

Министерство образования Республики Беларусь
УО «Полесский государственный университет»

Д.А. КАСПИРОВИЧ, Н.А. ГЛИНСКАЯ, Е.М. ВОЛКОВА

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ПРОЦЕССОВ:
МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОМОВ**

Методическое пособие

Пинск
ПолесГУ
2015

УДК 631.523(075)
ББК 28я73
К28

Р е ц е н з е н т ы:

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент В.А. Дойлидов;
кандидат биологических наук Н.Н. Безручёнок

У т в е р ж д е н о

научно-методическим советом ПолесГУ

Каспирович, Д.А.

К28 Молекулярные механизмы генетических процессов: методы изучения геномов : методическое пособие / Д.А. Каспирович, Н.А. Глинская, Е.М. Волкова. – Пинск : ПолесГУ, 2015. – 52 с.

ISBN 978-985-516-413-6

В методическом пособии изложены указания по проведению лабораторных занятий по курсу «Молекулярные механизмы генетических процессов».

Издание адресуется студентам биотехнологического факультета, обучающимся по специальности 1-31 01 01 «Биология».

УДК 631.523(075)
ББК 28я73

ISBN 978-985-516-413-6

© УО «Полесский государственный университет», 2015

ПРЕДИСЛОВИЕ

Курс «Молекулярные механизмы генетических процессов» связан со многими биологическими дисциплинами – физиологией, биохимией, микробиологией, молекулярной биологией, биотехнологией и др. Изучение этого предмета позволит получить фундаментальные знания в области классической и современной биотехнологии и применять их в дальнейшей практической деятельности.

Согласно разработанной программе курса для организации самостоятельной работы обучающихся следует использовать современные информационные технологии, а также комплекс учебных и учебно-методических материалов, в том числе методические указания к лабораторным занятиям, список рекомендуемой литературы. Лабораторные занятия предусматривают проведение знакомства с методиками и современным оборудованием, которое используется в генетических исследованиях, а также приобретение навыков работы по проведению геномного анализа.

Поэтому задачами предлагаемого пособия являются: углубление знаний особенностей генетических процессов на молекулярном уровне; основных молекулярно-биологических методов (выделение ДНК, полимеразная цепная реакция, рестрикционный анализ).

Представленное методическое пособие по дисциплине «Молекулярные механизмы генетических процессов» рекомендуется для использования при проведении лабораторных занятий по разделу «Методы изучения геномов» студентам четвертого курса дневного отделения по специальности 1-31 01 01 «Биология» и освоении следующих тем:

1. Устройство ПЦР-лаборатории.
2. Механизм полимеразной цепной реакции.
3. Стадии постановки полимеразной цепной реакции.

ТЕМА 1. УСТРОЙСТВО ПЦР-ЛАБОРАТОРИИ

Занятие 1. Организация работы ПЦР-диагностической лаборатории. Перечень необходимого оборудования

Благодаря высокой специфичности и чувствительности метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) находит широкое применение в медицине (диагностика инфекций, диагностика иммунных патологий, генетические исследования наследственных заболеваний), ветеринарии, животноводстве и растениеводстве (инфекционные заболевания, определение видовой принадлежности), науке (генная инженерия, микробиология, генетика и др.), промышленности (определение биологического загрязнения), судебной медицине (идентификация личности).

Однако ПЦР-анализ связан с проблемой, обусловленной высокой чувствительностью метода, – возможностью контаминации.

Контаминация – попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических и неспецифических молекул нуклеиновых кислот, способных служить мишенями в реакции амплификации и давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

Сотрудник, занимающийся ПЦР-диагностикой, в своей работе сталкивается с тремя видами контаминации:

1. Перекрестная контаминация от пробы к пробе (в процессе обработки биоматериала или при раскапывании реакционной смеси), приводящая к появлению спорадических ложноположительных результатов.

2. Контаминация продуктами амплификации (ампликонами), имеющая наибольшее значение, поскольку в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и являются идеальными продуктами для реамплификации.

3. Контаминация следовыми количествами ампликонов посуды, автоматических пипеток и лабораторного оборудования, поверхностей лабораторных столов или даже поверх-

ности кожи сотрудников лаборатории приводит к появлению систематических ложноположительных результатов.

Как правило, определить источник контаминации бывает очень трудно и требует значительных затрат времени и средств.

Накопленный к настоящему времени опыт работы лаборатории, использующей полимеразную цепную реакцию для проведения ПЦР-ПДРФ-анализа, позволяет сформулировать основные требования: 1) к планировке помещений и организации работы ПЦР-лаборатории; 2) к выделению основных зон.

Планировка помещений и основные принципы организации работы ПЦР-диагностической лаборатории

1. Лаборатория разделяется на зоны (комнаты) для каждой из стадий ПЦР-диагностики:

– пре-ПЦР-помещение, где обрабатываются образцы, выделяется ДНК, готовится реакционная смесь для ПЦР для последующей постановки ПЦР (при наличии условий два последних этапа проводятся в дополнительном отдельном помещении); в этих помещениях запрещается проводить все другие виды диагностических работ, ПЦР-диагностика которых проводится в данной лаборатории;

– пост-ПЦР-помещение, где проводится детекция продуктов амплификации; в пост-ПЦР-помещении допускается использовать другие методы детекции мутаций, диагностика которых проводится в данной лаборатории.

