

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

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
“ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДІАГНОСТИКИ”**

Затверджено на засіданні кафедри біохімії,
протокол № 12 від 12 квітня 2017 року
В. о. зав. кафедри, проф. О. М. Савчук

Затверджено на засіданні Вченої Ради
ННЦ «Інститут біології та медицини»,
протокол № 13 від 23 червня 2017 року
Голова Вченої Ради, проф. Л. І. Остапченко

Упорядники:

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

Київ-2017

Зміст

Загальні теоретичні положення.....	3
Коротка характеристика навчальної дисципліни.....	3
Особливості очищення нуклеїнових кислот для проведення ПЛР у реальному часі та інших молекулярно-біологічних методів.....	3
Гель-електрофорез в агарозному та поліакриламідному гелі.....	7
Спектрофотометрія нуклеїнових кислот.....	22
Дот блот аналіз.....	25
Основи полімеразної ланцюгової реакції.....	27
ПЛР у реальному часі.....	31
Аналіз даних ПЛР у реальному часі.....	39
ДНК-фінгерпринтинг.....	43
Сиквенування нуклеїнових кислот.....	47
Протоколи лабораторних занять.....	52
1. Порівняння якості та кількості тотальної ДНК при виділенні за допомогою рідкофазних і твердофазних методів.....	52
2. Особливості роботи з РНК. Виділення РНК за допомогою різних методів.....	55
3. Якісний і кількісний аналіз препаратів нуклеїнових кислот за допомогою гель-електрофорезу в агарозному гелі.....	58
4. Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК і РНК.....	61
5. Технологія перевірки наявності певного білка в зразку за допомогою дот блот аналізу	63
6. Кількісний аналіз експресії мРНК певного гена за допомогою ПЛР у реальному часі.....	65
7. Рестрикційний аналіз геномної та векторної ДНК для ДНК фінгерпринтунгу.....	80
8. Аналіз сиквенованих нуклеотидних послідовностей: пошук гомологій.....	83
Список використаної і рекомендованої літератури.....	87

Загальні теоретичні положення

Коротка характеристика навчальної дисципліни

Метою дисципліни – «Основи молекулярної діагностики» є отримання студентами фундаментальних знань і сучасних уявлень про методи та підходи, які застосовуються в молекулярній діагностиці та галузях її застосування. До основних задач курсу входить детальне ознайомлення з методами кількісного та якісного аналізу ДНК, РНК і білків. Розглянуто особливості застосування кожного з методів для вирішення конкретних завдань медицини, криміналістики, ветеринарії, промисловості, фармацевтики тощо. Докладно описані переваги та обмеження застосування молекулярної діагностики для вирішення певних поставлених задач як у галузі науки, так і лабораторної діагностики. Окреслено перспективи подальшого розвитку молекулярної діагностики, у першу чергу, поєднання із сучасними медико-біологічними підходами, зокрема наномедицини.

Особливості очищення нуклеїнових кислот для проведення ПЛР у реальному часі та інших молекулярно-біологічних методів

Методи виділення ДНК умовно ділять на аналітичні і препаративні, що залежить від кількості необхідної ДНК. Ці методи розрізняються кількістю вихідного матеріалу, обсягами розчинів реагентів. Головна умова - суворе дотримання початково встановлених співвідношень реагентів.

Для підготовки біологічного зразка до ПЛР, рестрикції ДНК, сиквенування тощо в залежності від поставлених завдань, часу аналізу і ступеня очищення використовують різні методики. Їх суть полягає в екстракції нуклеїнової кислоти (НК) із препарату та видаленні чи нейтралізації сторонніх домішок (білків, залізовмісних з'єднань тощо) для отримання максимально цілісного зразка НК, оскільки довгі лінійні молекули ДНК при їх ізоляції з клітини неминуче фрагментуються.

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;
- малі затрати часу;
- безпека;
- можливість роботи з різними біологічними об'єктами;
- відтворюваність і валідація результатів;
- можливість автоматизації.

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 (ПЛР із зворотною транскрипцією) потребує високої чистоти зразка РНК для досягнення кращої ефективності синтезу кДНК.

Усі сучасні методи очищення НК можна поділити на дві великі групи: методи з поетапним видаленням домішок із водного розчину НК – рідкофазні та методи, засновані на сорбції НК на твердій фазі - твердофазні. Найбільш відомою методикою першого типу є **фенол-хлороформна екстракція** (для виділення ДНК [Blin and Stafford, 1976]; для РНК - [Chomczynski et al, 1987]). 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.

Стандартною й також класичною вважається рідкофазна методика отримання чистого препарату НК, запропонована Marmur [Marmur, 1961]. Вона передбачає ферментативний протеоліз клітин із подальшою депротеїнезацією та осадженням НК спиртом. **Виділення із застосуванням NaCl** [Малюта, 1996; Dranitsina, 2006] порівняно зі стандартною фенол-хлороформною

екстракцією давали приблизно однакові результати як з кількості, так і з нативності ДНК, яку виділяли (рис. 1). Проте метод екстракції з NaCl є більш швидким та таким, що не вимагає використання токсичних речовин.

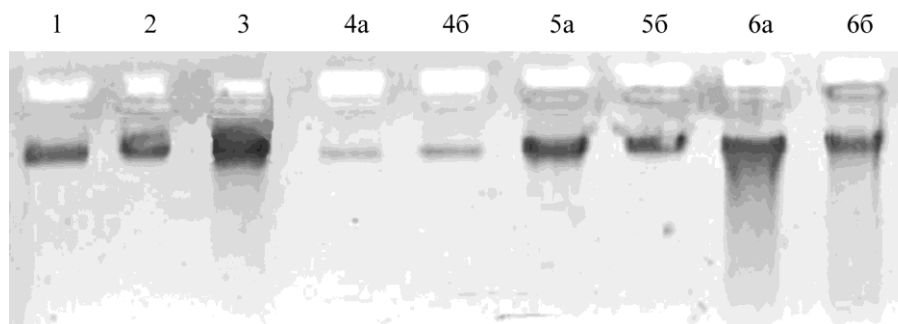


Рис. 1. Електрофореграма ДНК, яка була виділена із зразків крові пінгвінів а) за фенольно – хлороформним методом; б) за допомогою екстракції зі NaCl (0,8% агарозний гель):

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 papua*) № 1, 5 - ДНК пінгвіна дженту № 2, 6 - ДНК пінгвіна дженту № 3

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, що заважають проходженню реакції. Як правило, ця технологія містить дві стадії: кип'ятіння зразка, унаслідок чого клітинні стінки руйнуються, а НК виходять у розчин; і сорбція домішок на іонообмінник. 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. Крім того, клітинні стінки деяких мікроорганізмів не піддаються руйнуванню простим кип'ятінням. У таких випадках необхідні додаткові стадії оброблення зразку.

Також відомі методи, згідно з якими можна виділити одночасно як ДНК, так і РНК з одного джерела. При цьому використовуються сильні хаотропні агенти: гуанідінтіоціанат і тріфлуороацетат цезію для одночасного руйнування

клітинних мембран та інактивації внутрішньоклітинних рибонуклеаз (РНКаз). Проте лімітуючими факторами таких методик є необхідність довготривалого ультрацентрифугування впродовж 16 - 44 год.

Друга група методик базується на використанні **силікатних сорбентів**, які ефективно зв'язують НК у розчинах із високою іонною силою. У твердофазних методах виділення нуклеїнових кислот використовуються наступні взаємодії: а) формування водневих зв'язків із немодифікованою гідрофільною матрицею, зазвичай кварцом, у хаотропних умовах; б) іонообмін у водному розчині, зазвичай із використанням аніонообмінників; в) афінність; г) механізми виключення за розміром. 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 (йодиду натрію, перхлорату натрію, гуанідину тіоціанату) та наступній сорбції ДНК на твердому носії з оксиду кремнію (такі сорбенти на основі оксиду кремнію мають назву «скляні буси», «діатомова земля» тощо). Останнім часом використовують одноразові пластикові колонки з упакованим сорбентом. Промивання колонок розчинами з високою іонною силою видаляє білки й низькомолекулярні речовини, після чого проводять елюцію очищених НК шляхом промивання сорбенту розчинами низької іонної сили або дистильованою водою.

Також до твердофазних методів належить **метод на основі магнітної сепарації**. Зазвичай магніт прикладається до стінки пробірки, який містить зразок із магнітними частинками, щоб частинки агрегували на стінках пробірки, а залишок зразка можна було прибрати. Таким способом можна відокремлювати компоненти клітинного лізату, які інгібують ДНК-полімерази 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. 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

відмивок у пробі залишається НК, сорбована на носії, з якої 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. Однак можливі втрати продукту внаслідок незворотної сорбції на носії, а також у процесі численних відмивок. Особливо велике значення це має при роботі з невеликими кількостями ДНК в зразку.

При заборі матеріалу для методів прямої лабораторної діагностики потрібно уникати використання надлишку біоматеріалу (для ПЛР цілком достатньо міліграма 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, попередньої обробки. Так, необхідно використовувати стерильні пробірки, вільні від НК, РНКаз та ДНКаз. Певний біоматеріал повинен зберігатися в холодильнику за відповідної температури, транспортуватися з охолодженням, зокрема кров із стабілізуючими агентами: ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота), $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (цитрат натрію), але за відсутності інгібіторів ПЛР – гепарину, формаліну тощо.

Гель-електрофорез в агарозному та поліакриламідному гелі

Електрофоретичне розділення в **агарозному гелі** - це стандартний метод, який використовується для розділення, ідентифікації та очищення НК. 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 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).

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 буферного розчину; вмісту азотистих основ і температури.

Розмір молекул нуклеїнових кислот. Швидкість руху лінійних молекул НК в агарозному гелі обернено пропорційна десятковому логарифму їх молекулярних мас (рис. 2).

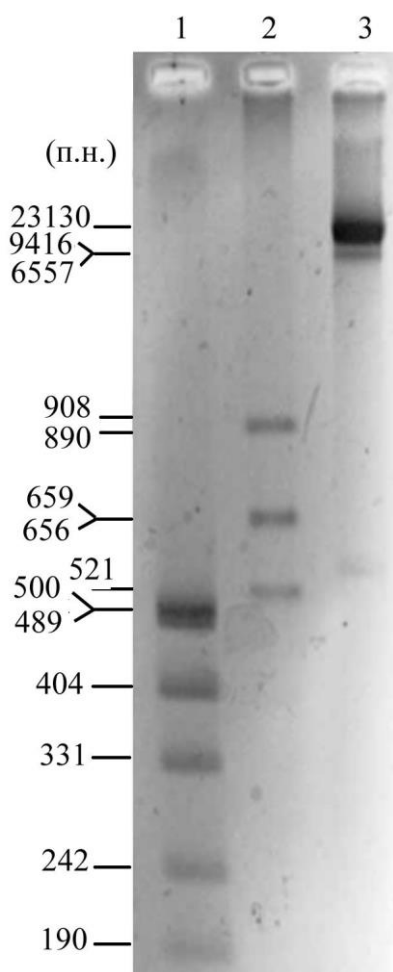


Рис. 2. Електрофореграма розділення різних маркерів молекулярної маси (1,8 % агарозний гель):

1 – молекулярний маркер (п.н.) – плазміда *pUC19*, розщеплена ферментом *MspI*; 2 - молекулярний маркер (п.н.)– плазміда *pBR322*, розщеплена ферментом

AluI; 3 - молекулярний маркер (п.н.) – ДНК фага λ , розщеплена ферментом *HindIII*.

