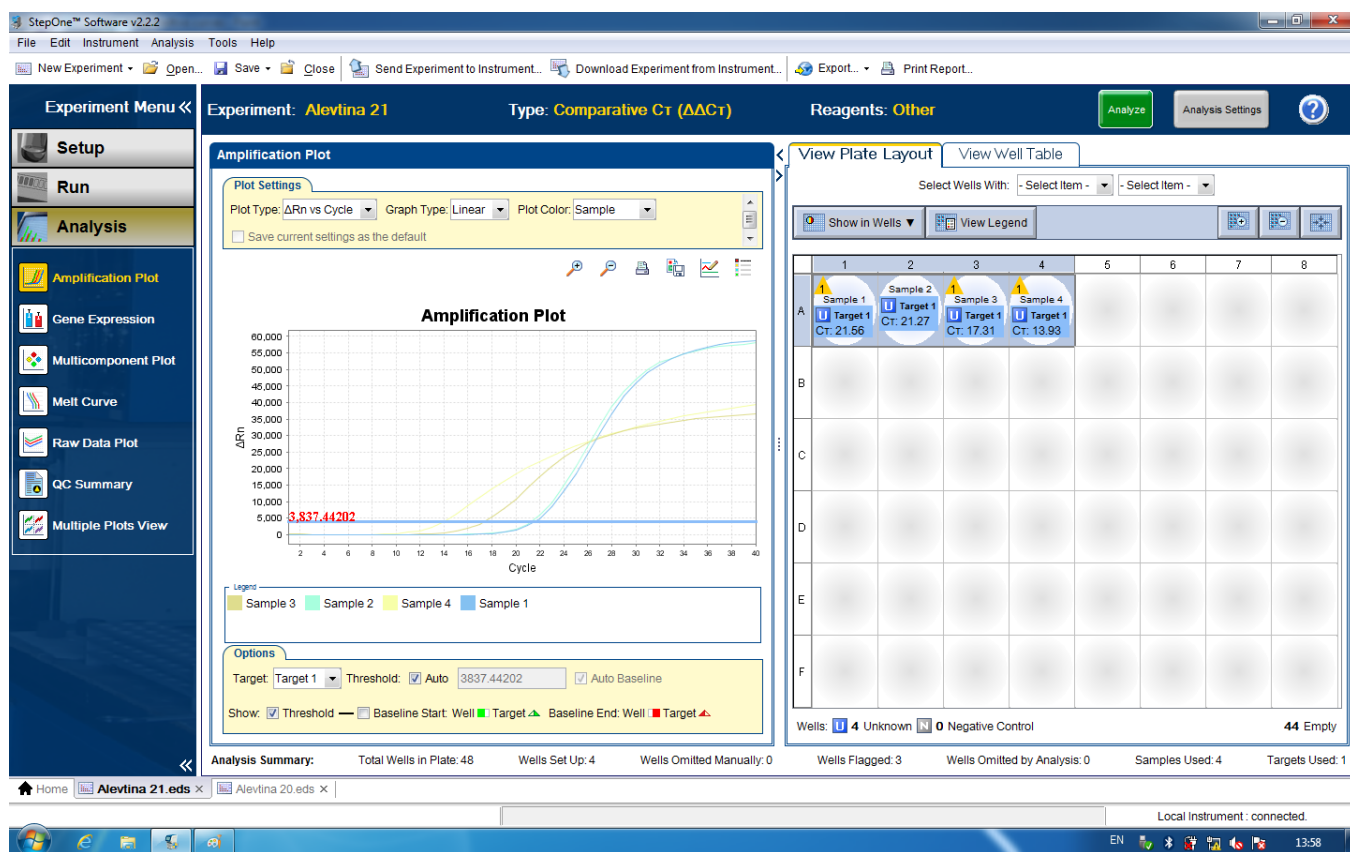


Рис. 44. Програмне вікно з певними результатами ПЛР у реальному часі (прилад «StepOne™»). Пояснення в тексті

Порівняти значення порогових циклів - C_T для проб із геном – мішенню (наприклад, *Ptgs2*) і геном внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії (ендогенний контроль, наприклад, *Actb*).

Перейти до вкладки – «Analysis», «Melt Curve» (рис. 45).

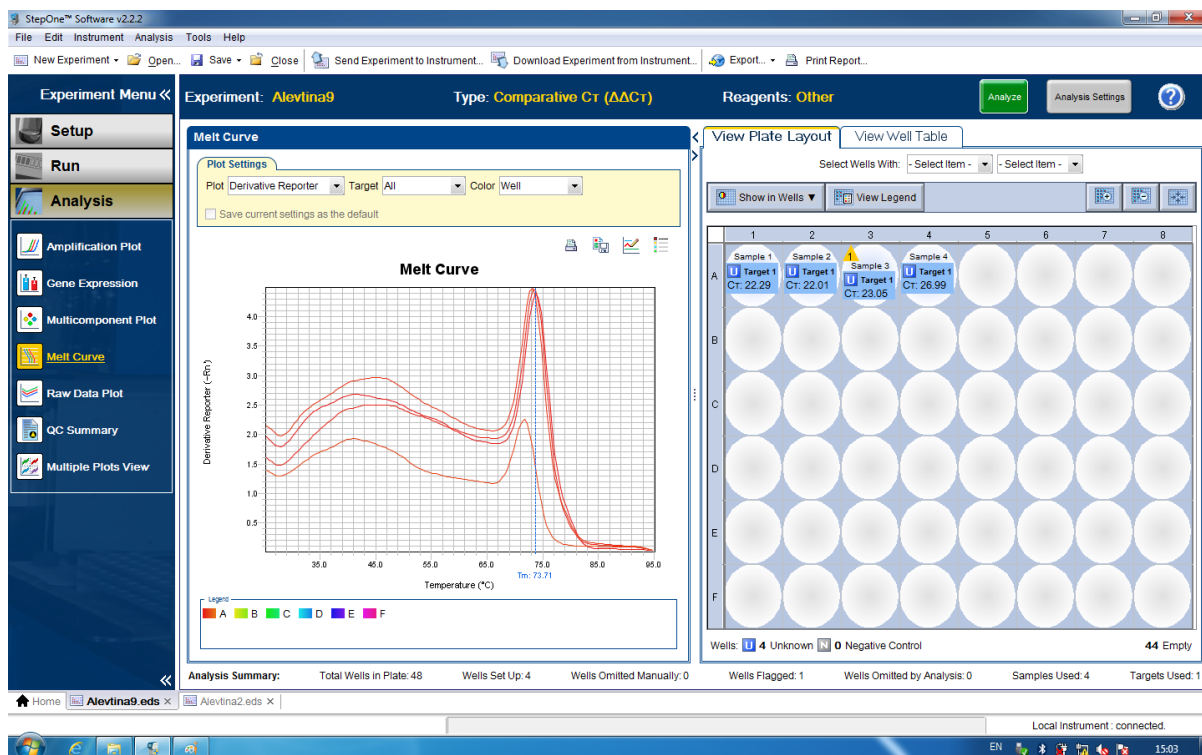


Рис. 45. Програмне вікно з кривими плавлення після ПЛР у реальному часі (прилад «StepOne™»). Пояснення в тексті

Розглянути криві плавлення й зробити висновок про специфічність отриманих продуктів реакції.

Визначити ефективність ПЛР у реальному часі при використанні неспецифічної системи детекції (SYBR Green). Для цього у програмі, наприклад, «GraphPad Prism 5.04; 6; 7» («GraphPad Software Inc.», США) обрати **регресійний аналіз**, ввести по осі X логарифми значень концентрації РНК (наприклад, нг), яку аналізували в ПЛР у реальному часі; по осі Y - різницю Ст між досліджуваним геном – мішенню (наприклад, *Ptgs2*) і геном внутрішнього контролю реакції (наприклад, *Actb*) - ΔC_T [Livak and Schmittgen, 2001] (рис. 46).