2. Комната детекции продуктов амплификации (пост-ПЦР-помещение) располагается как можно дальше от пре-ПЦР-помещений.

3. Исключается движение воздушного потока из пост-ПЦР в пре-ПЦР-помещения.

4. В комнате приготовления реакционной смеси и в комнате обработки образцов устанавливаются настольные боксы с ультрафиолетовыми лампами.

5. Работа в лаборатории организовывается в одном направлении: от пре-ПЦР-помещений к пост-ПЦР-помещению.

6. Каждое помещение ПЦР-диагностической лаборатории должно иметь свой набор реагентов, автоматических дозаторов, наконечников, пластиковой и стеклянной посуды, лабораторного оборудования, халатов и перчаток, используемых только в данной зоне и не выносящихся в другие ПЦР-помещения. Оборудование, материалы и инвентарь в каждой комнате должны иметь соответствующую маркировку.

7. Обработка рабочей одежды из пре- и пост-ПЦР-помещений должна производиться отдельно.

8. Перчатки используются однократно как в комнате обработки биопроб, так и в комнате приготовления реакционной смеси и постановки ПЦР.

10. Используются наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером (или наконечники с ватными фильтрами, приготовленными в помещении, в котором не ведутся работы с ДНК) при работе с образцами, а также при внесении выделенной ДНК в реакционную пробирку.

11. Постоянно поддерживается чистота на рабочем месте:

– каждое помещение должно иметь свой отдельный набор инвентаря для обработки, уборки рабочего места (ватно-марлевые тампоны, пинцет, 70 % этанол, дезинфицирующий раствор и т.д.) и источники ультрафиолетового излучения, которые эффективно инактивируют ДНК-матрицы;

– при манипуляциях с биологическим материалом рабочая поверхность до и после исследования обрабатывается дезинфицирующим раствором и затем 70 % этанолом;

– в комнате приготовления реакционной смеси до работы обрабатывается рабочая поверхность 70 % этанолом с целью борьбы с пылью.

12. Полностью исключается проведение в ПЦР-диагностической лаборатории работ, связанных с получением (клонированием) и выделением рекомбинантных плазмид, со-

державших последовательности ДНК или фрагментов генов-возбудителей.

13. Персонал, работающий в ПЦР-диагностической лаборатории, должен пройти соответствующее обучение.

Основные требования, предъявляемые к организации работ в зоне выделения ДНК

1. Забор образцов производится только в одноразовые пластиковые пробирки или в стеклянные пробирки, тщательно промытые дистиллированной водой и прокаленные.

2. Используются только одноразовые перчатки и наконечники для автоматических дозаторов.

3. Обязательно меняются наконечники при переходе от одной пробы к другой.

4. Использованные пробирки и наконечники сбрасываются в одноразовые контейнеры или в специальные емкости с дезинфицирующим раствором.

5. Не рекомендуется концентрировать в рабочей зоне большие количества образцов ДНК.

6. Растворы, которые могут быть подвергнуты автоклавированию, стерилизуются в автоклаве: ЭДТА, Трис, NaCl, SDS. Если растворы были загрязнены ДНК, в условиях стерилизации она распадается на фрагменты очень низкого молекулярного веса, что делает ее неамплифицируемой.

7. Реагенты хранятся ресуспензированными на небольшие порции. Отмечается порция, которую использовали при работе с каждой серией образцов, с тем, чтобы легче обнаруживался источник загрязнения в случае, если оно произошло.

8. Избегаются разбрызгивания. Некоторые типы пробирок имеют крышки, открывающиеся с трудом, что может вызвать разбрызгивание при открывании. Перед открыванием жидкость со стенок пробирки встряхивается на вортексе.

9. В исследование каждой серии проб ДНК включается так называемая «пустая» проба для контроля наличия загрязнений реагентов ДНК.

10. Используются лабораторные халаты, предназначенные для работы с неамплифицированными образцами.

Основные требования, предъявляемые к организации работ в зоне постановки ПЦР

1. Используются одноразовые перчатки и чистые халаты, которые предназначены для работы в данной зоне.
2. Реагенты для ПЦР хранятся в контейнере, который предотвращает экзогенное загрязнение. Если реагенты хранятся в холодильнике, который находится в зоне для выделения ДНК, то для них отводится специальная полка.
3. Весь используемый в работе инструментарий предназначается только для работы в этой зоне. Дозаторы, штативы, пинцет, ножницы предварительно обрабатываются спиртом. Для внесения реагентов и ДНК используются разные дозаторы.
4. Во всех случаях постановки ПЦР обязательно применяются контрольные пробы.
5. ДНК в пробирку вносится в последнюю очередь.
6. Остатки ДНК из наконечника не «выдуваются». «Выдувание» приводит к образованию аэрозоля, которым загрязняются другие пробы ДНК.
7. После добавления очередной пробы ДНК пробирка закрывается крышкой.
8. Пробирка с отрицательным контролем (реагенты без ДНК) закрывается в последнюю очередь, после того как во все пробирки ДНК уже добавлена. Таким образом, обеспечивается контроль над загрязнением реагентов во время постановки ПЦР.
9. Не прикасаться к внутренним поверхностям пробирок.
10. Использованные наконечники сбрасываются в емкость с дезинфицирующим раствором.