Концентрація агарози. Агароза – природний колоїд, утворений елементом, який повторюється, - агаробіозою, що, у свою чергу, складається з β -D-галактопіранози і 3,6-ангідрид- α -1-галактопіранози, що чергуються. Агарозні гелі мають «пори» великого розміру і використовуються переважно для розділення молекул із молекулярною масою більше 200 кДа. Для загальних цілей використовують низькоендоосмотичну агарозу, яка легко плавиться. Вона дає прозорі розчини й пружні гелі навіть при малих концентраціях.

Між логарифмом електрофоретичної рухомості ДНК (μ) і концентрацією агарози геля (τ) існує пряма залежність, яка описується наступним рівнянням:

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

де μ_0 - вільна електрофоретична рухомість, а константа Kr 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

Конформація нуклеїнових кислот. Молекули ДНК, які мають однакову молекулярну масу, але різні конформації, наприклад, кільцеву інтактну (форма I), кільцеву з одностороннім розривом (форма II) і лінійну (форма III), рухаються в агарозному гелі з різними швидкостями [Thorne, 1966, 1967]. Відносна рухомість трьох зазначених форм ДНК залежить від концентрації агарози в гелі, сили струму, іонної сили буферного розчину та щільності суперспіральних витків у формі 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.

Показник напруги електричного поля. За низьких значень напруги швидкість переміщення лінійних фрагментів ДНК пропорційна нарузі. 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. Максимальна ефективність розділення фрагментів ДНК спостерігається при напруженості (градієнт потенціалу при певній нарузі до довжини між електродами), яка не перевищує 5 В/см довжини гелю (для

високоякісних або препаративних фореузів: ~ 2 В/см , для аналітичних електрофорезів прийнятна якість зберігається до ~ 6 В/см.

Вміст азотистих основ і температура. Електрофоретична рухливість ДНК в агарозних гелях (на відміну від поліакриламідних гелів [Allet et al, 1973]) слабо залежить від складу азотистих основ ДНК [Thomas, Davis, 1982]. В агарозних гелях в області температур від $+4$ до $+30^\circ$ 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 $+4^\circ$ С.

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. 3).

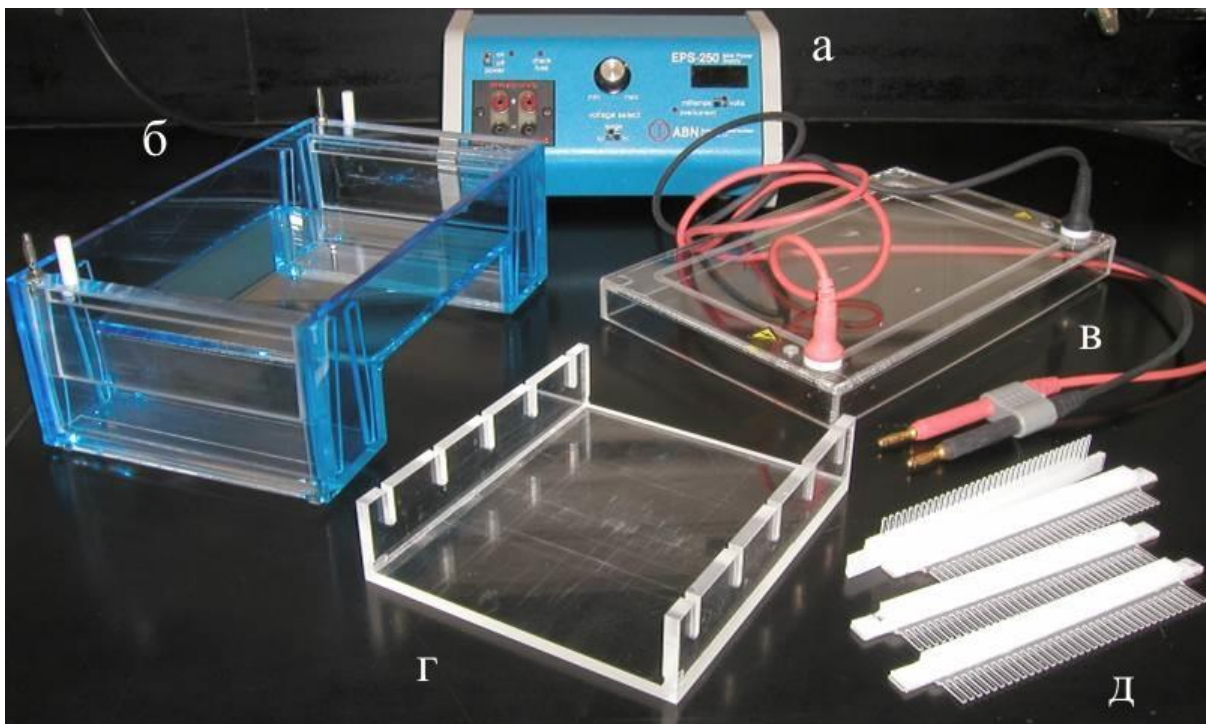


Рис. 3. Прилад та комплектуючі для проведення гель-електрофорезу в агарозному гелі (адаптовано з medicalexpro.com): а – джерело напруги, б –

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.

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 і 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. Для нанесення проб ДНК у лунки агарозного геля також використовують концентровані буферні розчини з певним барвником для нанесення проб (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° С
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° С
IV	0,25% бромфенолового синього; 40% (вага/об'єм) сахарози; H ₂ O dist	+ 4° С

Барвник полегшує внесення проб ДНК у лунку та дозволяє візуалізувати у гелі фрагмент певного розміру (табл. 4).

Найбільш зручним і відносно дешевим методом візуалізації ДНК в агарозних гелях є її забарвлення флуоресціюючим барвником бромистим етидієм.

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.

Молекула бромистого етидію містить плоску циклічну групу, яка може інтеркалювати між сусідніми азотистими основами НК, деформуючи ДНК, тому бромистий етидій є сильним мутагеном (також вважається канцерогеном і тератогеном) (рис. 4.).

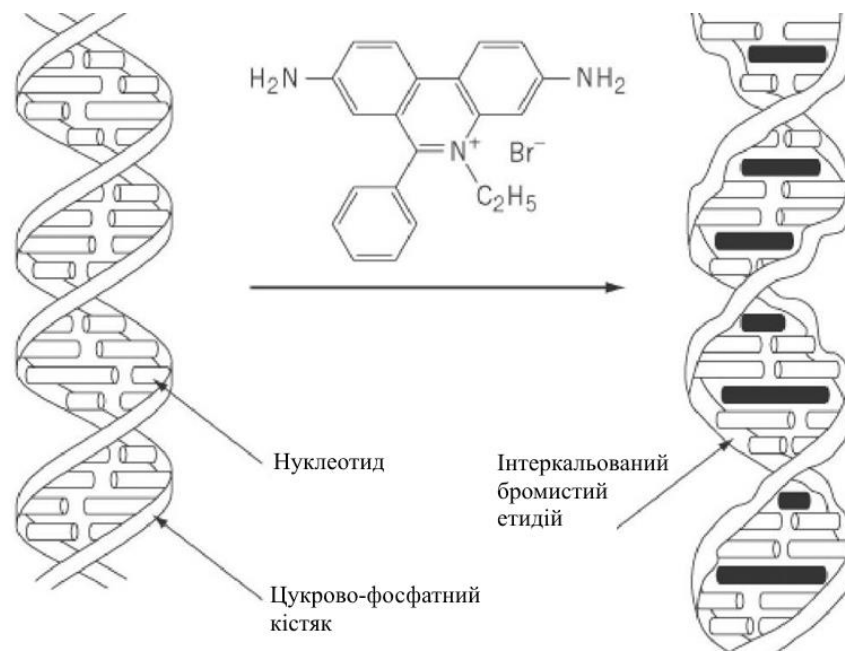


Рис. 4. Схема інтеркаляції бромистого етидію в ДНК (адаптовано з explorer.bio-rad.com). Пояснення в тексті

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 двох-, 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). Проте, 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 $\text{H}_2\text{O dist}$ (робоча концентрація 10 - 20 мкг/мл), що містять бромистий етидій на 15 - 20 хв при кімнатній температурі. Знебарвлення при цьому не потрібно, але при виявленні малих кількостей ДНК (менше 10 нг) краще знизити фонову флуоресценцію (обумовлену незв'язаним барвником), витримуючи гель 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 гелей в УФ – світлі краще використовувати жовтогарячий світлофільтр.

Більш дорожчим і одним із найбільш чутливих барвників, які застосовують для детекції дволанцюгових молекул ДНК при електрофорезі в агарозних і поліакриламідних гелях є SYBR Green I. Для цього його додають до агарозного чи поліакриламідного геля безпосередньо перед їх заливкою, 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. 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.

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 у пульсуючому електричному полі або **пульс-електрофорез** – це модифікація гель-електрофорезу в агарозному гелі. З її 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 і виділення фрагментів ДНК, довжиною менше ніж 100 п.н. [Maniatis et al, 1975]. Також практично всі електрофоретичні аналізи білків та пептидів проводять у поліакриламідному гелі (ПААГ). Цей гель складається з двох мономерних компонентів:

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

Акриламід – високотоксична речовина, працювати з ним потрібно в рукавичках та захисній масці. Акриламід під дією ініціаторів полімеризації (наприклад, персульфат натрію та TEMED) утворює лінійні полімери, а NN' -метилєнбісакриламід використовується для «зшивання» лінійних полімерів акриламиду. Застосування цього матеріалу дозволило отримувати більш контрольовані, ніж у гелі з інших матеріалів, розміри пор. Склад буферних розчинів, які використовуються для електрофорезу білків не впливає на процес полімеризації акриламиду. Природа, концентрація і рН буферного розчину визначаються особливостями самого процесу електрофорезу. Полімеризації ПААГ не заважає також присутність сечовини (навіть у високих концентраціях), гуанідинхлориду, формаміду, сахарози або інших детергентів, як ДСН (додецилсульфат натрію), Тритон X-100, цетавлон. Сахароза навіть сприяє

полімеризації і покращує механічні властивості гелю.

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

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

Концентрація акриламиду в 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 акриламиду, тим нижчою повинна бути концентрація бісакриламиду, 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 поліакриламиду не контактує з повітрям, і полімеризація пригнічується лише у вузькому шарі по краях геля. Розділення в поліакриламідних гелях проводять лише вертикально (рис. 5).

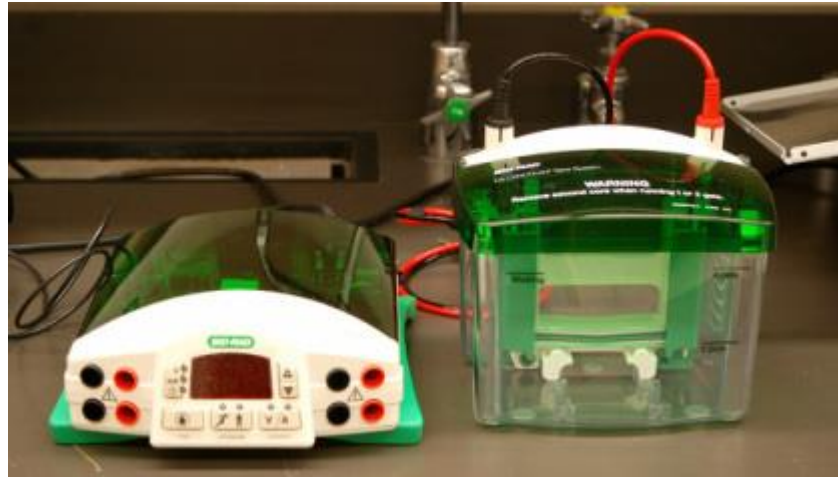


Рис. 5. Прилад та комплектуючі для проведення гелі-електрофорезу в поліакриламідному гелі (запозичено з saludeslab.org)

При аналізі ДНК у поліакриламідному гелі використовують зазначені вище буферні розчини, розчини для нанесення проб ДНК і проводять візуалізацію за допомогою бромистого етидію, як і при проведенні гелі-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: ¹⁾числа позначають приблизні розміри фрагментів ДНК (п.н.), разом з якими рухається барвник

Електрофорез із розділенням ранцюгів. У ряді випадків (наприклад, при секвенуванні 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 електрофорезу 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 поліакриламідному гелі (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. 6).