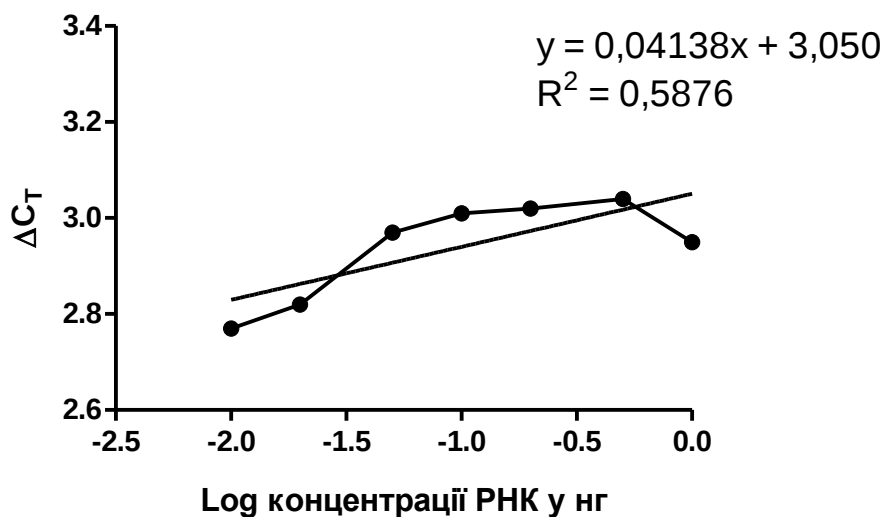


Рис. 46. Залежність різниці порогових циклів між геном – мішенню та геном внутрішнього контролю реакції від вихідної концентрації РНК у реакції

Якщо ефективність однакова, у рівнянні $y = ax + b$ коефіцієнт a (slope) $< 0,1$ - близько нуля), наприклад: $y = 0,04138x + 3,050$, ($a = 0,04138$) (Рис. 24). У такому випадку початкову кількість мРНК обраховувати за порівняльним C_T методом « $\Delta\Delta C_T$ Method» [Livak and Schmittgen, et al, 2001]. Також ефективність ПЛР у реальному часі для кожної реакції обраховують: $E_x = (10^{-1/\text{slope}}) - 1 \times 100$ %. Відносну кількість мРНК зазначених генів нормалізувати до мРНК *Actb*.

1) Обрахувати референсне (контрольна група тварин) значення ΔC_T для ампліфікованого фрагмента гена-мішені (наприклад, *Ptgs2*) наступним чином:

$$\Delta C_T = C_T \text{ гена-мішені} - C_T \text{ гена ендogenous (внутрішнього) контролю};$$

Наприклад, для *Actb* середнє $C_T = 23,63$, а середнє значення для *Ptgs2* $C_T = 30,49$, тоді ΔC_T можна обраховувати: $\Delta C_T = 30,49 - 23,63 = 6,86$;

2) Обчислити **стандартне відхилення** (SD) для значення ΔC_T контрольної групи тварин. Стандартне відхилення ΔC_T розраховується, виходячи зі стандартних відхилень ампліфікованого фрагмента гена-мішені та ендogenous контролю, і використовуючи формулу:

$SD = (SD_1^2 + SD_2^2)^{1/2}$, де $X^{1/2}$ - це квадратний корінь із X і SD = стандартне відхилення.

Наприклад, обрахуємо стандартне відхилення:

$$SD_1 = 0,15, \text{ тоді } SD_1^2 = 0,022,$$

$$SD_2 = 0,09, \text{ тоді } SD_2^2 = 0,008,$$

$$SD = (0,022 + 0,008)^{1/2} = 0,17.$$

Таким чином, $\Delta C_T Ptgs2$ (референсне) = $(30,49 \pm 0,15) - (23,63 \pm 0,09) = 6,86 \pm 0,17$.

Так само розрахувати ΔC_T і SD для групи тварин, на яких діяв певний чинник.

3) Розрахувати значення $\Delta\Delta C_T$. $\Delta\Delta C_T$ обраховується за формулою:

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ гена-мішені (група тварин, на яких діяв певний чинник) – ΔC_T гена-мішені (референсні).

Наприклад, якщо $\Delta C_T Ptgs2$ (група тварин, на яких діяв певний чинник) 4,37, а $\Delta C_T Ptgs2$ (референсне) 6,86, то $\Delta\Delta C_T$ дорівнює – 2,5:

$$\Delta\Delta C_T = 4,37 - 6,86 = -2,5.$$

4) Обчислити **стандартне відхилення (SD)** для значення $\Delta\Delta C_T$. При розрахуванні $\Delta\Delta C_T$ від ΔC_T ампліфікованого фрагмента гена-мішені групи тварин, на яких діяв певний чинник, віднімають ΔC_T ампліфікованого фрагмента гена-мішені (референсне). Це віднімання довільної сталої, тому SD значення $\Delta\Delta C_T$ є тією самою величиною, що і для ΔC_T :

$$\Delta\Delta C_T = 4,37 \pm \underline{0,10} - 6,86 \pm 0,17 = -2,5 \pm \underline{0,10}$$

5) Перевести стандартне відхилення в **кратну різницю**. Кратні різниці, розраховані з використанням $\Delta\Delta C_T$ методу зазвичай виражаються у вигляді діапазону, який є результатом включення значень SD величини $\Delta\Delta C_T$ у розрахунок кратної різниці. Так, діапазон для ампліфікованого фрагмента гена-мішені по відношенню до референсного зразка розраховується наступним чином:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} \text{ із } \Delta\Delta C_T + SD \text{ і } \Delta\Delta C_T - SD$$

Наприклад, у групі тварин, які зазнали впливу певного чинника, ген-мішень має від 5,3 до 6,0-кратну відмінність в експресії по відношенню до контрольних тварин, як показано нижче:

$$\Delta\Delta C_T + SD = -2,5 + 0,1 = -2,4, \text{ тоді } 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(-2,4)} = \underline{5,3} \text{ і}$$

$$\Delta\Delta C_T - SD = -2,5 - 0,1 = -2,6, \text{ тоді } 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(-2,6)} = \underline{6,0}.$$

У випадку, коли значення $\Delta\Delta C_T$ **позитивне**, наприклад + 2, тоді:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(2,0)} = \underline{0,25}$$

У цьому прикладі тестовий зразок має 0,25 або 1/4 кількості РНК-мішені відносно зразка контрольної групи.

Статистична обробка результатів досліджень. Отримані дані тестують на нормальний розподіл за допомогою тесту Шапіро-Вілکا з використанням програмного пакету «GraphPad Prism 5.04; 6; 7» . У випадку нормального розподілу подальший обрахунок результатів провести за допомогою односпрямованого дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) із пост-хок тестом Тукея або двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) із пост-хок тестом із використанням поправки Бонферонні. У випадку розподілу, відмінного від нормального, обрахунок результатів провести за допомогою непараметричних аналогів: тесту Крускал-Валіса, критерія Дани Квейд тощо. Отримані результати навести у вигляді середнього арифметичного $\pm$ середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Результати вважати значущими, коли $p \leq 0,05$. На основі отриманих даних побудувати графік, наприклад, як наведено на рисунку 47.

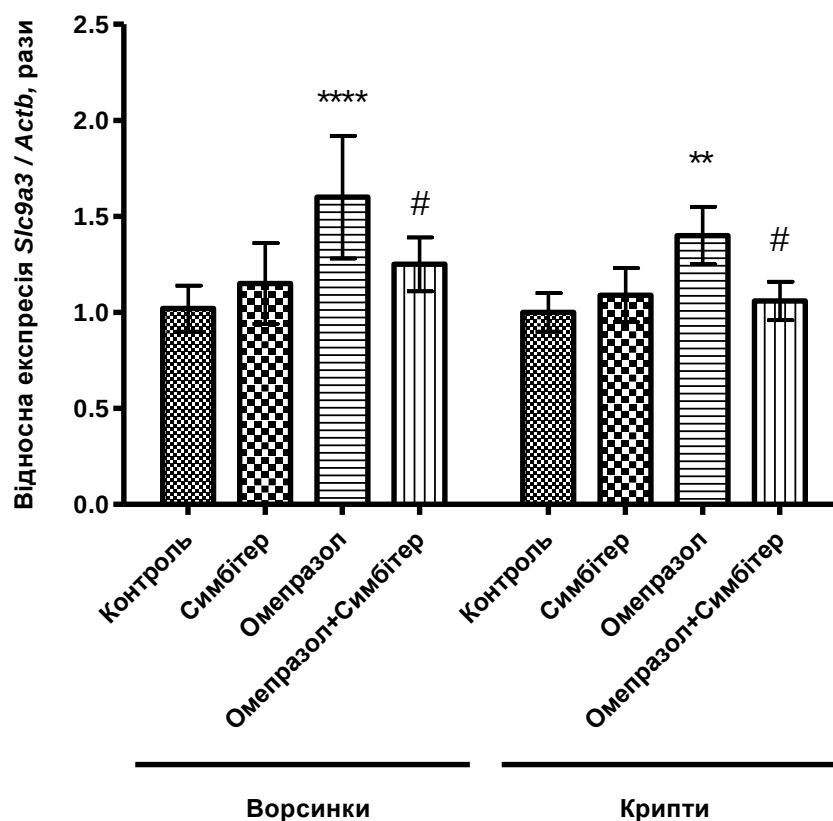


Рис. 47. Рівень експресії мРНК гена *Slc9a3* в різних типах епітеліальних клітин дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотику Симбітер. **** - $p \leq 0,0001$, ** - $p \leq 0,01$ відносно контролю; # - $p \leq 0,05$ відносно тварин, яким вводили лише омепразол.