Основные требования, предъявляемые к организации работ в зоне детекции продуктов амплификации

1. Анализ продуктов ПЦР должен производиться в изолированной комнате сотрудником лаборатории, не производящим обработки клинических образцов и операций с реакционной смесью. С амплифицированной ДНК обращаются осторожно, чтобы снизить вероятность ее попадания в другие зоны.

2. Перчатки, в которых работают в этой зоне, не используются для работы в других зонах.

3. Если на перчатки попала амплифицированная ДНК, то они сменяются или обрабатываются спиртом.

4. Оборудование, реактивы, халаты, перчатки, уборочный инвентарь, используемые в комнате детекции продуктов амплификации (пост-ПЦР-помещение), хранятся только в этой комнате.

5. В этой зоне необходимо работать в сменной обуви.

6. Пробирки с продуктами ПЦР открываются осторожно, не разбрызгивая содержимое.

7. Если электрофоретическая оценка неамплифицированной ДНК также проводится в этой зоне, то в эту зону вносятся лишь аликвоты геномной ДНК, предназначенные для нанесения.

8. Амплифицированная ДНК хранится отдельно от реагентов и геномной ДНК.

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов

1. Автоматические дозаторы переменного объема (0,1–10, 20–200, 200–1000 мкл).

2. Амплификатор.

3. Бокс для ПЦР.

4. Весы аналитические и прецезсионные.

5. Вортекс.

6. Горизонтальная камера для электрофореза.

7. Источник тока для электрофореза.

8. Компьютер с программным обеспечением для регистрации результатов.
9. Микроволновая печь.
10. Морозильная камера.
11. Наконечники.
12. Перчатки одноразовые.
13. Пробирки типа Эппендорф 0,2–1,5 мл.
14. рН-метр.
15. Спектрофотометр.
16. Стерилизатор.
17. Сушильный шкаф.
18. Термостат.
19. Система гельдокументации.
20. Холодильник.
21. Штативы для наконечников, пробирок, дозаторов.
22. Шкаф вытяжной.
23. Центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» (до 15000 об / мин).

Перечень необходимых реактивов

1. 10xTaq-буфер (10xTaq buffer).
2. Агароза (Agarose).
3. Борная кислота (Boric acid).
4. Бромистый этидий (Ethidium Bromide).
5. Бромфеноловый синий (Bromphenol blue).
6. Ди- и бидистиллированная вода.
7. Дитиотреитол (Dithiotreitol – DDT).
8. Додecilсульфат натрия (SDS).
9. Изоамиловый спирт.
10. Перхлорат натрия (Sodium perchlorat).
11. Праймеры (Primers-mix).
12. Протеиназа К (Proteinase K).
13. РНК-за (RNAase).
14. Сахароза.
15. Смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP).
16. Соляная кислота (Hidrochlorid asid).

17. Таq-ДНК полимераза (Taq DNA Polymerase).
18. Твин 20 (Tween 20).
19. Трис (Tris base).
20. Тритон X-100 (Triton X-100).
21. Хлорид магния (Magnesium chloride).
22. Хлорид натрия (Sodium chloride).
23. Хлороформ (Chloroform).
24. Этанол 96 % (Ethanol).
25. Этилен диаминтетраоацетат (ЭДТА, Трилон Б, EDTA).

Вопросы для самоконтроля:

1. Основные требования, предъявляемые к планировке помещений и организации работ ПЦР-лаборатории.
2. Требования, предъявляемые к основным зонам ПЦР-лаборатории.
3. Что такое контаминация?
4. Виды контаминации?
5. Основное оборудование, необходимое для работы в ПЦР-лаборатории.

ТЕМА 2. МЕХАНИЗМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Занятие 2. Компоненты реакционной смеси. Циклический температурный режим

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК / РНК) в биологическом материале (пробе).

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси ряда основных компонентов.

Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы и должны отвечать ряду критериев:

– *быть специфичными.* Особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, т.к. именно с них Taq-полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. Если их специфичность недостаточна, то высока вероятность, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить процессы неспецифического связывания и синтеза фрагментов различной длины, отличных от искомым. Часть праймеров и дНТФ расходуется на синтез неспецифической ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности;

– *не должны образовывать димеры и петли,* т.е. не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига (комплементарного присоединения) праймеров самих на себя или друг с другом;

– *область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций* в пределах видовой или иной специфичности, взятой в качестве критерия при выборе

праймеров. При попадании на такую зону отжига праймеров не происходит, и, как следствие, возникает ложноотрицательный результат.