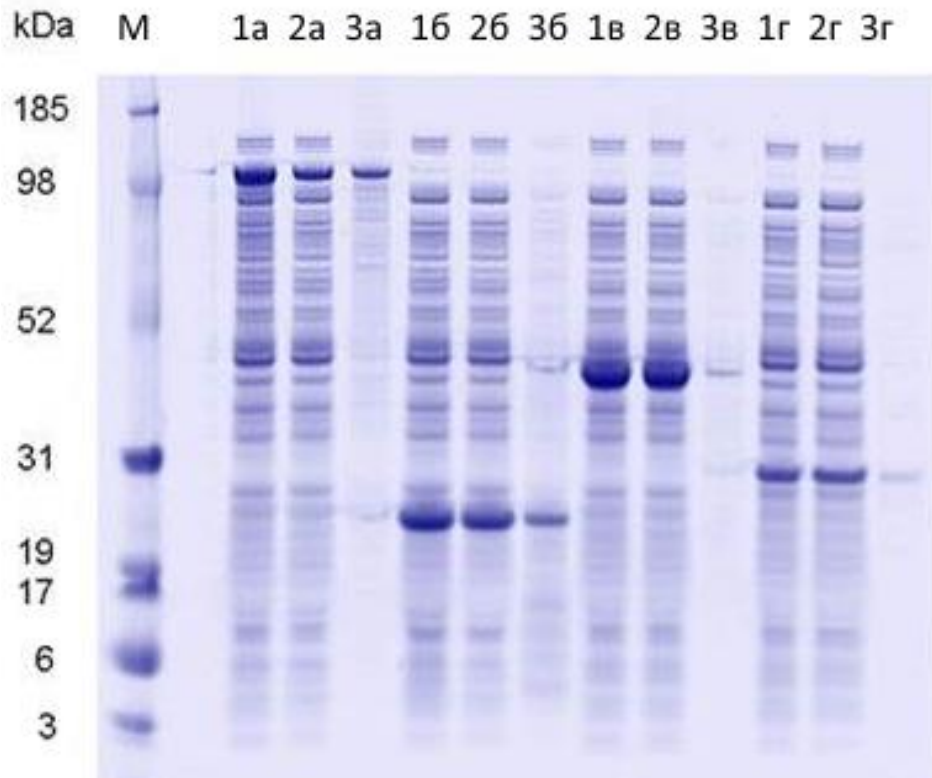


Рис. 6. Електрофореграма розділення фракцій білків із гомогенатів органів різних особин щурів:

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 гелю від надлишку барвника. При використанні кумасі ця процедура полягає в інкубації 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 поліакриламідного гелю 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 ДСН (додецилсульфат натрію) надає білкам рівномірного негативного заряду, вкриваючи їх своєю «шубою» з негативних зарядів, внаслідок чого розділення відбувається на основі відмінності в розмірах (молекулярній масі) білків.

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 та розділяючим. Використання двох гелів обумовлене підвищенням ефективності та роздільної здатності методу.

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:

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

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 **OD₂₆₀**. 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 (мкг/мл)⁻¹см⁻¹, для одностанцюгової ДНК – 33 (мкг/мл)⁻¹см⁻¹, для РНК – 40 (мкг/мл)⁻¹см⁻¹. Отже, розраховується концентрація НК в пробі на основі поглинання таким чином: **OD₂₆₀ = 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 **OD₃₃₀: OD₂₆₀ - OD₃₃₀**, свідчать про розсіювання світла і присутність твердих частинок у препараті НК. Так як чисті НК мають **OD₃₃₀ = 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 H₂O. **Класично**, співвідношення величини **OD**, що вимірюють при 260 нм, до

величини **OD**, яку отримують при 280 нм (**OD₂₆₀/OD₂₈₀**), також свідчить про чистоту НК (чисті препарати ДНК мають співвідношення **OD₂₆₀/OD₂₈₀**, 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.

OD₂₆₀ 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 **OD₂₆₀/OD₂₈₀**. 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 (скорочена назва хімічної сполуки трис-(гідроксиметил)-амінометана ($\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$), 1мМ ЕДТА, рН 7,4 - 8,0) або 20 мМ Na_3PO_4 та 0,1 М NaCl , рН 7,5 - 9,0, або 100 мМ K_2HPO_4 , рН 8,2.

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

OD₂₆₀	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

Іншим показником чистоти препарату ДНК або РНК є відношення значень поглинання OD_{260}/OD_{230} . Коли препарат чистий, це співвідношення зазвичай дорівнює 1,8 – 2,2. Менші значення співвідношення OD_{260}/OD_{230} свідчать про забруднення препарату вуглеводами або компонентами, які залишаються після процедури виділення ДНК або РНК, наприклад, фенолом, тіаціанатами тощо.

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.

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, дігксигенін (DIG), радіоактивну мітку (наприклад, $[\alpha\text{-P}_{32}]\text{-dCTP}$) 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

хрону (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) або аналіз РНК.

Окрім вищезазначеного, дот блот використовується як система аналізу наявності певних білків у зразку (рис. 7), зокрема, мутантних чи специфічних білків у клітинних екстрактах, отриманих від пацієнтів із генетичними чи інфекційними захворюваннями.

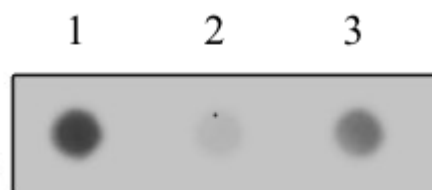


Рис. 7. Дот блотограма при підборі умов реакції для виявлення альбуміну в зразках сироватки крові щурів

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 поліакриламідному гелі, перенесення на мембрану). Аналіз білків на мембрані здійснюється імунохімічно (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).

Основи полімеразної ланцюгової реакції

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР або PCR – polymerase chain reaction) — метод молекулярної біології, завдяки якому *in vitro* забезпечується синтез бажаних фрагментів ДНК (ампліфікація) у препаративних кількостях.

Відкриття ПЛР Кері Мюллісом (Kary Banks Mullis) у 1983 р. стало однією з найбільш видатних подій в області молекулярної біології 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. Для протікання цієї реакції (у клітині чи пробірці) потрібно: вихідна молекула ДНК (матриця для реплікації), фермент термостабільна ДНК-залежна-ДНК-полімераза, іони магнію, дезоксирибонуклеотид трифосфати (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.

Ампліфікація дволанцюгових копій ДНК (від декількох сотень до декількох десятків пар нуклеотидів) відбувається експоненційно [Ребриков *и др.*, 2009]. Класична ПЛР складається з повторюваних температурних циклів, які, у свою чергу, складаються з трьох температурних режимів (рис. 8): 1) денатурація – руйнування водневих зв'язків між ланцюгами ДНК (93 - 96 °С); 2) гібридизація праймерів із ділянками на ДНК («відпал»; температура підбирається експериментально (40 - 75 °С)); 3) синтез комплементарних ланцюгів ДНК шляхом подовження праймерів (60 - 75 °С). У результаті повторення циклів ПЛР збільшення кількості фрагмента ДНК, обмеженого праймерами, іде в геометричній прогресії (з основою, близькою до 2), оскільки раніше синтезовані фрагменти в кожному циклі реакції слугують як матриці для синтезу нових фрагментів (рис. 8).

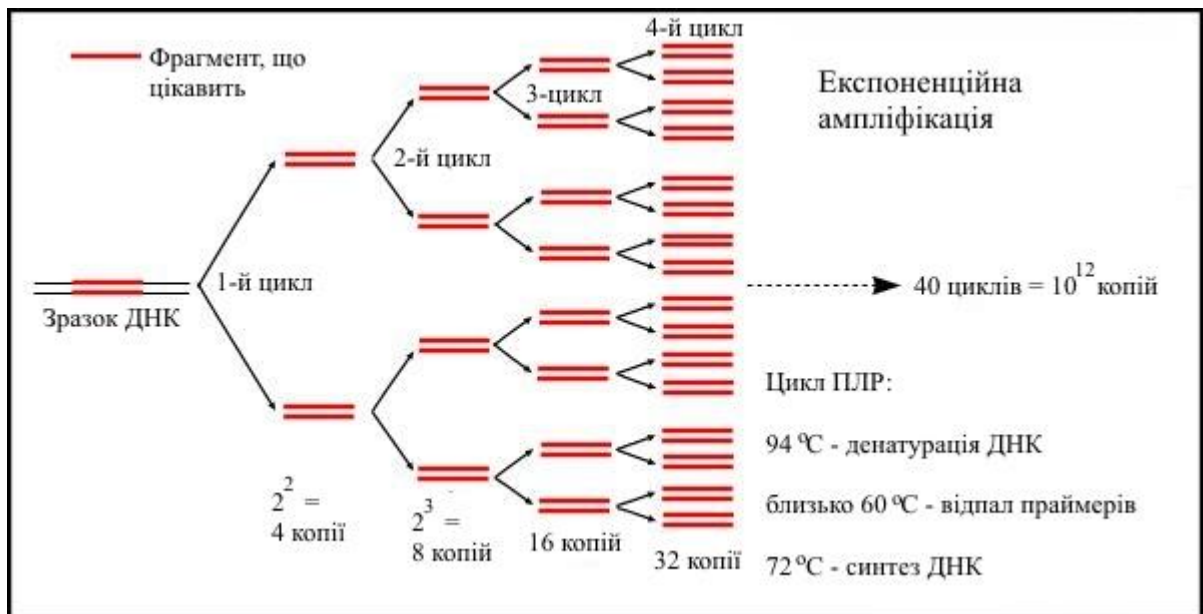


Рис. 8. Принцип експоненційної ампліфікації ДНК у ході ПЛР (адаптовано з <https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>). Пояснення в тексті

Як правило для отримання достатньої для детекції кількості ДНК залежно від вихідної концентрації матриць та ефективності реакції, необхідно від 20 до 50 циклів ПЛР. На сьогодні реакцію проводять у спеціальних термостатах, які програмуються – термоциклерах (ампліфікаторах), у сертифікованих ПЛР-лабораторіях.

Праймери. 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) праймерів, які працюють у парі, у більшості випадків має бути подібною, крім певних випадків;
- 6) T_a (температура відпалу (annealing temperature,)) вибирається в діапазоні 55-70 °С (як правило, $T_a \approx T_m - 5$); тощо.

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 °С. Сумарна концентрація дНТФ, як правило, становить 2 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.

Вплив іонів Mg^{2+} . Іони Mg^{2+} утворюють 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, що можуть зв'язувати магній (наприклад, ЕДТА). Вільні іони магнію помітно підвищують температуру плавлення (гібридизації) дволанцюгової ДНК, тому дуже висока концентрація магнію збільшує ймовірність

неспецифічного відпалу праймерів, інгібування полімерази. Зниження концентрації реагенту викликає зменшення виходу ПЛР-продукту. Оптимальну концентрацію іонів Mg^{2+} необхідно емпірично підбирати для кожної системи праймерів.