Примітка. Отримані результати наведено у вигляді середнього арифметичного $\pm$ середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD

Оформлення результатів експерименту: у зошиті на основі отриманих значень: $\Delta\Delta C_T$, кратної різниці зробити висновок про відносну кількість мРНК певного гена, а також про достовірність зміни рівня експресії ампліфікованого фрагмента гена-мішені в досліджуваному біологічному матеріалі.

11. Визначення нуклеотидної послідовності ДНК методом Сенгера на приладі «ABI Prism 3130»

Мета роботи. Визначити нуклеотидну послідовність ДНК методом Сенгера.

Матеріали та реактиви. Набір реагентів «ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1.», праймер у концентрації 3,2 пМ, H₂O bi dist, вільна від нуклеаз; набір реагентів для екстракції ДНК, ізопропанол, 70 % етанол, ацетат натрію 3 М, рН 5,2; формамід.

Обладнання. Самплери від 0,5 до 10 мкл та від 5 до 50 мкл, одноразові еппендорфи на 1,5 мл, «наконечники» та тонкостінні поліпропіленові пробірки для ПЛР об'ємом 0,2 мл; штативи для еппендорфів, перманентний маркер, центрифуга для еппендорфів, вортекс, програмований детектуючий ампліфікатор (термоциклер), одноразові рукавички без пудри, скальпель, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи. Виділення та очищення ДНК - один із найважливіших етапів сиквенування, тому що якість і чистота препарату ДНК визначають успішний результат сиквенування. Нижче перераховані кроки для очищення ПЛР-продуктів (для екстракції плазмідної ДНК слід перейти до кроку 4)):

1) Напрацювати фрагмент ДНК ПЛР в об'ємі 25 мкл, і оцінити якість (відсутність неспецифічних продуктів ПЛР) амплікону методом **гель-електрофорезу** (див. пункт 4), вносячи в лунки агарозного гелю індивідуальними «наконечниками» по 5 мкл ПЛР-продукту.

2) Приготувати 1 % агарозний гель, у лунки якого внести індивідуальними «наконечниками» весь наявний об'єм ПЛР-продукту (приблизно 20 мкл) і провести гель-електрофорез.

3) Після гель-електрофорезу помістити гель на вікно транслюмінатора, закрити захисний пластиковий екран. Увімкнути прилад для візуалізації фрагментів ДНК. Вирізати скальпелем шуканий фрагмент ДНК, як можна

менше захоплюючи при цьому «порожню» ділянку геля, і помістити шматок геля в пробірку об'ємом 1,5 мл.

4) Провести процедуру екстракції ДНК із використанням комерційного набору реагентів згідно з інструкцією виробника.

5) Оцінити якість (відсутність неспецифічних фрагментів ДНК) і відносну кількість (яскравість смуги, яка світиться) очищеної ДНК методом **гель-електрофорезу**, вносячи в лунки агарозного гелю індивідуальними «наконечниками» по 5 мкл препарату ДНК.

Термінуюча реакція. Провести ПЛР в об'ємі 10 мкл відповідно до загальних принципів постановки ПЛР (винятком є використання в реакції тільки одного праймера) в одноразових еппендорфах об'ємом 0,2 мл у програмованому ампліфікаторі, який має кришку з підігрівом.

Використовуючи індивідуальні «наконечники» для кожного компонента реакції, зібрати суміш в окремій пробірці, за винятком препарату ДНК, із розрахунку на одну пробу:

«BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix» - 1 мкл *,

буфер для сиквенування 5x - 2 мкл,

праймер (прямий або зворотній) 3,2 пМ - 0,5 мкл,

H₂O bi dist - 1,5 мкл,

* «BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix» слід тримати в темряві, тому що він містить ддНТФ, мічені флуоресцентними барвниками.

Акуратно перемішати зібрану суміш на вортексі та центрифугувати впродовж 5 с. Внести в одноразові пробірки по 5 мкл реакційної суміші, закрити кришки й промаркувати їх. Використовуючи окремі «наконечники» для кожного зразка, у реакційну суміш внести 5 мкл препарату ДНК. Перемішати компоненти на вортексі та центрифугувати впродовж 5 с. Помістити пробірки в програмований ампліфікатор, який має кришку з підігрівом, і провести ампліфікацію ДНК за рекомендованими фірмою-виробником температурними умовами: ініціююча денатурація 96 °С – 5 хв; далі 25 циклів: денатурація ДНК 96 °С – 10 с; гібридизація праймера 50 °С – 5 с;

добудова ланцюга 60 °C – 4 хв; елонгація ампліфікатів 72 °C – 7 хв. Продукти сиквенуючої ПЛР використовують для подальшого очищення мічених флуоресцентними барвниками фрагментів ДНК.

Очищення ДНК. У штатив розставити еппендорфи на 1,5 мл в кількості, що дорівнює кількості сиквенуємих зразків, і промаркувати їх. Використовуючи окремий для кожного компонента «наконечник», в еппендорф внести 2 мкл 3 М CH_3COONa і 50 мкл ізопропанолу. Використовуючи індивідуальний для кожного зразка «наконечник», перенести в еппендорф із реакційною сумішшю весь об'єм ПЛР-продукту (10 мкл). Перемішати компоненти на вортексі та центрифугувати 15 хв при 14,5 тис. об / хв. Акуратно видалити супернатант, використовуючи самплер та окремі «наконечники» для кожного зразка. В еппендорфи внести по 250 мкл 70 % етанолу та центрифугувати 5 хв при 14,5 тис. об / хв. Акуратно видалити супернатант, використовуючи самплер та окремі «наконечники» для кожного зразка. Підсушити осад до зникнення запаху спирту (10 - 15 хв), залишивши пробірки в штативі або в термостаті при 37 °C, при цьому кришки пробірок повинні бути відкриті. В еппендорфи внести 20 мкл формаміду та закрити кришки. Перемішати компоненти на вортексі та центрифугувати 5 с. Інкубувати еппендорфи в попередньо нагрітому термостат до 95 °C та протягом 5 хв.

Провести сиквенування денатурованих фрагментів ДНК у **генетичному аналізаторі** (наприклад, прилад «ABI Prism 3130», який є повністю автоматизованим капілярним приладом, здатним одночасно аналізувати чотири зразки) згідно з інструкцією виробника.

Оформлення результатів експерименту: вклеїти в зошит файл із результатами сиквенованих послідовностей (**abi** тощо).

12. Аналіз сиквенованих нуклеотидних послідовностей: пошук гомологій.

Мета роботи. Порівняти сиквенс виявленої за допомогою ПЛР унікальної мутації з уже існуючими в базах послідовностями, зокрема у базах для SNP (однонуклеотидний поліморфізм).

Обладнання. Комп'ютер із входом до мережі інтернет і програмне устаткування.

Хід роботи. У залежності від цілей дослідження чи аналізу та коштів може бути проведено «сиквенування ДНК», «сиквенування кДНК», «повноекзомне сиквенування», «повногеномне сиквенування» та зроблено порівняльний біоінформатичний аналіз отриманих даних. Алгоритм подібних робіт може суттєво відрізнятися залежно від того, що саме планується робити і за яким методом: за Сенгером, NGS тощо.

Якщо є об'єкт із передбачуваною мутацією і вона умовно локалізована, то робота зводиться до сиквенування фрагменту ДНК у нього, а також іншого об'єкта, який цієї мутації точно не має. Якщо ж конкретних даних немає, необхідно аналізувати вибірку, причому часто досить велику. Вибірка потрібна і для пошуку SNP, щоб упевнитися, що це саме вони, а не артефакти сиквенування чи ПЛР. А от зі встановленням ролі та впливу SNP на певні параметри - це ще одна доволі складна проблема. Треба проводити подвійний статистичний аналіз по ефекту та наявності або відсутності однонуклеотидного поліморфізму в певних сайтах і проводити відповідний кореляційний аналіз.