Тақ-полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксиденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – «строительный материал», используемый Тақ-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающая оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение рН.

Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации (увеличения числа копий ДНК) с ней происходит ряд событий, которые обеспечиваются определенными температурными циклами.

Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов (рисунок 1):

1. **Денатурация** – это переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований под воздействием высоких температур.

2. **Отжиг** – это присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени. Праймеры подбирают так, что они ограничивают искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит.

3. **Элонгация (синтез).** После отжига праймеров Таq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера.

Температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Таq-полимеразы, которая с максимальной эффективностью начинает синтез второй цепи ДНК от 3'-конца праймера, связанного с матрицей, и движется в направлении от 3' к 5' концу.

Иногда, в случае близкого значения температуры отжига праймеров и температуры оптимума работы фермента, становится возможным использовать двухэтапный ПЦР, совместив отжиг и элонгацию. Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается.

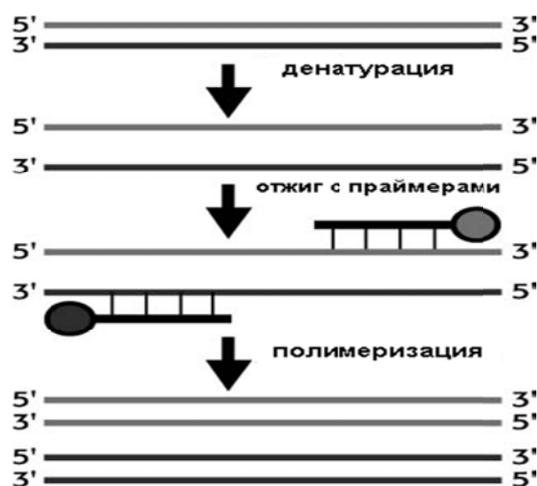


Рисунок 1 – Схема полимеразной цепной реакции

Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК.

Следует заметить, что процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает – «эффект плато».

Термин «эффект плато» используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах ам-

плификации, когда количество ампликонов достигает 0,3–1 пмолей.

В зависимости от условий и количества циклов реакции амплификации на момент достижения «эффекта плато» влияют:

- утилизация субстратов (дНТФ и праймеров);
- стабильность реагентов (дНТФ и фермента);
- количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы;
- неспецифические продукты и праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу;
- концентрация специфического продукта за счет неполной денатурации при высокой концентрации ампликонов.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое ПЦР?
2. Основные компоненты ПЦР и их функции.
3. Каким критериям должны отвечать праймеры?
4. Что такое амплификация?
5. Этапы амплификации. Охарактеризуйте каждый из них.

ТЕМА 3. СТАДИИ ПОСТАНОВКИ ПЦР

Занятие 3. Подготовка пробы биологического материала.

Приготовление растворов для выделения ДНК перхлоратным методом

Биологический материал для ДНК-анализа

В качестве биопроб для ДНК-тестирования используется различный биологический материал, например: ткань, эпителиальная ткань, кровь, эякулят, молоко, волосяные луковицы и др. В процессе взятия биологического материала каждой пробе присваивается номер.

Пробы хрящевой ткани

Взятие пробы ткани у животного осуществляется путем выщипа кусочка хрящевой ткани ушной раковины размером $0,5 \times 0,5 \text{ см}^2$, который заворачивается в фольгу (одновременно с индивидуальным номером животного) и замораживается с целью дальнейшего хранения при $t = -20 \text{ }^\circ\text{C}$ либо консервируется в 96 % этиловом спирте.

Пробы эпителиальной ткани

Эпителиальная ткань отбирается с помощью зонда путем тщательного трения по внутренней стороне щеки. Проба отбирается в двух экземплярах, один из которых исследуется, а второй отправляется на хранение при $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Пробы крови

Взятие проб крови осуществляется из яремной вены в объеме 5 мл в чистые подписанные пробирки с добавлением антикоагулянта (на 20 частей крови – 1 часть 6 % ЭДТА). Срок хранения проб при температуре $4 \text{ }^\circ\text{C}$ – 1–2 часа, при заморозке до $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ – 4 месяца.

Пробы эякулята

Для выделения ДНК из эякулята может использоваться как свежий охлажденный, так и глубоководомороженный эяку-

лят. Срок хранения проб при температуре 4 °С – 1–2 часа, при заморозке до –20 °С – до года, при –80 °С (в низкотемпературной морозильной камере) – неограниченное количество лет. Необходимый объем свежего эякулята для крупного рогатого скота – 5 мл, для свиней – 10 мл (глубокозамороженного – 1 пайетта или 2 гранулы), человека – 7–10 мл.

Задание. Приготовьте растворы для выделения ДНК перхлоратным методом.