Ферменти для ПЛР. Основна вимога до полімерази, яка використовується в ПЛР – це здатність зберігати активність після інкубування при 95 °С. Протягом довгого періоду для проведення ПЛР використовували термостабільні ДНК-полімерази: *Taq*, *Pfu*, *Tth* тощо. На сьогодні використовують суміші різних ферментів, зокрема штучно отримані модифікації природніх ферментів. Найчастіше використовується *Taq*-полімераза була виділена з термостабільної еубактерії *Thermus aquaticus*. 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.

Вплив рН. Оптимальний рН реакційної суміші залежить від типу полімерази і, зазвичай, знаходиться в межах від 8,0 до 9,0 за кімнатної температури. рН буферного розчину на основі триса (скорочена назва хімічної сполуки трис-(гідроксиметил)-амінометана $(HOCH_2)_3CNH_2$) суттєво змінюється при нагріванні, тому працювати фермент буде при відносно нейтральному рН.

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 (формаїд, ДМСО (диметилсульфоксид), спермидин); 2) ті, які впливають на ДНК (білок SSB тощо); 3) ті, які впливають на властивості ДНК-полімерази: стабільність (бетаїн, БСА (альбумін сироватки бика), неіонні детергенти, желатин, гліцерин тощо і кінетику ферментативної реакції (пірофосфатаза).

Існують численні різновиди ПЛР: вкладена ПЛР (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, ПЛР довгих фрагментів (англ. Long-range PCR), Touchdown ПЛР (англ. Touchdown PCR), випадкова ампліфікація поліморфної ДНК (англ. Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) або AP PCR (англ. Arbitrarily primed), кількісна ПЛР (англ. Quantitative PCR, Q-PCR) - кількісна ПЛР у реальному часі, цифрова ПЛР (Digital PCR) тощо.

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

ПЛР широко використовується в наукових 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 не рівноважної 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.

ПЛР у реальному часі

Після проведення класичної ПЛР наявність очікуваного фрагмента ДНК перевіряють за допомогою певних методів, першим і найбільш часто вживаним з яких є метод гель-електрофорезу з візуалізацією бромистим етидієм (рис. 9).

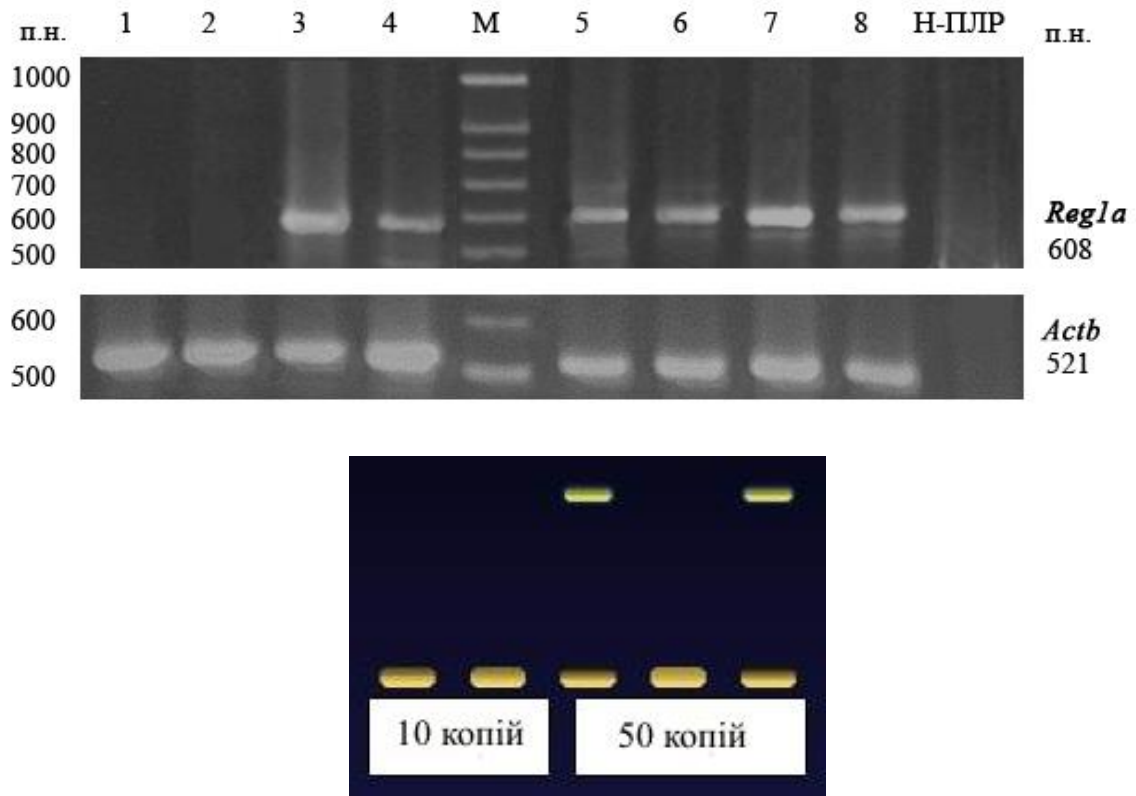


Рис. 9. Рівень експресії мРНК гена *Reg1a* в клітинах епітелію ворсинок і крипт дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпохлоргідрії та при введенні мультипробіотика «Симбітер»:

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 9, 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 поверхні)), тим самим знижуючи потенційну інформативність ПЛР.

ПЛР у реальному часі або кількісна ПЛР (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. 10). 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.

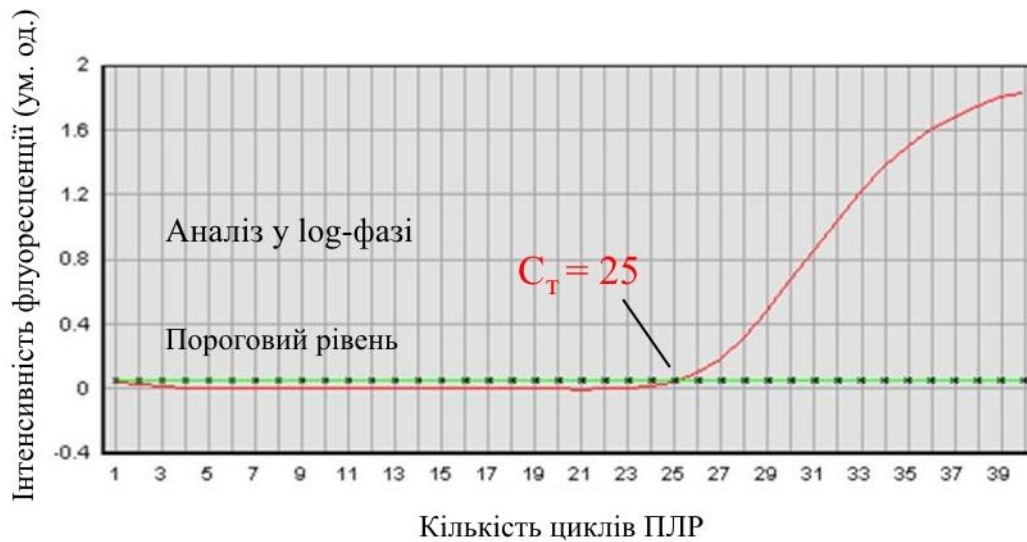


Рис. 10. Приклад графіка накопичення продуктів ампліфікації під час ПЛР у реальному часі. C_T – threshold cycle – точка перетину графіка накопичення ДНК і порогової лінії флуоресцентного сигналу на певному циклі (адаптовано з explorer.bio-rad.com)

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 ПЛР у реальному часі поєднують із ЗТ-ПЛР (одно- чи двостадійна реакція).

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 і 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 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 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.

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. 11).

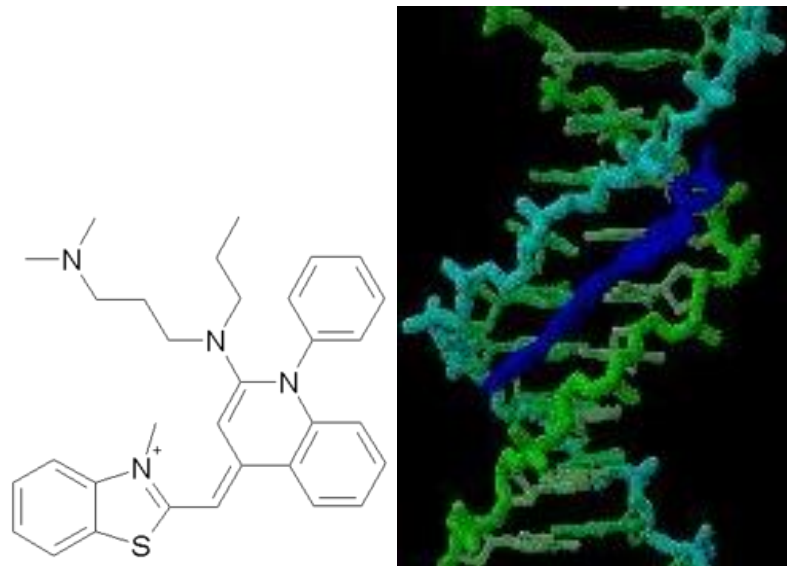


Рис. 11. Схема інтеркаляції SYBR Green I у ДНК (запозичено з explorer.bio-rad.com). Пояснення в тексті

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, 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 строго 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 гібридизаційна проба об'єднані в одну молекулу. 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. 12).

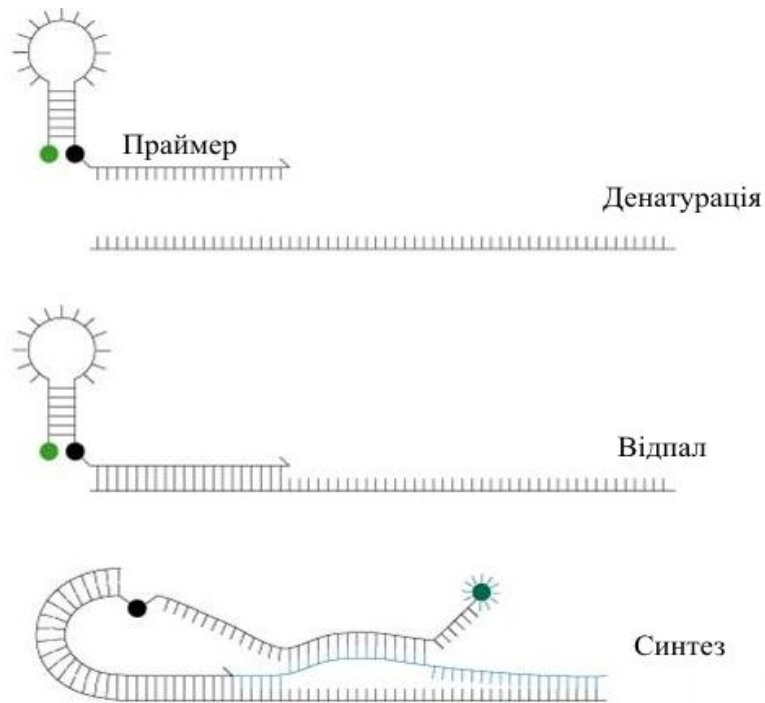


Рис. 12. Схема роботи праймерів «скорпіонів» (адаптовано з explorer.bio-rad.com). Пояснення в тексті

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. 13).