Після сиквенування за Сенгером за допомогою певних сиквенаторів (наприклад, «ABI Prism» (див. вище)) файл із результатми сиквенованих послідовностей (**abi** тощо) потрібно проаналізувати в безкоштовній програмі «BioEdit» чи будь-якій іншій для генерування сиквенаційних хроматографічних піків, щоб переконатися в якості сиквенсу та не пропустити можливі гетерозиготні мутації чи SNP (рис. 48):

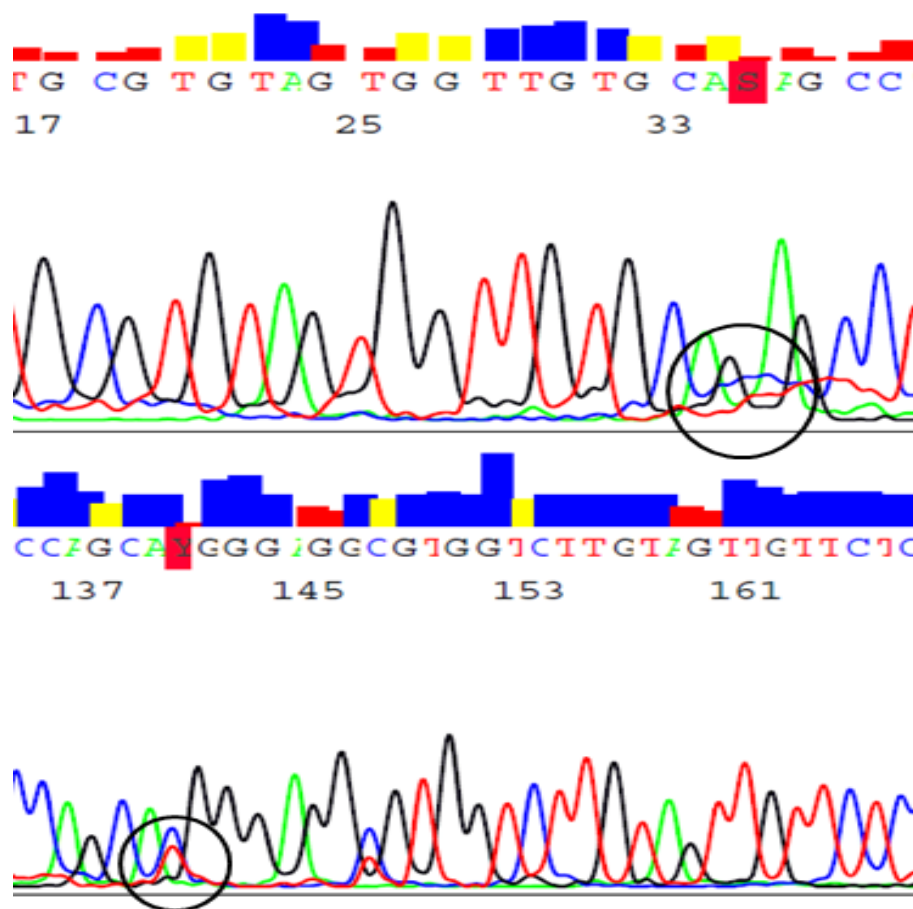


Рис. 48. Фрагмент послідовності (електрофореграма), сиквенованої за Сенгером (запозичено з <http://www.sigmaaldrich.com>)

Примітки. Кожному піку відповідає певна буква. Чим вище пік, тим більша ймовірність правильного зчитування нуклеотиду. Достовірність зчитування показана стовпчиками вгорі електрофореграми, цифри показують кількість прочитаних нуклеотидів. Так, наприклад, в позиції 35 показана помилково виявлена певна гетерозигота, в позиції 140 - істинна гетерозигота.

Після цього треба провести аналіз сиквенованих послідовностей у базах даних, які розроблені для певних організмів, як людини, так і модельних об'єктів. Самий простий варіант аналізу сиквенованих послідовностей – це пошук у «**BLAST**» на сайті **NCBI**. У комп'ютер потрібно завантажити сторінку офіційного сайту «**BLAST**» (Basic Local Alignment Search Tool, пошуковий інструмент базового локального вирівнювання) - родина комп'ютерних

програм, що слугують для пошуку гомологічних нуклеотидних або амінокислотних послідовностей НК і білків, відповідно (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). На сторінці можна порівняти сиквеновану послідовність із ДНК, РНК чи усіма послідовностями досліджуваного об'єкта.

Отже, обрати програму аналізу нуклеотидних послідовностей – **«nucleotide» blast**. У вікно **«Enter Query Sequence»** вставити досліджувану нуклеотидну послідовність (рис. 49).

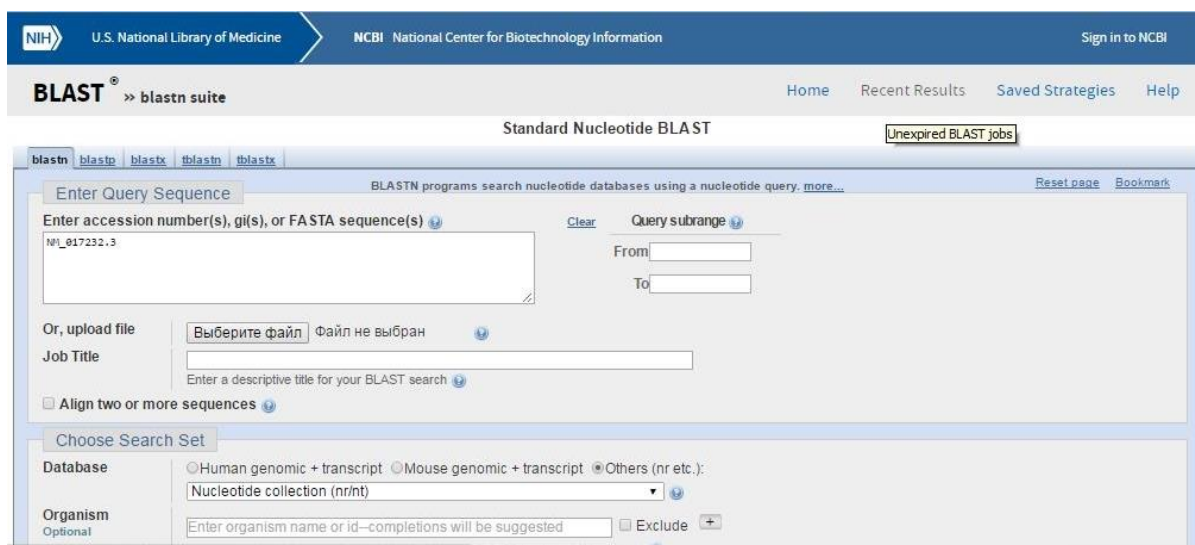


Рис. 49. Вікно з програмою «BLAST» на сайті NCBI. Пояснення в тексті

Нижче на сторінці, проглянувши параметри, натиснути **«BLAST»**. Переглянути звіт BLAST, де вказуються близькородинні послідовності в графічному вигляді та у форматі таблиці. У рядках таблиці вказуються знайдені гомологічні послідовності, у стовпчиках - відсоток їх ідентичності, розраховані значення, що дають оцінку статистичної значущості отриманих результатів, і номер послідовності в GenBank.

Далі провести детальний аналіз порівнюваних послідовностей, переходячи в розділ **«Alignments»**, де показано вирівнювання досліджуваної нуклеотидної послідовності (**«Query»**) з гомологічною (**«Sbjct»**), ідентичність послідовностей і наявність прогалин (**«gaps»**) у послідовності.

Подальший аналіз виявлених генетичних змін можна провести з використанням баз даних, що знаходяться у вільному доступі в мережі Інтернет. Наприклад, у молекулярно-генетичній діагностики, у визначенні спадкових порушень, а також у наукових дослідженнях частот алельних варіантів та опису залежності генотип-фенотип найбільш часто використовують такі бази даних: «GeneTests» (www.genetests.org); «Online Mendelian Inheritance in Man» (www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim); «locus specific databases» (LSDBs), розташовані на сайті Human Genome Variation Society (HGVS) (www.HGVS.org/dblist.html); «Database E of Chromosome Imbalance and Phenotype in Humans» з використанням «Ensembl Resources» (<http://decipher.sanger.ac.uk>); «EntrezGene» (ncbi.nlm.nih.gov/gene); «dbGap»: Database of Genotype and Phenotype (ncbi.nlm.nih.gov/dbgap); і «Human Gene Mutation Database HGMD®» (<http://www.hgmd.org>).

Наприклад, порівнювати сиквеновані послідовності (послідовність із мутацією та референсна (без мутації)) можна в різних програмах: «BioEdit» (перед цим на сайті NCBI перевести сиквеновану послідовність нуклеотидів у формат «FASTA»), «CLC», «MEGA» тощо (рис. 50).



BioEdit
Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP/7

Copyright © 1997-2013
Tom Hall
Ibis Biosciences
Carlsbad, CA 92008

BioEdit is a biological sequence alignment editor written for Windows 95/98/NT/2000/XP/7. An intuitive multiple document interface with convenient features makes alignment and manipulation of sequences relatively easy on your desktop computer. Several sequence manipulation and analysis options and links to external analysis programs facilitate a working environment which allows you to view and manipulate sequences with simple point-and-click operations.

BioEdit.zip (Full install)
Bug fixes / changes
BioEdit General information
BioDoc.pdf (pdf format help doc)
View Screenshots

BioEdit's features include:

- Several modes of hand alignment
- Automated ClustalW alignment
- Automated Blast searches (local and WWW)
- Plasmid drawing and annotation
- Accessory application configuration
- RNA comparative analysis tools
- Graphical matrix data viewing tools
- Shaded alignment figures
- Translation-based nucleic acid alignment
- ABI trace viewing, editing and printing

Рис. 50. Інформація про програму «BioEdit». Запозичено з <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. Пояснення в тексті

Потім знайти відмінності в послідовностях, якщо вони є. Далі, якщо мутація має якісь фенотипові, метаболічні чи ще якісь прояви, провести скринінг паралельно. Після того провести кореляційний аналіз у 2-х вибірках у статистичних програмах «GraphPad Prism», «R», «StatSoft», «SAS» тощо. Якщо вони достовірно залежать одна від одної, то потрібно зробити висновок про наявність мутації.