Концентрированные растворы для выделения ДНК

1. **1М ТрисНСl**, рН 7,6. Растворить 121,1 г триса в 800 мл дистиллированной воды. Довести рН до необходимого значения добавлением концентрированной соляной кислоты. Для достижения рН 7,6 необходимо добавлять постепенно при перемешивании приблизительно 35 мл концентрированной HCl. При этом постоянно измерять значение рН универсальной индикаторной бумагой или рН-метром. Перед окончательным доведением рН дать раствору остыть до комнатной температуры. Довести объем раствора до 1 л. Разлить на порции и простерилизовать автоклавированием.

2. **40 % NaOH**. Растворить 40 г NaOH в 60 мл дистиллированной воды.

3. **0,5М ЭДТА**, рН 8,0. Добавить 186,1 г двухзамещенной соли ЭДТА к 800 мл дистиллированной воды. Интенсивно размешать на магнитной мешалке. Довести постепенно рН до 8,0 с помощью концентрированного раствора NaOH, не забывая постоянно проверять значение рН. Разлить на порции и простерилизовать автоклавированием. Динатриевая соль не растворяется до тех пор, пока рН раствора не будет доведен добавлением NaOH приблизительно до 8,0.

4. **5М NaCl**. Растворить 292,2 г NaCl в 800 мл дистиллированной воды. Довести объем до 1 л. Разлить на порции и простерилизовать автоклавированием.

5. **0,01М ацетат натрия**, рН 5,2. Растворить 1,36 г ацетата натрия трехводного в 800 мл дистиллированной воды. Довести рН до 5,2 ледяной уксусной кислотой. Довести объ-

ем до 1 л. Разлить на порции и простерилизовать автоклавированием.

6. **1М DTT.** Растворить 3,09 г DTT в 20 мл 0,01 М ацетата натрия, рН 5,2. Простерилизовать фильтрованием, разлить на порции по 1 мл и храните при -20°C . Не автоклавировать DTT или растворы, содержащие DTT.

7. **10 % SDS.** Растворить 10 г электрофоретически чистого SDS в 90 мл дистиллированной воды. Нагреть на водяной бане до 68°C , чтобы ускорить растворение. Довести рН до 7,2 добавлением нескольких капель концентрированной HCl. Довести объем до 100 мл. Надеть маску при взвешивании SDS. Раствор не стерилизовать.

8. **Бромистый этидий (10 мг/мл).** Добавить 1 г бромистого этидия к 100 мл дистиллированной воды. Размешивать на магнитной мешалке несколько часов, пока краситель не растворится. Завернуть колбу в алюминиевую фольгу или перелить в темную склянку и хранить при 4°C . Бромистый этидий – мутаген. При взвешивании надеть перчатки и маску.

9. **0,1 М Трис-HCl, рН 8,0.** 100 мл 1 М Трис-HCl довести до 1 л дистиллированной водой.

Рабочие растворы для выделения ДНК

1. **6 % ЭДТА.** Используется для консервации крови. 6 г ЭДТА растворить в 90 мл дистиллированной воды. Довести рН раствора до 8,0 концентрированным раствором NaOH. Довести объем раствора до 100 мл дистиллированной водой. Раствор профильтровать. Для консервации 20 частей крови брать 1 часть 6 % ЭДТА.

2. **Буфер 1xSTE.** Растворить 10 мл 1М Трис-HCl рН 7,6, 2 мл 0,5М ЭДТА рН 8,0 и 20 мл 5М NaCl в 968 мл дистиллированной воды.

3. **70 % этанол.** 70 мл 96 % этанола довести до 96 мл дистиллированной водой.

4. **Раствор протеиназы К.** Растворить сухую панкреатическую протеиназу К в дистиллированной воде в concentra-

ции 20 мг/мл. Предварительная обработка фермента не требуется. Разлить на порции. Хранить при -20°C .

5. **Раствор РНКазы.** Растворить панкреатическую РНКазу (РНКазу А) в концентрации 10 мг/мл в 10 мМ трис-НСl, рН 7,5 и 15 мМ NaCl. Прогреть 10 мин. при $95-100^{\circ}\text{C}$ для разрушения ДНКазы и медленно охладить до комнатной температуры. Разлить на порции и хранить при -20°C .

6. **5 М перхлорат натрия.** Растворить 702 г в 800 мл дистиллированной воды. Довести объем до 1 л.

7. **T₁₀E₁₀.** 10 мМ Трис-НСl, рН-7,8; 10 мМ ЭДТА, рН = 8,0.

8. **Буфер для хранения ДНК,** рН-7,5-8,0. 0,1-0,2 мМ ЭДТА; 10 мМ Трис-НСl.

9. **Реагент А.** 10 мМ Трис-НСl, рН-8,0; 320 мМ сахараза; 5 мМ хлорид магния; 1 % Тритон X-100.

10. **СИА.** 24 части хлороформа, 1 часть изоамилового спирта. Смесь стабильна и может храниться при комнатной температуре в хорошо закрытом сосуде.