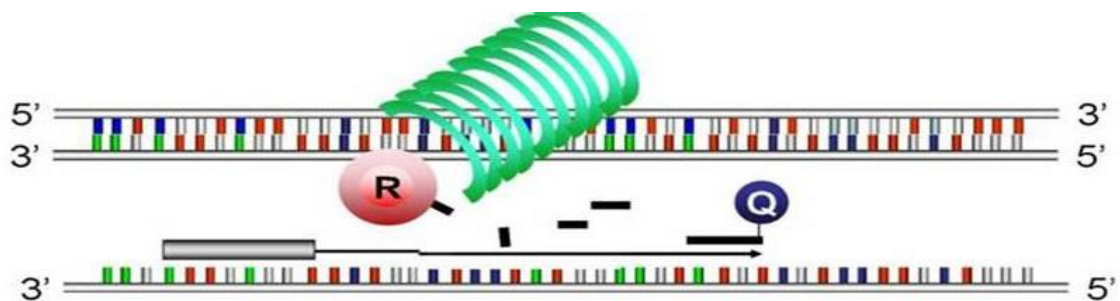


Рис. 13. Схема роботи лінійних проб, що руйнуються, - TaqMan (адаптовано з explorer.bio-rad.com). Умовні позначення: R - флуоресцентна мітка, Q - гасник флуоресценції. Після комплементарного зв'язування проби TaqMan з матрицею з'являється флуоресценція за рахунок 5'→3' екзонуклеазної активності Taq-полімерази

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 гібридується на амплікон, що призводить до її руйнування за рахунок 5'→3' екзонуклеазної активності *Taq*-полімерази [Holland et al., 1991, Livak, 2003]. Інтенсивність сигналу зростає з кожним циклом ПЛР пропорційно накопиченню ампліконів.

«Проби з інвертованим кінцевим повтором («молекулярні маячки», *molecular beacons*). Є варіантом попередньої технології. Проба має короткий (5 – 8 нуклеотидів) інвертований кінцевий повтор. Флуорофор і гасник розташовані по кінцях олігонуклеотида. У розчині проби при температурі нижче 55 – 60 °С 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. 14).

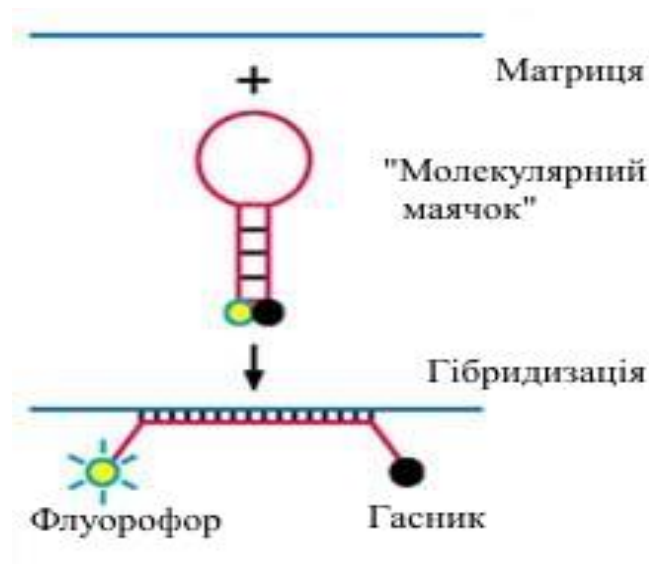


Рис. 14. Схема роботи лінійних «молекулярних маячків», beacon (адаптовано з explorer.bio-rad.com). Умовні позначення: R - флуоресцентна мітка, Q - гасник флуоресценції. Пояснення в тексті

Також до вільних мічених проб належать: **«Проби, що витісняють»**

(displacing probes) [Li et al., 2002]; «Проби, що примикають» [Lay et al., 1997].

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 постракційного 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.

У той же час звичайна ПЛР зберігає свої позиції в дослідженнях, які потребують напрацювання фрагментів ДНК із метою їх подальшого застосування (клонування, сиквенування тощо), дже 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.

Аналіз даних ПЛР у реальному часі

Будь-який із нижче описаних методів аналізу даних, отриманих з ПЛР у реальному часі, обирається до проведення ПЛР – під час планування дослідження,

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 в 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) інтерполює абсолютну кількість ампліфікованого фрагмента гена-мішені в зразках.

Для аналізу результатів ПЛР у реальному часі за цим методом необхідно: 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, які повинні експресуватися на однаковому рівні в усіх дослідних зразках. Ендогенний контроль використовується для нормалізації флуоресцентного сигналу для вимірювання кількості досліджуваного гена. 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].

•**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)** 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, які повинні експресуватися на однаковому рівні в усіх дослідних зразках. Ендогенний контроль використовується для нормалізації флуоресцентного сигналу для вимірювання кількості ампліфікованого фрагмента гена-мішені. Гени домашнього господарства можуть бути використані в якості ендогенного контролю (транскрипти β -актину тощо (див. вище);

- **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.

ДНК-фінгерпринтинг

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 пробою 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 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. 15).

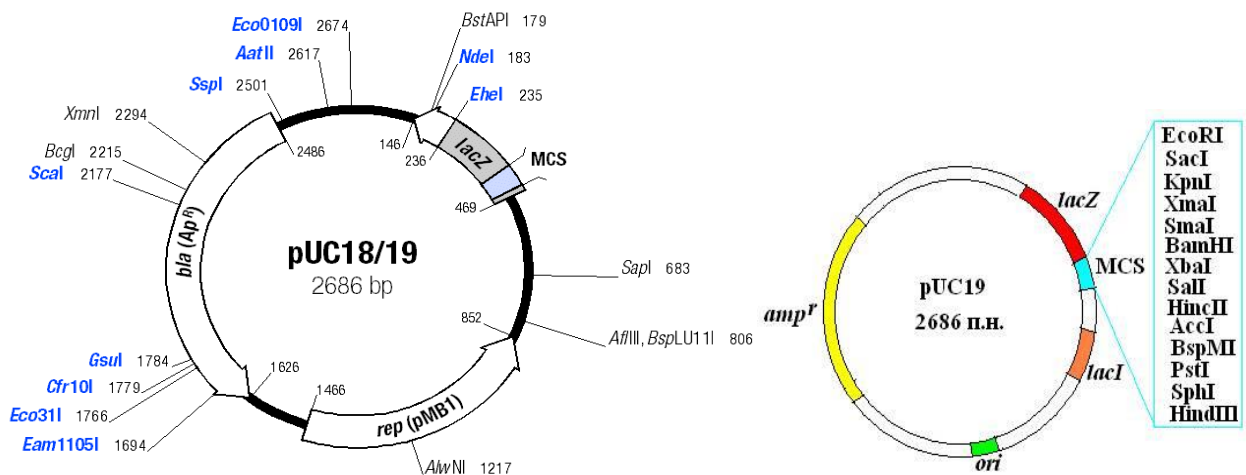


Рис. 15. Плазмідні вектори *pUC18/19* (рисунок запозичено з каталогу продукції «Thermo scientific molecular biology tools product guide» за 2012-2013 pp.; ст. 441). Умовні позначення: *lacZ* - 5'-послідовність гену лактозного оперону, який кодує N-фрагмент β -галактозидази; MCS - від англ. Multiple Cloning 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 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 ППТГ (ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид)), формуються блакитні колонії внаслідок утилізації X-Gal. Це відбувається за рахунок α -комплементу 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 -комплементу пригнічена. Отже, у бактерій з рекомбінантними плазмідами *pUC19* X-Gal не буде розщеплюватись, і будуть продукуватись білі колонії, з яких виділяють рекомбінантні плазміди, 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. 16).

ДНК-фінгерпінтинг 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). 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 поліакриламідному гелі.

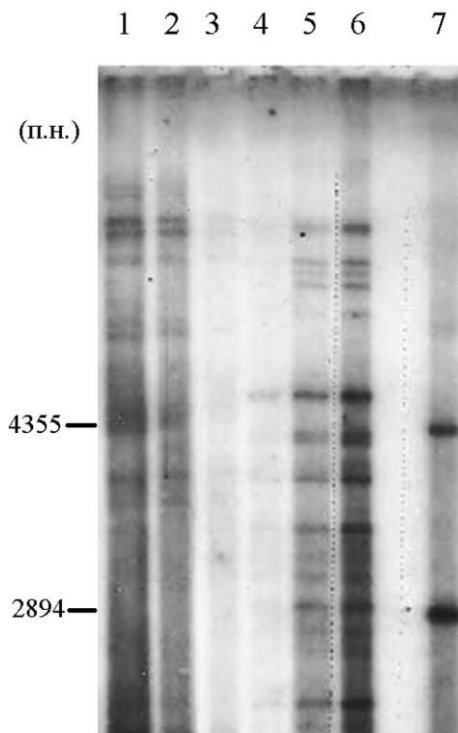


Рис. 16. ДНК-фінгерпринтний аналіз двох видів пінгвінів при встановленні оптимальної концентрації ДНК для батьківського аналізу (фотографія рентгенівської плівки): 1 – 20 мкг вихідної ДНК пінгвіна дженту № 1; 2 – 10 мкг ДНК пінгвіна дженту № 2; 3 – 2 мкг ДНК пінгвіна дженту № 3; 4 – 2 мкг вихідної ДНК 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 *Clal* (200 пг); 8 – молекулярний маркер (п.н.) – ДНК фага *M13mp7*, розщеплена ферментом *Clal* (1 пг)

Сиквенування нуклеїнових кислот

1) Під сиквенуванням ми розуміємо визначення точної послідовності нуклеотидів у ланцюгах ДНК та РНК. На сьогодні виділяють три 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. До другого покоління відносяться більш ефективні методи середини 90-их років, які було розроблено 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, високоефективне сиквенування. 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 високоефективними методами деякі дослідники об'єднують методиками 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 і здешевити обробку геномних даних. Саме через це HTS зараз є основним методом дослідження повних геномів, а крім того грає помітну роль в розробці програм персоналізованої медицини для людей.

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, 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. 2) розділення отриманих фрагментів у гелі з високою роздільною здатністю. Історично використовувались радіоактивні мітки і високощільний ПАА-гель, зараз використовується капілярний електрофорез з автоматичною детекцією флуоресцентних міток.

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 і 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 (SOLiD sequencing). Вважається однією з найперших методик саме високоефективного 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).

4) Піросиквенування (Roche 454 pyrosequencing). Цей метод, як видно з його назви, заснований на реєстрації пірофосфату, який утворюється під час приєднання чергового нуклеотиду до ланцюга в ході полімеразної реакції. Метод реєстрації полягає в каскаді послідовних ферментативних реакцій, які запускаються формуванням фосфодієфірного зв'язку і 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.

5) Метод зворотніх термінуючих нуклеотидів (Illumina (Solexa) sequencing). 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 (RT), на яких синтез зупиняється завдяки блокованим 3'-фосфатам. Детекція відбувається завдяки зчитуванню флуоресцентного сигналу спеціальною фотоматрицею.

б) Напівпровідникове сиквенування (Ion torrent: Proton / PGM sequencing). Засноване на реєстрації йонів водню, виділених в середовище у ході синтезу ДНК полімеразою. Дуже нагадує піросеквенування, але у даному 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 рН середовища.

Серед методів сиквенування нуклеїнових кислот **третього покоління** розрізняють:

1) Сиквенування за допомогою електронного мікроскопа. Ці методики 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.

2) Використання зворотніх термінуючих нуклеотидів на одиничних молекулах нуклеїнових кислот із реєстрацією кожного нуклеотида завдяки мітці, що відщеплюється в ході реакції. Цей метод є аналогічним описаному вище в методиках другого покоління, але без етапу створення клональної бібліотеки.

3) Сиквенування за рахунок переміщення ДНК через нанопори. В основі методу лежить реєстрація змін 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.

4) 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.

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.

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-кодуєчих 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 екзомнам. 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 обсяг одержуваних даних дуже великий.