Потрібно зазначити, якщо мутація та її локалізація відомі наперед і її необхідно лише виявити з діагностичною метою, можна взагалі обмежитися **ПЛР у реальному часі або цифровою ПЛР**. Також у клінічній практиці при лікуванні онкозахворювань чи в персоналізованій медицині (перевірка геному на наявність мутацій і SNP) дуже поширений інший метод - NGS multiplex, оскільки зараз легше й дешевше робити саме повногеномний скринінг. Це один з його варіантів.

Оформлення результатів експерименту: вклеїти у зошит отримані результати порівняльного аналізу сиквенсу виявленої за допомогою ПЛР унікальної мутації з уже існуючими в базах послідовностями за допомогою обраних програм, «BLAST» тощо.

13. Технологія перевірки наявності певного білка в зразку за допомогою дот блот аналізу

Мета роботи. Перевірити наявність певного білка в зразку за допомогою дот блот аналізу.

Матеріали та реактиви.

- 10-кратний буферний розчин TBS (1 кратний розчин містить: 50 мМ трис – HCl, pH 7,4; 150 мМ NaCl);
 - буферний розчин для відмивання TBST (0,05 % твін 20 в 1 кратному TBS – 150 мкл на 300 мл TBS);
 - розчин сухого молока для блокування місць неспецифічного зв'язування (5 % знежирене молоко в TBS – 1 г на 20 мл);
 - первинні антитіла (Anti-Bovine Serum Albumin antibody);
 - вторинні антитіла (Goat Anti-Rabbit Secondary Antibody, HRP conjugate);
- кон'югант антитіл із пероксидазою хрому;
0,1 М трис – HCl, pH 7,4;
- хромогенний пероксидазний субстрат (0,1 М трис – HCl, pH 7,4, DAB (даїмінобензидин), 30 % H₂O₂); сироватка щура, БСА, H₂O dist.

Обладнання. Самплери від 2 мкл до 20 мкл, від 20 мкл до 200 мкл та від 200 мкл до 1000 мкл, одноразові еппендорфи на 1,5 мл та «наконечники», штативи для еппендорфів, перманентний маркер, нітроцелюлозна мембрана, камера для дот блот аналізу, шейкер, одноразові рукавички без пудри, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи.

Вдягнути рукавички, вирізати мембрану потрібного розміру (1,5 на 2,5 см). Відмітити олівцем на лицьовій стороні положення зразків – відстань між ними має бути біля 1 см. Підготувати серійні розведення БСА у TBS: від 10 мг/мл до 1 мг/мл та зразок сироватки щура (розвести в 10 разів H₂O dist). Приготувати 250 мл TBST (додати 125 мкл твін 20), лишити розчинятися. Приготувати 20 мл розчину сухого молока, лишити набухати. Нанести по краплинах 5 мкл

зразків (зокрема негативний контроль – TBS чи TBST) на мембрану, не торкаючись її «наконечником» сеплера. Підсушити мембрану впродовж 15 хв. Камеру для дот блот аналізу сполоснути TBST, помістити туди мембрану (лицевою частиною донизу), додати 20 мл розчину сухого молока, тримати камеру на шейкері впродовж 30 хв.

Після цього етапу мембрану можна використовувати для подальшого аналізу (або лишити її в розчині молока при 4 °C на ніч). Злити буферний розчин із молоком, двічі відмити мембрану, тримаючи її на шейкері в TBST (щоб покривав мембрану) по 3 хв.

Розвести первинні антитіла в TBST (1:50): на 10 мл - 200 мкл антитіл і 9800 мкл TBST. Додати до мембрани антитіла, інкубувати 45 хв на шейкері. Злити розчин із антитілами, додати TBST (можна H₂O dist), одразу злити; відмити 2 рази в TBST по 3 хв.

Розвести вторинні антитіла в TBST (1:3000): 3 мкл антитіл до 9 мл TBST. Додати до мембрани, інкубувати 45 хв на шейкері. Злити розчин із антитілами, додати TBST (можна H₂O dist), одразу злити; відмити 2 рази в TBST по 3 хв. Відмити в 0,1 М трис – HCl, pH 7,4 - 3 хв. Злити. Перевернути мембрану на лицьовий бік, додати хромогенний пероксидазний субстрат (на 20 мл: 5 мг DAB, 7,5 мкл 30 % H₂O₂, 0,1 М трис – HCl, pH 7,4 до 20 мл), помістити на шейкер.

Увага! Техніка безпеки: маніпуляції з DAB проводять в одноразових рукавицях (обов'язково використовуються й інші засоби індивідуального захисту – маска і окуляри і, звісно ж, халат). Він є мутагеном!

Оформлення результатів експерименту: у зошит зробити висновок щодо наявності певного білка в досліджуваному біологічному матеріалі на основі забарвлення певних точок на мембрані.

14. Диск-електрофорез білків молока в системі Лемлі

Мета роботи. Приготувати зразки, сформувати гелеві пластинки та провести диск-електрофорез білків молока в системі Лемлі.

Матеріали та реактиви. Для приготування зразків:

- 5 мл свіжого молока;
- буферний розчин для приготування зразків диск-електрофорезу в системі Лемлі;
- 25 % розчин трихлороцтової кислоти (ТХОК);
- 96 % етанол;
- 1М розчин трису.

Для заливки гелю:

- 40 % розчин акриламиду/бісакриламиду;
- буферні розчини для розподільчатого гелю та концентруючого гелю;
- 1,5 % персульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$);
- H_2O dist;
- деіонізована вода (Milli-Q H_2O),
- розчин ізоамілового спирту.

Для проведення електрофорезу:

- буфер для розподільчатого гелю та концентруючого гелю;
- 1,5 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$;
- електродний буферний розчин для системи Лемлі;
- маркери молекулярної маси в діапазоні від 100 кДа до 10 кДа;
- H_2O dist;
- деіонізована вода (Milli-Q H_2O),
- розчин ізоамілового спирту;
- фіксуючий розчин;
- розчин барвника (кумасі синій);
- 9 % розчин оцтової кислоти (для видалення залишкового барвника).

Обладнання. Для приготування зразків. Витяжна шафа; центрифуга лабораторна (10000-15000 об/хв) із ротором для еппендорфів (1,5 - 2 мл); баня водяна (яка дозволяє отримувати 85 - 90 °С); набір самплерів (10-200, 100-1000, 1000-5000 мкл); еппендорфи на 1,5-2 мл; фільтрувальний папір; скляні палочки; скляні пластини необхідних розмірів; блок для заливки поліакриламідних платівок; спейсери; гребінка; пластикова градуйована піпетка; скляні стакани (25, 50, 100, 250 мл); лоток для фарбування гелів; одноразові рукавички без пудри, перманентний маркер, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи. Приготування зразків для електрофорезу.

В еппендорф на 1,5 мл додати 500 мкл свіжого молока та 500 мкл 25 % розчину ТХОК. Ретельно перемішати та залишити інкубуватися 5 хв за кімнатної температури.

Суміш центрифугувати при 10000 об/хв протягом 5 хв. Супернатант обережно злити, а до осаду додати 1 мл 96 % етанолу. Ретельно перемішати суміш та знову центрифугувати при 10000 об/хв протягом 5 хв. Процедура попереднього пункту повторити двічі. Обережно злити супернатант та випарити залишки етанолу на водяній бані всередині витяжної шафи.

До осаду додати 200 мкл буферного розчину для зразків (який приготувати наступним чином: до 1 мл електродного буферу (6 г/л трису, 28,8 г/л гліцину та 1 г/л ДСН) додати 9 мл Milli-Q H₂O. До розчину додати 0,2 г ДСН, 0,5 г сахарози, 10 крапель розчину бромфенолового синього (до появи стійкого фіолетового кольору). Після додавання всіх компонентів, буферний розчин ретельно прогріти на водяній бані за температури 85 - 90 °С протягом 5 хв. Якщо при додаванні буферного розчину для зразків колір розчину змінюється на жовтий, то додати 5 мкл 1М розчину трису.

Після охолодження зразків до кімнатної температури вони придатні для нанесення на ПААГ. Зразки можна зберігати при температурі 40 °С протягом 2 - 3 тижнів.