Занятие 4. Методы выделения ДНК. Выделение ДНК перхлоратным методом

Выбор метода выделения ядерной ДНК определяется в зависимости от исходного материала, а также цели исследования и необходимого времени хранения выделенной ДНК. При проведении экспресс-анализа ДНК можно выделять готовыми промышленными наборами в небольшом количестве. Для кратковременного хранения можно использовать быстрые и малотрудоемкие методы выделения ДНК без последующей очистки от продуктов лизиса белков (например, щелочной лизисный буфер, метод Кавасаки). Для длительного хранения ДНК рекомендуется проведение экстракции лизата органическими растворителями с последующим осаждением спиртом с целью получения очищенной фракции ДНК (солевой, перхлоратный методы, фенольно-хлороформовая экстракция). Для анализа ДНК методом ПЦР могут быть исполь-

зованы простые методы ее выделения, т.к. и качеству, и размеру ДНК не предъявляется повышенных требований. Для этих целей вполне подходит ДНК с размером фрагментов 10–20 kb, получение которой возможно любым из нижеописанных способов.

Метод Кавасаки

Данный метод позволяет использовать для последующего анализа непосредственно лизат клеток. Метод был с успехом использован для выделения ДНК из проб ткани.

Используемые реагенты: буфер Кавасаки (хранить при комнатной температуре), 20 mM Трис-НСl, pH = 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 0,5 % (v/v) Tween 20.

Пробы ткани около 1 мм³ помещаются в 200 мкл буфера Кавасаки с добавлением 5 мкл протеиназы К (20 мг/мл) до конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубируются 8–24 часа при 58 °С.

По завершении лизиса для инактивации протеиназы К пробирки выдерживаются при 95 °С в течение 10–15 минут, затем охлаждаются и центрифугируются 1–2 мин при 15000 об/мин для осаждения остатков клеток. Прозрачный лизат непосредственно используется для ПЦР-анализа. В случае необходимости проведения последующих анализов лизат может храниться при +4 °С 2–3 недели или при –20 °С в течение нескольких месяцев.

Метод щелочного лизиса

Метод применяется для получения ДНК из образцов молока.

Используемые реагенты:

- буфер TE (хранить при комнатной температуре) 10 mM Трис-НСl, pH = 7,5; 1 mM ЭДТА, pH = 8.0;
- щелочной лизисный буфер, ALL (храниться при –20 °С) 200 mM КОН; 50 mM дитиотриэтол (ДТТ);
- нейтрализационный буфер, NL (храниться при +4 °С) 900 mM Трис-НСl, pH = 8.3; 300 mM KCl; 200 mM HCl.

К осадку соматических клеток, полученному из 2 мл молока, добавляется 10 мкл буфера ALL и инкубируется при 60 °С в течение 30–45 мин. Затем лизат охлаждается, центрифугируется в течение нескольких секунд для осаждения конденсата и добавляется равный объем нейтрализационного раствора NL (10 мкл). Содержимое пробирок тщательно перемешивается путем встряхивания или с помощью пипетки, после чего пробирки вновь центрифугируются при 15000 об/мин 1 мин для осаждения нелизированных остатков.

Для ПЦР используется 1 мкл ДНК.

Метод солевой экстракции

Данный метод используется для экстракции ДНК из проб ткани, крови, молока.

Используемые реагенты:

– гомогенизационный буфер (хранить при комнатной температуре);

– 160 mM сахараза; 80 mM ЭДТА, pH = 8,0 100 mM Трис-НСl, pH = 8,0; 0,5 % SDS;

– раствор 4,5 M NaCl (хранить при комнатной температуре);

– СlА (хранить при +4 °С); смешать 24 об. хлороформа с 1 об. изоамилового спирта;

– буфер ТЕ (хранить при комнатной температуре) 10 mM Трис-НСl, pH = 7,5; 1mM ЭДТА, pH = 8,0.

Кусочек ткани (2–3 мм³), осадок лейкоцитов или соматических клеток молока помещается в 200 мкл гомогенизационного буфера с добавлением протеиназы К (20 мг/мл) до конечной концентрации 0,5–0,1 мг/мл и инкубируется при 60–65 °С 8–12 часов. К клеточному лизату добавляется 1 об. (200 мкл) 4,5 M NaCl и хорошо перемешивается. Затем добавляется 0,75 об. (300 мкл) СlА и после интенсивного смешивания 3–5 мин., центрифугируется 5 мин. при 15000 об/мин.

Верхняя ДНК-содержащая фракция переносится в чистую пробирку, добавляется 600 мкл 96 % этанола для оса-

ждения ДНК и интенсивно перемешивается, после чего визуализируют шарик ДНК. В случае отсутствия шарика удаляется надосадочная жидкость, добавляется 0,5–1,0 мл 70 % этанола (охлажденного до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) и инкубируется 5–10 мин. при комнатной температуре. После удаления этанола шарик высушивается в течение 30–40 мин. при комнатной температуре и ресуспензируется в 50–100 мкл дистиллированной воды или буфера TE.