Протоколи лабораторних занять

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 бідистильована, демінералізована, із комерційних наборів, вільна від ДНК, РНК, РНКаз, ДНКаз, пірогенів); посуд митий у хромовій суміші (суміш концентрованої сірчаної кислоти та біхромату калію ($K_2Cr_2O_7$), пробірки, еппендорфи та «наконечники» для дозаторів (без нуклеаз і пірогенів, із запобіжними фільтрами), маніпуляції проводять у рукавичках без пудри.

Розчини для виділення ДНК:

0,9 % NaCl, буферний розчин для лізису клітин (10 мМ ЕДТА (етилендіамін тетраоцтова кислота); 50 мМ трис – HCl (трис-(гідроксиметил)-амінометан ((НОСН₂)₃СNH₂)), рН 7,6; 100 мМ NaCl), 0,5 М ЕДТА, 10 % ДСН (додецилсульфат натрію), протеїназа К (20 мг/мл), 5 М NaCl, водонасичений нейтральний фенол, ізопропанол, 3 М CH₃COONa, 70 % етанол, 96 % етанол, H_2O dist, маніпуляції проводять у рукавичках.

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. Мікропробірки типу еппендорф на 1,5 і 2 мл (надалі – еппендорф), силікагелеві колонки, автоматичні дозатори (смплери), «наконечники», термостат, центрифуга для 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 отримують кров шляхом декапітації. Свіжу цільну кров обережно перемішують із 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 0,9 % NaCl, ретельно перемішати й осадити клітини крові центрифугуванням на мікроцентрифузі 1 хв при 10000 g при кімнатній температурі. 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» смплера, 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 центрифугі при кімнатній

температурі, 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 і 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 та розчинити в 200 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist. Отримані зразки ДНК (біля 20000 – 10000 п. н.) зберігати при -20°C до наступних маніпуляцій або вродовж року. Визначити вихід (якість і кількість) ДНК – див. пункт **3, 4**.

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 центрифuzі 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 20000 – 10000 п. н.) зберігати при -20°C упродовж року. Визначити вихід ДНК – див. пункт **3, 4**.

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

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 $\text{CH}_5\text{N}_3^*\text{HCl}$ (гуанидин 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 піпетування. Перенести суміш у

колонку, центрифугувати на центрифuzі 1 хв при 6000 g, при кімнатній температурі. Зняти колонку з пробірки-еппндорф (в ній лишається розчин, який пройшов крізь колонку) і помістити в новий еппндорф 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 еппндорф. 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 еппндорф 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 еппндорфа. Використовувати виділену ДНК для подальших маніпуляцій або зберігати при $-20\text{ }^\circ\text{C}$ упродовж року. Визначити вихід ДНК – див. пункт 3, 4.

Контрольні запитання:

- 1) Які компоненти входять до складу розчину для лізису клітин і які їх функції?
- 2) Який із використаних методів виділення ДНК є більш швидким та таким, що не вимагає використання токсичних речовин?
- 3) Назвіть відмінності рідкофазних і твердофазних методів виділення нуклеїнових кислот.

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 бідистильована, демінералізована, із комерційних наборів, вільна від ДНК, РНК, РНКаз, ДНКаз, пірогенів); посуд митий у хромовій суміші (суміш концентрованої сірчаної кислоти та біхромату калію ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), пробірки, еппндорфи та «наконечники» (без нуклеаз і пірогенів, із запобіжними фільтрами), маніпуляції проводять у рукавичках без пудри.

Розчини для виділення РНК:

Розчин Д (4 М $\text{NH}_2\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2 \cdot \text{HSCN}$ (гуанидинізотіоціанат), 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.

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. Еппендорфи, селикагелеві колонки, автоматичні дозатори (самплери), «наконечники», центрифуга для еппендорфів, центрифуга для еппендорфів з охолодженням.

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 центрифугузі при 10000 g і 4 °С 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Центрифугувати на центрифугузі при 10000 g і $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (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 самплера та неповністю висушити осад, залишивши еппендорфи відкритими на декілька хвилин. Отриману тотальну РНК розчинити в 100 мкл автоклавованої охолодженої $\text{H}_2\text{O dist}$, додати 2,5 об'єми 96 % етанолу та зберігати при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до наступних маніпуляцій чи впродовж року. Визначити вихід РНК – див. пункт 3, 4.

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

Виділення РНК із крові. Виділення високо якісної РНК ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ між 1,7 та 1,9, номер цілісності РНК (RIN) ≤ 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 центрифугузі 400 g і $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ упродовж 5 хв. Злити супернатант. Ресуспендувати осад в 600 мкл буферного розчину для лізису клітин (містить гуанидинізоціанат), перемішати пробу на центрифугузі-вортексу. Додати 200 мкл 96 % етанолу, ретельно перемішати, як зазначено на попередньому етапі. Перенести половину отриманого лізату в колонку на еппендорфі, центрифугувати на центрифугузі 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

$\text{CH}_5\text{N}_3^*\text{HCl}$ (гуанидин гідрохлорид), 96 % етанол), центрифугувати на центрифугузі 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 центрифугузі 1 хв при 12000 g, знову 500 мкл буферного розчину для промивання II, центрифугувати на центрифугузі 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 центрифугузі 1 хв при 12000 g. Зняти колонку з еппендорфа. Використовувати виділену РНК для подальших маніпуляцій (тримати РНК на льоду) або зберігати при -20 – -70 °С залежно від строків використання (від року до 3 років). Визначити вихід РНК – див. пункт 3, 4.

Контрольні запитання:

- 1) Які основні вимоги та особливості роботи з РНК, зокрема під час її виділення?
- 2) Який із використаних методів краще застосовувати при виділенні РНК з певного біологічного матеріалу? Наведіть приклади.
- 3) Назвіть методи виділення нуклеїнових кислот, які можуть бути автоматизовані в лабораторії.

3. 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 розплавленої агарози, мікрохвильова піч, гребінки, автоматичні дозатори (сAMPLери), «наконечники», транслюмінатор, цифровий фотоапарат, рукавички без пудри.

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 4).

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 розчин агарози в підготовану форму для формування геля, уникаючи утворення пухирців біля лунок. Після того, як гель остаточно затвердіє (приблизно 20 хв за кімнатної температури), обережно видалити гребінку й помістити гель на платформі приладу для електрофорезу. Додати 350 мл буферного розчину для проведення гель-електрофорезу – TBE. Шар буферного розчину повинен покривати агарозний гель щонайменше 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 CH_3COONa до 0,15 М (див. пункт 1, 1), а)).

Змішати 1 мкл молекулярного маркера (п.н.) разом із 9 мкл робочого TBE буферного розчину та 1,5 мкл 6-ти кратного буферного розчину для нанесення проб. Внести приготувану 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 клонованими теломерними повторами (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 внеси 5 мкл проб виділених ДНК і РНК з іншими вищезазначеними компонентами у відповідній кількості.

Закрити прилад для електрофорезу покриттям та підключити до джерела струму. Встановити відповідні показники сили струму та напруги (показник напруження - 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 (ксилолціанолу та бромфенолового синього) у гелі.

Пофарбувати гель водним розчином бромистого етидію (10 мкг/мл) – 15 хв, промити проточною водою. Можна знизити фонову флуоресценцію (обумовлену незв'язаним барвником) шляхом витримування 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 і 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 і звернутися до викладача за подальшими вказівками.

Помістити гель на ультрафіолетову лампу (трансілюмінатор) із довжиною хвилі 254 нм та сфотографувати в УФ – світлі цифровим фотоапаратом.

Увага! Техніка безпеки: фотографування гелів і візуальний контроль розділення НК за допомогою трансілюмінатора здійснюють у спеціальних окулярах або за допомогою захисного 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.

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 нуклеїнових кислот і буферних розчинів для проведення горизонтального електрофорезу.
- 3) Як можна візуалізувати нуклеїнову кислоту в агарозному гелі після гель-електрофорезу?
- 4) Назвіть види електрофорезу нуклеїнових кислот та білків.
- 5) Протягом попередніх двох лабораторних робіт Ви виділяли нуклеїнові кислоти за допомогою різних методів. Охарактеризуйте кількість та якість отриманих ДНК і РНК, візуалізованих після гель-електрофорезу в агарозі.

4. Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК і РНК

Мета роботи. Визначити спектрофотометрично концентрацію нуклеїнових кислот.

Матеріали та реактиви.

Виділені препарати нуклеїнових кислот, H₂O dist.

Обладнання. Спектрофотометр, кювети, автоматичні дозатори (самплери), «наконечники», рукавички без пудри.

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.

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). 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.).

Зробити висновок про кількість та якість виділеної ДНК і РНК.

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 нуклеїнової кислоти в пробі на основі поглинання?
- 4) Навіщо вимірюють відношення значень поглинання **OD₂₆₀/OD₂₈₀** і **OD₂₆₀/OD₂₃₀**?
- 5) Протягом перших двох лабораторних робіт Ви виділяли нуклеїнові кислоти за допомогою різних методів. Порівняйте кількість отриманих ДНК і РНК, визначену після гель-електорофорезу в агарозі, з отриманими спектрофотометрично значеннями.

5. 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, рН 7,4; 150 мМ NaCl);
- буферний розчин для відмивання TBST (0,05 % твин 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, рН 7,4;

- хромогенний пероксидазний субстрат (0,1 М трис – HCl, рН 7,4, DAB (даімінобензидин), 30 % H₂O₂); H₂O dist.

Обладнання. Нітроцелюлозна мембрана, камера для дот блот аналізу, «наконечники», шейкер, рукавички без пудри.

Сироватка щура, БСА.

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; і 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» смплера. 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 °С 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, рН 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, рН 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!

На основі забарвлення певних точок на мембрані зробити висновок щодо наявності певного білка в досліджуваному біологічному матеріалі.

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?

5. 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. Центрифуга для еппендорфів, детектуючий ампліфікатор (термоциклер), комп'ютер із входом до мережі інтернет, автоматичні дозатори (сAMPLери), «наконечники», рукавички без пудри.

Хід роботи.

Перед кількісним аналізом експресії мРНК певного гена за допомогою ПЛР у реальному часі необхідно підібрати праймери, що 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. 17).

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:ENSRNOG000000002525
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> 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. 17. 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. 18).

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									
	<table border="1"> <tr> <td>cd09816</td> <td>prostaglandin_endoperoxide_synthase; Animal prostaglandin endoperoxide synthase and related bacterial proteins</td> </tr> <tr> <td>Location:75 → 562</td> <td></td> </tr> <tr> <td>pfam00008</td> <td>EGF; EGF-like domain</td> </tr> <tr> <td>Location:21 → 53</td> <td></td> </tr> </table>	cd09816	prostaglandin_endoperoxide_synthase; Animal prostaglandin endoperoxide synthase and related bacterial proteins	Location:75 → 562		pfam00008	EGF; EGF-like domain	Location:21 → 53	
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... [r](#)

Рис. 18. 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. 19).

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 ge
Type of supplemented simple s
merel [Am J Physiol Heart Circ
Chronic intermittent hypoxia aff
nitric oxide synthase [Mol Cell Biochem

Рис. 19. Вікно з інформацією про послідовність мРНК гена *Ptgs2* щура на сайті NCBI. Пояснення в тексті

У вікні, яке відкриється (рис. 20), обрати чи вписати відповідні критерії підбору праймерів.

Рис. 20. 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) 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;
- 7) T_a (температура відпалу (annealing temperature,)) вибирається в діапазоні 55-70 °C (як правило, $T_a \approx T_m - 5$); тощо;

8) уникати появи вторинної структури в ампліконі;

9) 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);

10) 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;

11) 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; тощо;

12) 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. 21).