Заливання гелю:

Скласти блок для заливання згідно інструкції фірми-виробника блоку. Після проведення усіх необхідних процедур ми маємо сформовану камеру для заливання та полімеризації гелю, що утворена між двома скляними пластинками за допомогою бічних спейсерів певної товщини. Товщина спейсерів повинна бути повністю тотожною до товщини гребінки, яка використовується задля утворення лунок для нанесення зразків білків/пептидів. Після складання блоку необхідно перевірити його герметичність за допомогою $\text{H}_2\text{O dist}$. У разі відсутності повної герметичності систему розібрати та знову скласти згідно інструкції виробника.

Помістити гребінку повністю в зібраний блок. Помітити скляну пластинку на 1 см нижче зубчиків гребінки. Це - рівень, до якого заливається **розподільчий гель**. Далі гребінку видалити.

Приготувати розчин мономерного **розподільчого гелю** потрібної концентрації, змішавши всі реактиви, крім $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, згідно таблиці 8.

Розподільчий буферний розчин приготувати, змішуючи 22,7 г трису, 0,5 г ДСН, 1 мл ТЕМЕД, рН 8,8 (довести 2,8 М HCl) з розрахунку на 250 мл. Розчин акриламід у приготувати, змішуючи 40 г акриламід, 1,08 г NN' -метиленабісакриламід та 59 г $\text{H}_2\text{O dist}$ із розрахунку на 100 мл.

Таблиця 8. Компоненти розподільчого гелю (на пластинку 10×10 см)

Вміст мономерів, % Складові, мл	5	6	7	8	10	12	15	18
Розподільчий буферний розчин	6	6	6	6	6	6	6	6
$\text{H}_2\text{O dist}$	4,2	3,9	3,65	3,4	2,85	2,28	1,4	0,5
40 % розчин акриламід	1,5	1,8	2,1	2,4	3	3,6	4,5	5,4
1,5 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$	0,3	0,3	0,25	0,2	0,15	0,12	0,1	0,1

У разі необхідності дегазувати готовий розчин під вакуумом протягом не менше 15 хв. Не використовувати для цього аспіратор води зливу!

Додати необхідний об'єм $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ до розчину мономерного розподільчатого гелю (див. таблицю), долити до мітки, використовуючи скляну

або одноразову пластмасову піпетку. Розчин необхідно заливати безперервно, щоб уникнути його змішування з повітрям!

Розчин мономеру негайно покрити зверху $\text{H}_2\text{O dist}$ або розчином ізоамілового спирту.

Гель залишити до повної полімеризації: від 45 хв до 1 год. Після цього зполоснути поверхню гелю $\text{H}_2\text{O dist}$. Не залишати спирт на гелі більше, ніж на 1 год, бо це веде до зневоднення поверхні гелю!

Приготувати 4 % розчин **концентруючого** мономерного гелю, для цього змішати всі реактиви, крім $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (концентруючого буферного розчину (на 100 мл якого додати 3,03 г трису, 0,2 г ДСН, 0,4 мл ТЕМЕД, рН 6,8 (довести 2,8 М HCl)) - 2 мл, розчину акриламід - 0,4 мл, $\text{H}_2\text{O dist}$ - 1,4 мл). У разі необхідності дегазувати розчин під вакуумом протягом не менше 15 хв. Додати 0,2 мл $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ до концентруючого розчину мономерного гелю та негайно розпочати лити розчин між скляними пластинками. Продовжувати лити до тих пір, поки не буде досягнуто вершини короткої скляної пластини.

Вставити необхідну гребінку між спейсерами, починаючи зверху. Найпростіше вставляти гребінку від кута і так далі до іншого кута до повної фіксації. Слід пам'ятати, що потрібно залишити не менше 1 см товщини концентруючого гелю у пластинці.

Концентруючий гель залишити на полімеризацію протягом 30 - 45 хв за кімнатної температури.

Гребінку акуратно видалити, обережно сполоснути сформовані лунки $\text{H}_2\text{O dist}$ або буферним розчином для нанесення.

Проведення електрофоретичного розділення.

Зібрати систему для проведення електрофоретичного аналізу (згідно інструкції до приладу).

Налити електродний буферний розчин (містить 6 г/л трису, 28,8 г/л гліцину та 1 г/л ДСН) до мітки в систему для проведення електрофоретичного аналізу (згідно до позначок на зовнішньому боці системи для електрофоретичних досліджень).

Нанести зразки білків молока, починаючи з 25 мкл на лунку і далі по 20, 15, 10, 5, 3 та 1 мкл. По обидва боки від зразків молока внести маркери молекулярної маси в діапазоні від 100 кДа до 10 кДа.

Підключити систему для електрофорезу до джерела живлення та виставити значення сили струму на позначку 19 мА. Треба звернути увагу на те, що білкові зразки у нас заряджені від'ємно!

Після проходження електрофоретичного фронту концентруючого гелю перемикнути значення сили струму на позначку 36 мА.

У разі використання одночасно двох та більше електрофоретичних пластинок в одній системі для проведення електрофоретичного аналізу значення сили струму потрібно помножити на кількість пластинок, які використовуються одночасно.

За умови досягнення електрофоретичним фронтом відстані 1 см від нижнього краю пластинки, прилад вимкнути, а систему розібрати.

ПААГ обережно зняти зі скла та перенести в лоток із фіксуючим буферним розчином (10 % - концентрованої CH_3COOH , 25 % - ізопропанолу, 65 % - H_2O dist) на 10 - 15 хв за кімнатної температури, постійно перемішуючи.

Після фіксації пластинку ПААГ перенести в розчин кумасі синього (барвник, приготувати, послідовно розчиняючи 2,5 г кумасі G250 або R250 у 10 мл етанолу, 15 мл ізопропанолу та 10 мл концентрованої CH_3COOH ; після додавання кожного з розчинників ретельно перемішати суміш протягом 20 - 30 хв, а потім об'єм розчину довести до 100 мл) на 15 - 20 хв за кімнатної температури, постійно перемішуючи.

Для видалення залишків барвника гель внести у скляний стакан з 9 % CH_3COOH , температура якого складає 85 - 90 °C. Після інкубації протягом 30 - 45 хв, гель перенести в лоток з H_2O dist та проаналізувати.

Оформлення результатів експерименту: проаналізувати отриману електрофореграму та у зошитах зробити висновок щодо ефективності розділення смуг певної молекулярної маси (порівнюючи з нанесеними

маркерами молекулярної маси) та якісного складу білків молока (яка молекулярна маса смуг, виявлених на електрофореграмі).

15.Визначення кількісного вмісту ІЛ-5 у сироватці миші методом ІФА

ІЛ-5 миші являє собою глікопротеїн із молекулярною масою 45-60 кДа і є фактором, необхідним для відновлення Т-клітин і зростання В-клітин. Цей цитокін активує проліферацію В-клітин і синтез ними імуноглобулінів (Ig). Також були описані й інші функції ІЛ-5, такі як індукування зростання та диференціювання еозинофілів; індукція експресії ІЛ-2R як на нормальних, так і на активованих В-клітинах селезінки; а також збільшення секреції IgA В-клітинами, стимульованими бактеріальним ліпополісахаридом. Передбачається, що цей цитокін відіграє важливу роль у функціонуванні мишачих Т-хелперів 2-го типу (TH2).

Мета роботи. Визначити кількісний вміст ІЛ-5 у сироватці миші методом прямого ІФА.

Матеріали та реактиви.

Набір реагентів «Mouse IL-5 ELISA Kit» наступного складу:

- полістироловий 96-луночний ІФА-планшет із сорбованими на ньому антитілами до ІЛ-5 миші;
- ліофілізований рекомбінантний стандарт, що містить ІЛ-5 миші;
- розчин для розведення зразків;
- розчин для промивання (30 X);
- кон'югат антитіл до ІЛ-5 миші з пероксидазою хрому;
- розчин субстрату, що містить тетраметилбензидин;
- стоп-реагент, який містить 0,16 М H₂SO₄; H₂O bi dist.

Обладнання. Одноканальні самплери від 2 мкл до 20 мкл та від 20 мкл до 200 мкл, багатоканальні самплери від 20 мкл до 2000 мкл та від 200 мкл до 1000 мкл, одноразові еппендорфи на 1,5 мл та «наконечники», штативи для еппендорфів, перманентний маркер, термостат, автоматичний промивальний пристрій (вошер) для планшетів, ІФА планшетний аналізатор (рідер), пластикові ванночки для багатоканальних самплерів, перманентний маркер,

плівка для заклеювання планшета, пінцет, одноразові рукавички без пудри, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи. Приготувати робочий розчин для промивання. Для цього 50 мл 30 X-концентрату розбавити H_2O bi dist до об'єму, рівного 1,5 л. Приготувати робоче розведення стандарту 320 пг/мл. Для цього в посуд, що містить ліофілізований реагент, додати H_2O bi dist до мітки. Приготувати калібрувальні розчини: узяти три еппендорфа на 1,5 мл і внести в них по 600 мкл H_2O bi dist. Потім у перший еппендорф внести 200 мкл розчину стандарту й ретельно перемішати. Далі відібрати з першого еппендорфа 200 мкл розчину та перенести в другий. При цьому виходять розведення 80 і 20 пг/мл відповідно. У третьому еппендорфі залишити H_2O bi dist, яка також є калібрувальним розчином з концентрацією 0 пг/мл.