Методика выделения ДНК из ископаемых костей

1. В губчатой части ископаемой кости высверливается 1–2 отверстия $d = 8\text{--}10$ мм (предварительно поверхности сверла и кости обжигаются в пламени спиртовой горелки). Костную муку собирают в стерильную посуду, распределив затем часть ее по 3 стерильным пробиркам типа «Eppendorf» на высоту 1–1,5 см от дна пробирки.

2. Во все три пробирки затем добавляется небольшое количество бидистиллированной воды, достаточное для того, чтобы пропитать слой костной муки, и оставляется в холодильнике при $+4\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Из образовавшегося верхнего (водного) слоя каждой пробирки отбирается по 100 мкл раствора и добавляется NaCl, 1200 мкл 96 % этанола перемешивается и оставляется в морозильной камере на ночь при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. На место отобранных 100 мкл элюата добавляется 100 мкл свежего бидистиллята с последующей инкубацией в холодильнике при $+4\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Операция 3 повторяется трижды. После трех элюций получается 3 пробирки со спиртовыми взвесями ДНК, происходящими из одного костного образца.

4. На следующий день ДНК из спиртовых взвесей осаждается центрифугированием 1 мин при 1200 об/мин.

Осадки дважды отмываются 70 % этанолом, подсушиваются и затем добавляется 20 мкл буфера TE. После растворения осадка раствор ДНК ресуспензируется.

5. Полученный раствор ДНК используется в реакциях амплификации.

Методика выделения ДНК из растений

1. Навески растительной ткани помещаются в пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл и гомогенизируются в 500 мкл экстракционного буфера (200 мМ Трис-НСl pH-7,5; 250 мМ NaCl; 25 мМ ЭДТА-Na₂ pH-8,0; 0,5 % SDS) с помощью тefлонового пестика.

2. Пробирки с гомогенатом тщательно встряхиваются.

3. Пробирки помещаются в ультратермостат и инкубируются при 65 °С в течение 15 мин., периодически перемешивая содержимое пробирок мягким покачиванием.

4. Центрифугируются 10 мин. при 12000 об/мин. при комнатной температуре.

5. Супернатант переносится в чистые пробирки и добавляется равный объем фенола (pH 7,8).

6. Содержимое пробирок перемешивается путем аккуратного встряхивания в течение 5 мин., а затем центрифугируется, как описано в пункте 4.

7. Супернатант переносится в чистые пробирки, добавляется равный объем смеси фенол-хлороформ (1:1), перемешивается и центрифугируется, как описано в пункте 4.

8. Супернатант переносится в чистые пробирки, добавляется равный объем смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1), перемешивается и центрифугируется, как описано в пункте 4.

9. Супернатант переносится в чистые пробирки, добавляется 1/10 объема 5М ацетата аммония и равный объем охлажденного изопропанола, хорошо перемешивается и инкубируется 2 часа при температуре -20 °С.

10. Центрифугируется, как описано в пункте 4.

11. Сливаются надосадочная жидкость и последовательно промываются осадки ДНК охлажденным 70 % и 96 % этанолом.

12. Осадки ДНК сушатся при комнатной температуре, а затем растворяются в деионизированной воде.

Выделение ядерной ДНК из ткани перхлоратным методом

1. 0,1 г ткани промываются дистиллированной водой, измельчаются ножницами, помещаются в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

2. Добавляется 200 мкл 1xSTE буфера (такая смесь может храниться в холодильнике в течение суток).

3. В пробирку добавляется 75 мкл 10 % SDS.

4. Добавляется 10 мкл протеиназы К (свежеприготовленной), после 2-дневного хранения раствора – 12 мкл. Хорошо перемешивается на вортексе.

5. Проба помещается в термостат на 10–12 часов при 37 °С.

6. К лизату добавляется 8 мкл РНКазы.

7. Лизат инкубируется 1 час при 37 °С.

8. В пробирку с лизатом добавляется 50 мкл 5М раствора перхлората натрия.

9. В пробирку добавляется 300 мкл С1А (хлороформа).

10. Содержимое пробирки интенсивно перемешивается на вортексе.

11. Центрифугируется 10 мин. при 13000 об/мин.

12. Верхняя ДНК-содержащая фаза осторожно, не затрагивая промежуточного слоя, переносится в чистую 1,5 мл пробирку.

13. Повторяются пункты 9, 10, 11, 12.

14. В пробирку с ДНК-содержащей фазой добавляется 600 мкл 96 % этанола, встряхивается до появления «медузы» ДНК.

15. В 0,5 мл пробирку с 300 мкл 70 % этанола с помощью дозатора перемещается ДНК.

16. Через 5–10 мин спирт удаляется и высушивается ДНК до прозрачного состояния.

17. Растворяется ДНК в буфере для хранения ДНК и доводится концентрация до 100–200 нг/мкл.

18. Раствор с ДНК ресуспензируется, пробирки с ДНК помещаются в морозильную камеру на хранение.

Выделение ядерной ДНК из эпителиальной ткани перхлоратным методом

1. Срезается дистальный конец ватного тупфера зонда в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

2. Добавляется 200 мкл 1xSTE буфера, содержащего 100 мМ NaCl, 10 мМ ТРИС-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА (pH 8,0).