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGCTGTTCCAACCCATGTCA	Plus	20	81	80	59.82	50.00	0.00	0.00
Reverse primer	TGTCAGAACTCAGCGTAGT	Minus	21	183	183	59.04	47.82	0.00	0.00
Product length	123								
Exon junction	189/170 (reverse primer) on template NM_017232.3								

Products on intended target

>[NM_017232.3](#) Rattus norvegicus prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2), mRNA
product length = 123
Forward primer: 1 TGCTGTTCCAACCCATGTCA 20
Template 61 80
Reverse primer: 1 TGTCAGAACTCAGCGTAGT 21
Template 183 163

Рис. 21. 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. 21), їх синтезують у певній фірмі-виробнику і використовують для визначення експресії гена *Ptgs2* за допомогою ПЛР у реальному часі.

Двостадійна 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 °С), 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 (pH 8,3 при 25 °C), 250 мМ KCl, 25 мМ MgCl₂, 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 H₂O dist, 12,5 мкл (2X) суміші, яка містить буферний розчин для ПЛР як із KCl (100 мМ трис-HCl, pH 8,8 при 25 °C, 500 мМ KCl, 0,8 % нонідет Р40), так і з (NH₄)₂SO₄ (750 мМ трис-HCl, pH 8,8, 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1 % твін 20), 1 од. *Taq* ДНК полімерази, по 200 мМ кожного дНТФ, до 2,5 мМ MgCl₂, 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 (специфічні з'єднані одна з одною мікропробірки з оптично прозорими плоскими кришками для ЗТ-ПЛР). 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 H₂O 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 °C – 30 хв; ініціююча денатурація 95 °C –

15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95 °С – 15 с; гібридизація праймерів 50 °С – 35 с; добування ланцюга 72 °С – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72 °С – 5 хв на ампліфікаторі.

Одностадійна 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 розморозувати 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 нМ); 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 °С – 35 с; добування ланцюга 72 °С – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72 °С – 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 3).

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. 22).

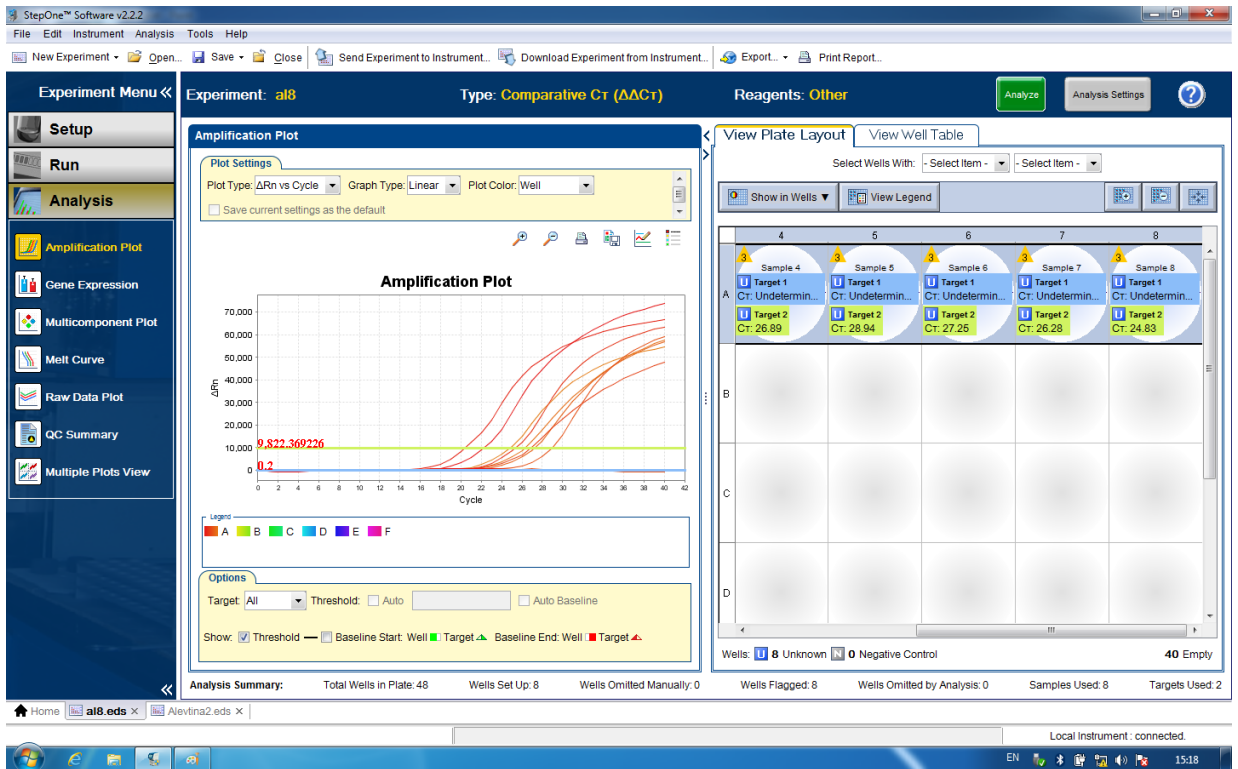


Рис. 22. Програмне вікно з певними результатами ПЛР у реальному часі (прилад «StepOne™»). Пояснення в тексті

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. 23).

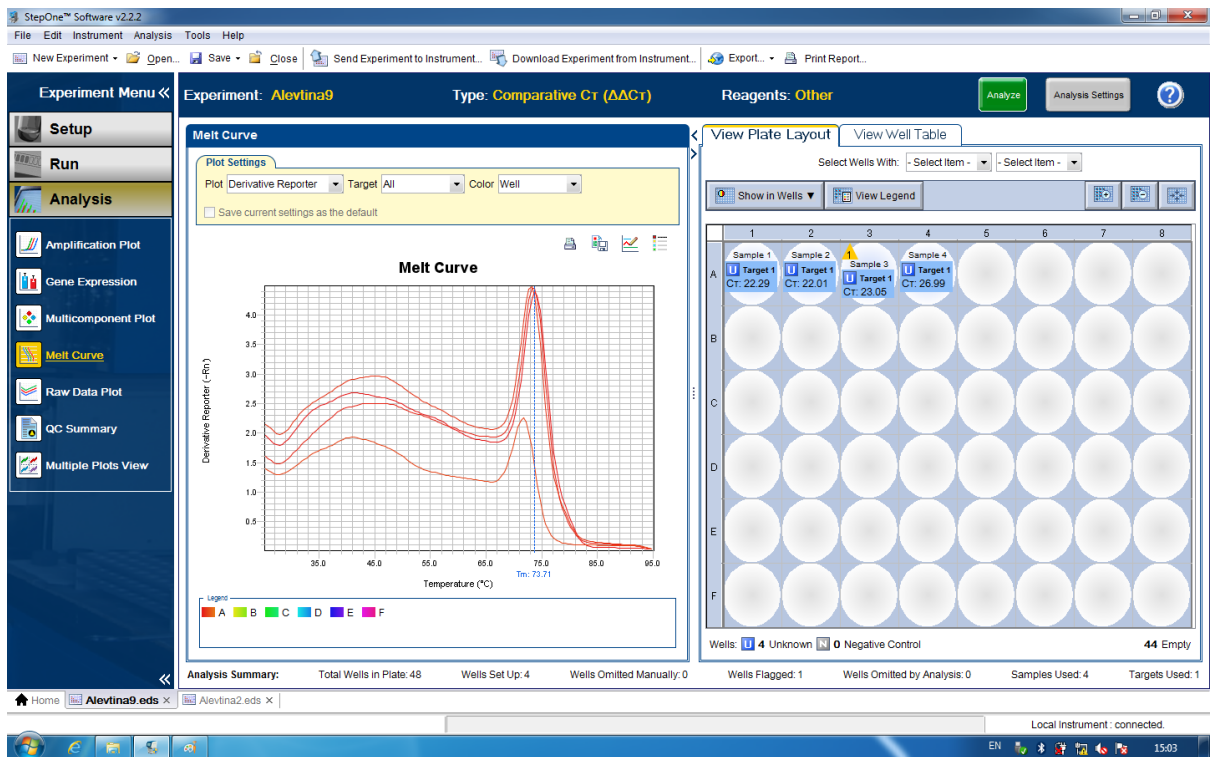


Рис. 23. Програмне вікно з кривими плавлення після ПЛР у реальному часі (прилад «StepOne™»). Пояснення в тексті

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 «GraphPad Prism 5» («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 St між досліджуваним геном – мішенню (наприклад, *Ptgs2*) і геном внутрішнього контролю реакції (наприклад, *Actb*) - ΔC_T [Livak and Schmittgen, 2001] (рис. 24).

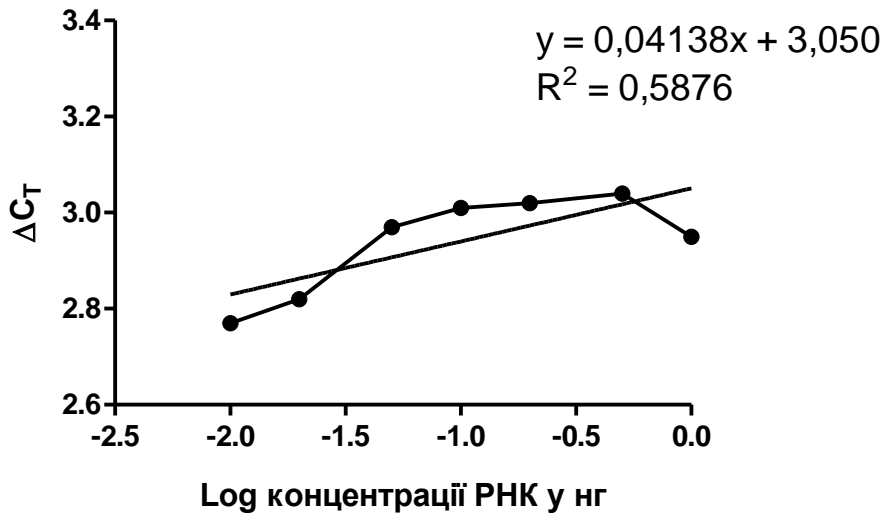


Рис. 24. Залежність різниці порогових циклів між геном – мішенню та геном внутрішнього контролю реакції від вихідної концентрації РНК у реакції

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) Обраховати 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 з 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-Вілка з використанням програмного пакету «GraphPad Prism 5.04». 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 з 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 25.

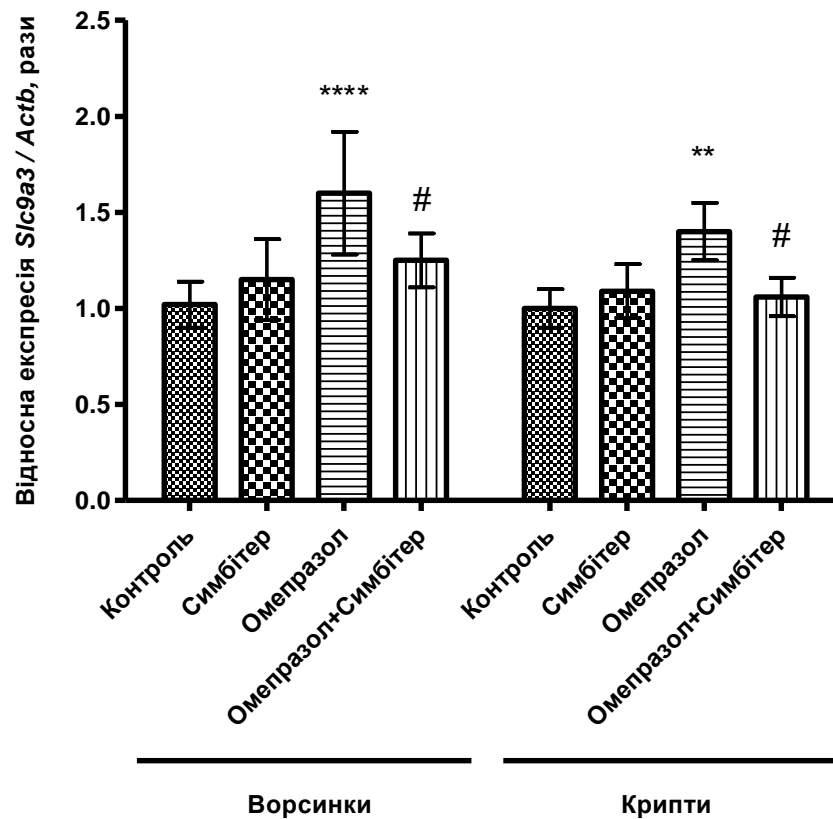


Рис. 25. Рівень експресії мРНК гена *Slc9a3* в різних типах епітеліальних клітин дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика Симбітер. **** - $p \leq 0,0001$, ** - $p \leq 0,01$ відносно контролю; # - $p \leq 0,05$ відносно тварин, яким вводили лише омепразол.