Отже, порівнюючи значення абсорбції стандартів (калібрувальних зразків відомої концентрації) із значеннями абсорбції в зразках сироватки миші, можна за допомогою калібрувальної кривої кількісно визначити вміст IL-5 у досліджуваних зразках. Для цього на осі абсцис калібрувальної кривої відкладається значення концентрації зразка: наприклад, нг/мл, на осі ординат – значення поглинання (рис. 51).

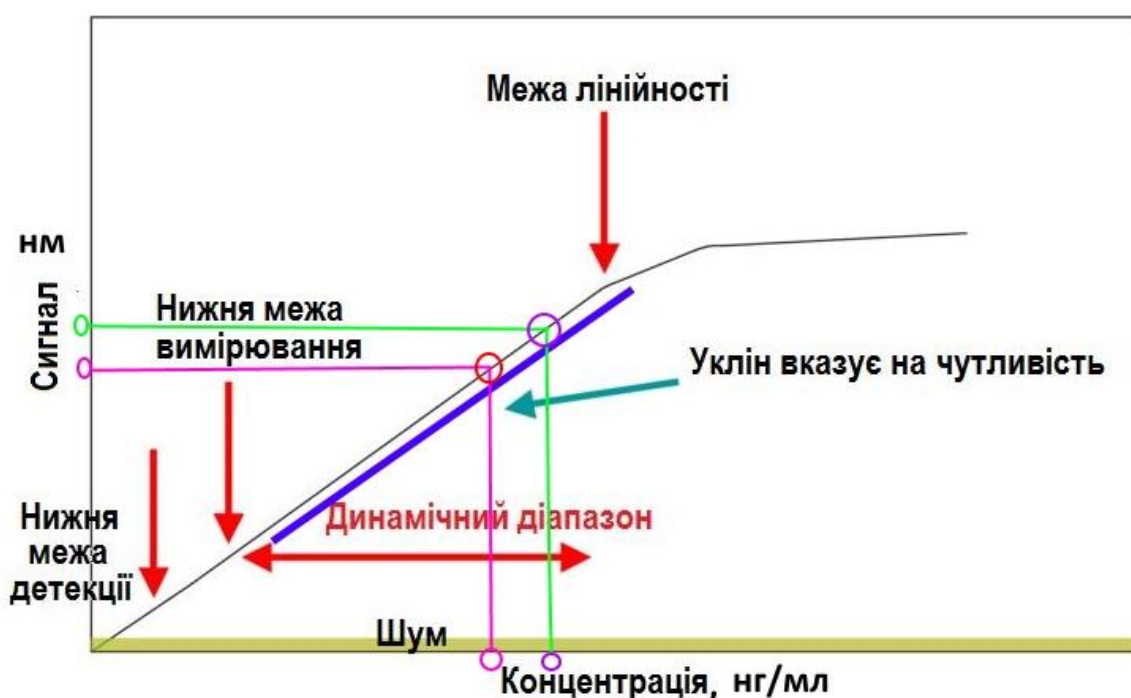


Рис. 51. Приклад будови калібрувальної кривої для кількісного визначення присутності певного білка в зразку за допомогою ІФА. Пояснення в тексті

За допомогою багатоканального сфамплера в лунки планшета внести по 50 мкл розчину для розведення зразків. За допомогою одноканального сфамплера внести по 50 мкл калібрувальних розчинів або досліджуваних зразків і перемішати, акуратно струшуючи планшет. Заклеїти планшет плівкою та інкубувати в термостаті при 37 ° С протягом 2 год.

Промити планшет 5 разів робочим розчином для промивання за допомогою вошера. Внести в лунки по 100 мкл кон'югату. Заклеїти планшет та інкубують в термостаті при 37 °С протягом 1 год. Промити планшет 5 разів.

Внести в лунки по 100 мкл розчину субстрату. Інкубувати планшет у темряві при 20 - 25 °С протягом 30 хв. Внести в лунки по 100 мкл стоп-реагенту для візуалізації проходження реакції в ньому (рис. 52).



Рис. 52. Приклад 96-луночного ІФА-планшета (зокрема, після проходження реакції в ньому)

Провести вимір оптичної щільності на рідері при 450 нм. За допомогою калібрувальної кривої визначити кількісний вміст ІЛ-5 у досліджуваних зразках.

Оформлення результатів експерименту: у зошиті за допомогою калібрувальної кривої та на основі отриманих значень зробити висновок щодо кількісного вмісту ІЛ-5 у досліджуваному біологічному матеріалі.

Типові тестові завдання до курсу

1) Зворотня транскрипція - це

- 1) синтез ДНК на матриці РНК
- 2) синтез РНК на матриці ДНК
- 3) синтез ДНК на матриці ДНК
- 4) синтез РНК на матриці РНК
- 5) синтез білка на матриці РНК

2) Для виявлення білка після електрофорезу за допомогою кумасі синього гель послідовно обробляють

- 1) розчином барвника, сумішшю кислоти й спирта, водою
- 2) розчином етидію бром истого, водою
- 3) сумішшю кислоти й спиртів, розчином барвника, розчином кислоти, водою
- 4) водою, сумішшю кислоти й спирта, розчином барвника
- 5) сумішшю кислот, розчином барвника, водою

3) Назвіть специфічні системи детекції у ПЛР у реальному часі

- 1) інтеркалюючий барвник SYBR Green I
- 2) лінійні проби, що руйнуються, - TaqMan
- 3) мічені праймери ампліфлури
- 4) праймери-проби («скорпіони»)
- 5) проби з інвертованими повторами («молекулярні маячки»)

4) Подрібнена тканина в буферному розчині (суміш до центрифугування) називається

- 1) екстрактом
- 2) супернатантом
- 3) гомогенатом
- 4) центрифугатом
- 5) лізатом

5) Лінія УФ-поглинання ДНК:

- 1) 760 нм
- 2) 180 нм
- 3) 260 нм
- 4) 280 нм
- 5) 230 нм

6) Виділення ДНК із тканин рослин є більш важким через наявність

- 1) великої кількості ДНК
- 2) вторинних метаболітів і полісахаридів

- 3) ліпідів
- 4) специфічних протеїнів
- 5) клітинної стінки

7) Процес приєднання праймера до денатурованої ДНК - це

- 1) елонгація
- 2) денатурація
- 3) ренатурація
- 4) відпал
- 5) гібридизація праймерів

8) При ПААГ-електрофорезу з використанням ДСН розподіл білків відбувається

- 1) за зарядом
- 2) у залежності від радіуса білкової глобули
- 3) за молекулярною масою
- 4) за конформацією
- 5) за зарядом і молекулярною масою

9) Рестриктази – це:

- 1) ендонуклеази, специфічні до невеликих елементів послідовності
- 2) екзонуклеази, специфічні до невеликих елементів послідовності
- 3) ендонуклеази, специфічні лише до паліндромів
- 4) АТР-залежні ендонуклеази, специфічні до невеликих елементів послідовності
- 5) екзо- та ендонуклеази, специфічні до невеликих елементів послідовності

10) Фрагмент Кленова ДНК-полімерази І не має каталітичної активності:

- 1) полімеразної
- 2) 3'-екзонуклеазної
- 3) 5'-екзонуклеазної
- 4) 3'-екзонуклеазної та лігазної
- 5) 3'- та 5'-екзонуклеазної

11) За допомогою фага λ можна клонувати фрагменти ДНК довжиною:

- 1) 10 тис пар основ
- 2) 20-25 тис пар основ
- 3) 30 тис пар основ
- 4) 40 тис пар основ
- 5) 25-30 тис пар основ

12) Яка з модифікацій системи CRISPR/Cas дозволяє активувати мішені за рахунок доставки транскрипційних активаторів до енансерів цільових

генів?

- 1) CRISPR/wtCas9
- 2) CRISPR/Cas9 D10A
- 3) CRISPR/GFP
- 4) CRISPR/dCas9
- 5) CIRSPR/FokI

13) Трансдуковані клітини – це:

- 1) клітини, в яких один із сигнальних шляхів було інактивовано
- 2) ембріональні стовбурові клітини, що було штучно виведено зі стану спокою
- 3) клітини, що мають неприродний шлях трансдукції сигналу
- 4) клітини, в які було успішно внесено трансген методом мікроін'єкції ДНК
- 5) клітини, в які було успішно внесено трансген у складі вірусного вектора

14) Метод дробовика (shotgun) – це:

- 1) бомбардування клітин частинками золота, вкритими ДНК
- 2) фрагментація геномної ДНК вільними радикалами
- 3) часткова фрагментація геномної ДНК рестриктазою
- 4) тотальна фрагментація геномної ДНК рестриктазою
- 5) підвищення ефективності сплайсингу мРНК

15) Найчастіше для отримання інтра- чи екстраклітинних гетерологічних білків *S. cerevisiae* використовуються:

- 1) епісомні плазмиди – YEр (Yeast episomal plasmids)
- 2) інтегруючі плазмиди - YІр (Yeast integrating plasmids)
- 3) центромерні плазмиди - YСр (Yeast Centromeric plasmid)
- 4) епісомні плазмиди YEр та інтегруючі плазмиди YІр
- 5) штучні хромосоми (YAC)

16) Одна з найголовніших проблем експресії еукаріотичних білків у клітинах прокаріот – це:

- 1) відсутність у бактерій хроматинових структур
- 2) відсутність у бактерій еукаріотичної системи поліаденілування мРНК
- 3) нестабільні конструкти, неможливо запобігти утворенню біоплівок
- 4) відсутність у бактерій еукаріотичних систем посттрансляційних модифікацій
- 5) резистентність до спрямованого мутагенезу, нестача кисню для оптимального росту

17) Експресуючі вектори на основі ДНК бакуловірусів використовують для експресії білків у:

- 1) бактеріях
- 2) дріжджах

- 3) клітинах комах
- 4) клітинах ссавців
- 5) вірусах

18) Внесення трансгенів для синтезу антитіл проти цільових антигенів в організмах тварин має назву:

- 1) *in vitro* імунізація
- 2) зворотна вакцинологія
- 3) трансдукція
- 4) *in vivo* імунізація
- 5) позитивна імуноселекція

19) Вектори, які запропоновано використовувати в генній терапії людини, є на основі

- 1) ретровірусів
- 2) тогавірусів
- 3) дріжджових штучних хромосом
- 4) респіроцитів
- 5) аденовірусів

20) Вектори на основі Ti-плазмід повинні містити:

- 1) гени вірулентності та полілінкер
- 2) ділянку T-ДНК Ti-плазмід *Agrobacterium tumefaciens*
- 3) полілінкер, «кілерний ген»
- 4) оріджин *E.coli* + *A. Tumefaciens*, *vir* гени
- 5) гени ауксинів, *vir* гени

21) Найбільш ефективним засобом запобігання метаболічного перевантаження при експресії рекомбінантних білків є:

- 1) підвищення сили промотора
- 2) підвищення числа копій плазмід
- 3) підвищення числа копій трансгена в плазміді
- 4) інтеграція трансгена в геном клітини-хазяїна
- 5) введення трицистронних векторів

22) Антизмістовні олігонуклеотиди використовуються для:

- 1) специфічного посттранскрипційного вимикання генів
- 2) гібридизації на нейлонових фільтрах
- 3) сиквенування ДНК
- 4) ідентифікації трансформованих бактерій
- 5) knock-in генів

23) Яким чином можна відібрати особу чи клітину, в яких відбулася специфічна інтеграція трансгена в певне місце геному?

- 1) схрещуванням за спеціальною схемою

- 2) рестрикційним аналізом
- 3) ПЛР
- 4) фінгерпринтингом
- 5) ЗТ-ПЛР

24) Метод піросиквенування ДНК базується на:

- 1) специфічному гідролізі ДНК поряд із нуклеотидом певного типу
- 2) зупинці синтезу ДНК після приєднання дидезоксинуклеотиду певного типу
- 3) детекції вивільнення пірофосфату після приєднання нуклеотиду певного типу
- 4) пірофосфорильованні нуклеотиду певного типу
- 5) відсутності етапу синтезу

Відповіді на типові тестові завдання

1	1
2	3
3	2, 4, 5
4	3
5	3
6	2
7	4, 5
8	3
9	1
10	3
11	2
12	4
13	5
14	3
15	1
16	4
17	3
18	4
19	1, 5
20	3
21	4
22	1
23	3
24	3

Список використаної та рекомендованої літератури

1. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. / Б. Глик, Дж Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 585 с.
2. Горбунова В. Н. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. / В. Н. Горбунова, В. С. Баранов. – Санкт-Петербург. : Специальная литература, 1997. – 287 с.
3. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии: учебное пособие для вузов - М.: "Академия", 2008. - 208 с.
4. Карапетян О. Ш. Учебно-методическое пособие к проведению лабораторных работ и контроля самостоятельной работы студентов по молекулярной биологии Академии биологии и биотехнологии ЮФУ/ О. Ш. Карапетян, Е. М Вечканов, И. А. Сорокина, Ростов-на-Дону: Изд-во ЮФУ, 2015. – 100 с.
5. Каталог фірми «Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments» за 2010. – 585 с.
6. Каталог фірми «Thermo scientific molecular biology tools product guide» за 2012-2013. – 320 с.
7. Льюин Б. Гены. / Б. Льюин. – М. : Мир, 1987. – 544 с.
8. Малюта С. С. Изучение полиморфизма ДНК жителей Украины, выявляемого зондом на основе фага M13 / С. С. Малюта, М.В. Дыбков, Г.Д. Телегеев / Цитология и генетика. – 1996. – Т.30, № 1. – С. 31 – 35.
9. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / за ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М. : Мир, 1999. – 205 с.
10. Пименов М.Г. Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа. / М.Г. Пименов, А.Ю. Культин, С.А. Кондрашов. – М. : ГУ ЭКЦМВД России, 2001. – 144 с.

11. NGS: высокопроизводительное секвенирование / за ред. Д. Ребриков, Д. Коростин, Е. Шубина, В. Ильинский. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2015. – 232 с.
12. ПЦР «в реальном времени» / за ред. Д. В. Ребриков, Г. А. Саматов, Д. Ю. Трофимов. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 202 с.
13. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии. / В.Н. Рыбчин. – Санкт-Петербург: СПбГТУ, 2002. – 522 с.
14. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология. - М.: "Академия", 2006. - 208 с.
15. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія : навч. посіб. / А. В. Сиволоб. - К. : ВПЦ "Київський університет", 2008. – 384 с.
16. A Handbook for Gel Electrophoresis / Cambrex, 2012. - 143 p.
17. Buckingham L. Molecular diagnostics: fundamentals, methods and clinical applications. / L. Buckingham, M. Flaws. – F.A. Davis Company, Philadelphia, 2007 – 479 p.
18. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol / P. Chomczynski, N. Sacchi // Anal Biochem. – 1987. – 162, № 1. – P. 156 – 159.
19. Debnath M. Molecular diagnostics: promises and possibilities. / M. Debnath, G. B. K. S. Prasad, P.S. Bisen. – Springer, 2010. – 520 p.
20. Genetic diversity in populations of Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) / A.S. Dranitsina [et al]. // Цитология и генетика – 2006. – Т.40, №2 – P. 57 – 62.
21. Glick, B.R., Pasternak J.J., Patten C. Molecular biotechnology : principles and applications of recombinant DNA, 4th ed. - Washington: DC by ASM Press, 2010.
22. Heather J. M. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA / J. M. Heather, B. Chain // Genomics. – 2016. – 107 – P. 1 – 8.

23. Jeffreys A. J. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA / A.J. Jeffreys, V. Wilson, S. L. Thein // Nature. - 1985. – 314, № 6006 – P. 67 – 73.
24. Laboratory biosafety manual – Third edition, World health Organization. – Geneva, 2004. – 170 p.
25. Livak K. J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen. // Methods. – 2001. – 25. P. 402 – 408.
26. Molecular cell biology / H. Lodish [et al.]. – Seventh edition. – New York: W. H. Freeman, 2012. – 973 p.
27. Molecular Biology of the Cell / B. Alberts [et al.]. – Sixth edition. – Garland Science, 2014. – 1464 p.
28. molbiol [Електронний ресурс]: російська версія / Режим доступу: <http://www.molbiol.ru> (дата звернення: 10.01.2019).
29. Patrinos G. Molecular diagnostics / Patrinos G., Ansorge W. – First Edition. – Elsevir, 2005. – 616 p.
30. PCR technology: principle and applications for DNA amplification ; ed. H. Erlich. - New York : W.H.Freeman and Company, 1992.
31. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis. – Second edition. – Cold Spring Harbor Laboratory Pr., 1987. – 1659 p.
32. Schadt E.E., Turner S., Kasarskis A. A window into third-generation sequencing // Human Mol. Genet. - 2010 - Vol. 19. - P. 227-240.
33. Walker J.M., Rapley R. Molecular Biomethods Handbook. Second Edition / Humana Press, 2008. – 1124 p.
34. Weinberg R. A. The biology of cancer / R. A. Weinberg. – Second edition. – Garland Science, 2007. – 960 p.