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

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.

Контрольні запитання:

- 1) Поясніть принцип ПЛР.
- 2) Перелічіть алгоритми підбору праймерів для ПЛР.
- 3) Вкажіть різновиди ПЛР та її переваги як методу діагностики інфекційних захворювань.

- 4) На яких засадах базується ПЛР у реальному часі з використанням специфічних систем детекції (TaqMan, molecular beacons тощо)?
- 5) На яких засадах базується ПЛР у реальному часі з використанням неспецифічних систем детекції (SYBR Green)?
- 6) Охарактеризуйте відмінності порівняльного $\Delta\Delta C_T$ метода від методу стандартних кривих при кількісному аналізі даних ПЛР у реальному часі.
- 7) Навіщо визначати ефективність ПЛР у реальному часі при роботі із SYBR Green?

6. Рестрикційний аналіз геномної та векторної ДНК для ДНК фінгерпринтингу

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

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

Обладнання. Центрифуга для еппендорфів, автоматичні дозатори (самплери), «наконечники», рукавички без пудри.

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 (pH 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 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, 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 годин при 37 °C. Реакцію частково зупинити прогріванням при 80 °C упродовж 10 хв. Переосадити отримані рестрикти в 300 мкл 96 % етанолу з 8 мкл 3 М CH_3COONa , центрифугувати 7 хв при 10000 g, при кімнатній температурі, обережно відібрати супернатант, без промивання висушити та розчинити в 25 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist. Отримані фрагменти ДНК зберігати при $-20^{\circ}C$ 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 2 В/см (див. пункт 3). Такі умови забезпечували розділення смуг у діапазоні 2-25 т.п.н.

Рестрикція плазмід. Перед рестрикцією плазмиду (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°C), помістити їх на лід, розморозити й обережно перемішати. Внести 17 мкл автоклавованої охолодженої $\text{H}_2\text{O dist}$, 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 *Hinc II*, 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 години 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 ТВЕ буферному розчині, 1 год при 5 В/см (див. пункт 3).

Контрольні запитання:

- 1) В яких галузях застосовують аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів ДНК?
- 2) Що таке ДНК-фінгерпринтинг? Поясніть принцип методу геномної дактилоскопії.
- 3) Наведіть приклади ендонуклеаз рестрикції.
- 4) Коротко охарактеризуйте принципи гібридизації за Саузерном, Нозерном, Вестерном.
- 5) Навіщо використовують мікросателітний аналіз у детекції хромосомних делецій?
- 6) Опишіть ідентифікаційний аналіз при проведенні експертизи спірного батьківства.

7. 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 відрізнитися 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») 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. 26):

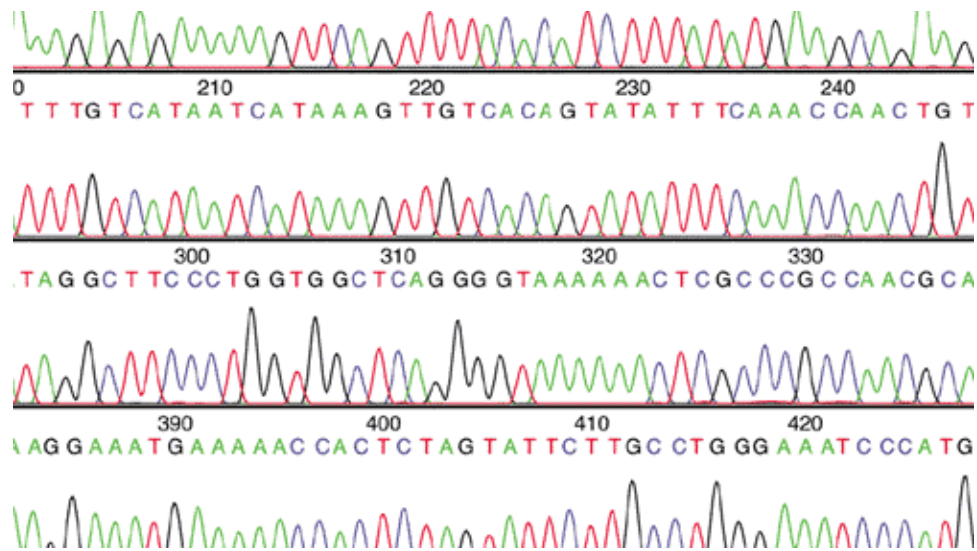


Рис. 26. Фрагмент послідовності, сиквенованої за Сенгером (запозичено з <http://www.sigmaaldrich.com>). Пояснення в тексті

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, де можна порівняти сиквеновану послідовність із ДНК, РНК чи усіма послідовностями досліджуваного об'єкта (рис. 19 – у меню – «**Analyze this sequence**» натиснути мишкою на - «**Run Blast**»; рис. 27).

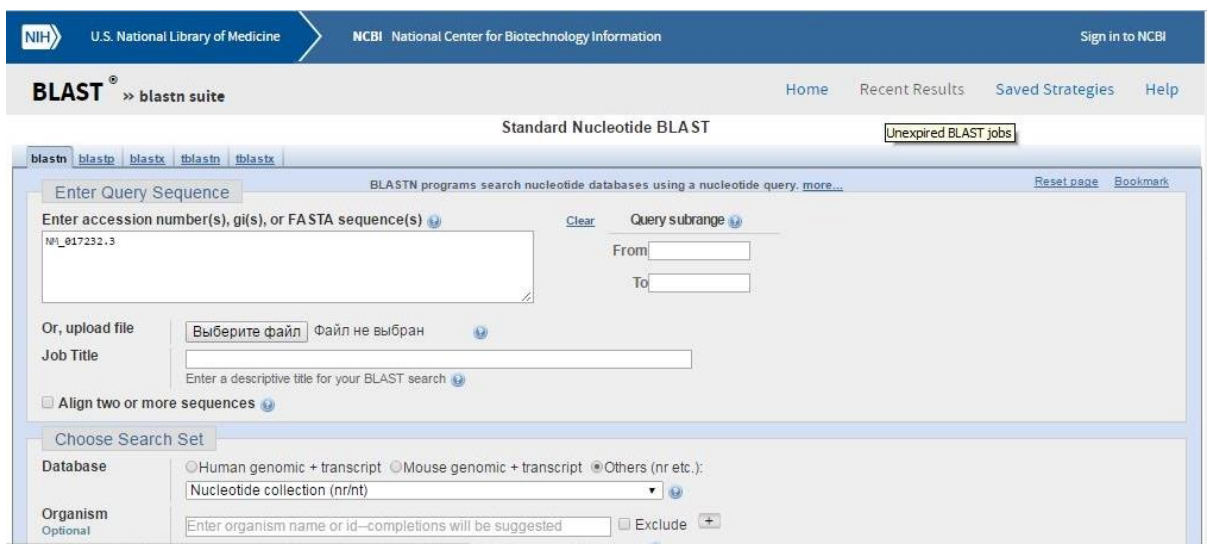


Рис. 27. Вікно з програмою «BLAST» на сайті NCBI. Пояснення в тексті

Порівнювати сиквеновані послідовності (послідовність із мутацією та референсна (без мутації)) можна в різних програмах: «BioEdit» (перед цим на сайті NCBI перевести сиквеновату послідовність нуклеотидів у формат «FASTA»), «CLC», «MEGA» тощо (рис. 28).

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)	<p>BioEdit's features include:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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
Bug fixes / changes	
BioEdit General information	
BioDoc.pdf (pdf format help doc)	
View Screenshots	

Рис. 28. Інформація про програму «BioEdit». Запозичено з <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. Пояснення в тексті

Знайти відмінності в послідовностях, якщо вони є. Далі, якщо мутація має якийсь фенотипові, метаболічні чи ще якийсь 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 і 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.

Контрольні запитання

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

Список використаної і 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. Каталог фірми «Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments» за 2010. – 585 с.
4. Каталог фірми «Thermo scientific molecular biology tools product guide» за 2012-2013. – 320 с.
5. Льюин Б. Гены. / Б. Льюин. – М. : Мир, 1987. – 544 с.
6. 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.
7. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / за ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М. : Мир, 1999. – 205 с.
8. 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.
9. NGS: высокопроизводительное секвенирование / за ред. Д. Ребриков, Д. Коростин, Е. Шубина, В. Ильинский. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2015. – 232 с.
10. ПЦР «в реальном времени» / за ред. Д. В. Ребриков, Г. А. Саматов, Д. Ю. Трофимов. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 202 с.
11. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии. / В.Н. Рыбчин. – Санкт-Петербург: СПбГТУ, 2002. – 522 с.
12. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія : навч. посіб. / А. В. Сиволоб. - К. : ВПЦ "Київський університет", 2008. – 384 с.

13. Buckingham L. Molecular diagnostics: fundamentals, methods and clinical applications. / L. Buckingham, M. Flaws. – F.A. Davis Company, Philadelphia, 2007 – 479 p.
14. 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.
15. Debnath M. Molecular diagnostics: promises and possibilities. / M. Debnath, G. B. K. S. Prasad, P.S. Bisen. – Springer, 2010. – 520 p.
16. Genetic diversity in populations of Gentoos penguins (*Pygoscelis papua*) / A.S. Dranitsina [et al]. // *Цитология и генетика* – 2006. – Т.40, №2 – P. 57 – 62.
17. Heather J. M. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA / J. M. Heather, B. Chain // *Genomics.* – 2016. – 107 – P. 1 – 8.
18. Jeffreys A. J. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA / A.J. Jeffreys, V. Wilson, S. L. Thein // *Nature.* - 1985. – 314, № 6006 – P. 67 – 73.
19. Laboratory biosafety manual – Third edition, World Health Organization. – Geneva, 2004. – 170 p.
20. 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.
21. Molecular cell biology / H. Lodish [et al.]. – Seventh edition. – New York: W. H. Freeman, 2012. – 973 p.
22. Molecular Biology of the Cell / B. Alberts [et al.]. – Sixth edition. – Garland Science, 2014. – 1464 p.
23. molbiol [Електронний ресурс]: російська версія / Режим доступу: <http://www.molbiol.ru> (дата звернення: 10.01.2017).
24. Patrinos G. Molecular diagnostics / Patrinos G., Ansorge W. – First Edition. – Elsevier, 2005. – 616 p.
25. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis. – Second edition. – Cold Spring Harbor Laboratory Pr.,

1987. – 1659 p.

- 26.** Weinberg R. A. The biology of cancer / R. A. Weinberg. – Second edition. – Garland Science, 2007. – 960 p.