3. Затем добавляется 75 мкл 10 % раствора SDS (додецилсульфата натрия) и 12 мкл протеиназы К концентрацией 20 мг/мл. Хорошо перемешивается на вортексе.

4. Проба помещается в термостат на ночь при 37 °С.

5. К лизату добавляется 8 мкл РНКазы.

6. Лизат инкубируется 1 час при 37 °С.

7. В пробирку с лизатом добавляется 50 мкл 5М раствора перхлората натрия.

8. Добавляется 100 мкл хлороформа (24 части хлороформа, 1 часть изоамилового спирта).

9. Очень тщательно перемешивается на вортексе.

10. Центрифугируется 10 мин. при 13000 об/мин.

11. Верхняя ДНК-содержащая фаза осторожно, не затрагивая промежуточного слоя, переносится в чистую 1,5 мл пробирку.

12. Повторяются пункты 9, 10, 11, 12.

13. В пробирку с ДНК-содержащей фазой добавляется 300 мкл 96 % этанола и центрифугируется 10 мин. при 13000 об/мин.

14. Снимается субнатант и добавляется 150 мкл 70 % этанола.

15. Через 5–10 мин. спирт удаляется, а пробирка переворачивается и ДНК высушивается до прозрачного состояния.

16. После высушивания ДНК растворяется в 70 мкл буфера для ДНК, содержащего 0,1–0,2 мМ ЭДТА, 10 мМ Трис-НСl, рН = 7,5–8,0.

17. Пробирка с ДНК помещается в морозильную камеру на хранение.

Выделение ядерной ДНК из крови перхлоратным методом

1. 300 мкл крови смешивается с 800 мкл буфера T₁₀E₁₀ в микроцентрифужной пробирке объемом 1,5 мл.

2. Центрифугируется при 3000 об/мин. 20 мин.

3. Супернатант сливается.

4. Повторяются п.п. 1, 2, 3 два раза.

5. К осадку добавляется 13 мкл 1М DTT.

6. Добавляется 150 мкл буфера 1xSTE.

7. Добавляется 75 мкл 10 % SDS.

8. Добавляется 12 мкл протеиназы К, хорошо перемешивается.

9. Инкубируется 8–12 ч при 60 °С.

10. К клеточному лизату добавляется 50 мкл 5М раствора перхлората натрия.

11. Добавляется 300 мкл CIA и тщательно перемешивается на вортексе.

12. Центрифугируется при 13000 об/мин. 7 мин.

13. Верхняя ДНК-содержащая фракцию осторожно, не затрагивая промежуточного слоя, переносится в чистую 1,5 мл пробирку.

14. Повторяются п.п. 11, 12, 13.

15. К ДНК-содержащей фракции добавляется 600 мкл 96 % этилового спирта, встряхивается до появления «медузы» ДНК.

16. В 0,6 мл пробирку с 300 мкл 70 % этанола с помощью дозатора перемещается ДНК.

17. Через 5–10 мин. спирт удаляется и ДНК высушивается до прозрачного состояния.

18. ДНК растворяется в буфере для хранения ДНК до концентрации 100–200 нг/мкл, пробирка с ДНК помещается в морозильную камеру на хранение.

Выделение ядерной ДНК из эякулята перхлоратным методом

1. 100 мкл спермы смешивается с 400 мкл реагента А в микроцентрифужных пробирках объемом 1,5 мл.
2. Центрифугируется при 7500 об/мин. 2 мин.
3. Супернатант сливается, к осадку добавляется 13 мкл 1М DTT.
4. Добавляется 150 мкл буфера 1xSTE.
5. Добавляется 75 мкл 10 % SDS.
6. Добавляется 12 мкл протеиназы К, хорошо перемешивается.
7. Инкубируется 8–12 ч при 60 °С.
8. К клеточному лизату добавляется 50 мкл 5М раствора перхлората натрия.
9. Добавляется 300 мкл CIA и тщательно перемешивается на вортексе.
10. Центрифугируется при 13000 об/мин. 7 мин.
11. Верхняя ДНК-содержащая фаза осторожно, не затрагивая промежуточного слоя, переносится в чистую 1,5 мл пробирку.
12. Повторяются п.п. 9, 10, 11.
13. К ДНК-содержащей фазе добавляется 600 мкл 96 % этилового спирта, встряхивается до появления «медузы» ДНК.
14. В 0,6 мл пробирку с 300 мкл 70 % этанола с помощью дозатора перемещается ДНК.
15. Через 5–10 мин. спирт удаляется и ДНК высушивается до прозрачного состояния.
16. ДНК растворяется в буфере для хранения ДНК до концентрации 100–200 нг/мкл, пробирки с ДНК помещаются в морозильную камеру на хранение.

Задание. Выделите ДНК из ткани (крови, спермы) перхлоратным методом.

Занятие 5. Определение концентрации, нативности ДНК и степени ее очистки

Концентрация ДНК оценивается спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра при длине волны 260 нм и 280 нм (рисунок 2).

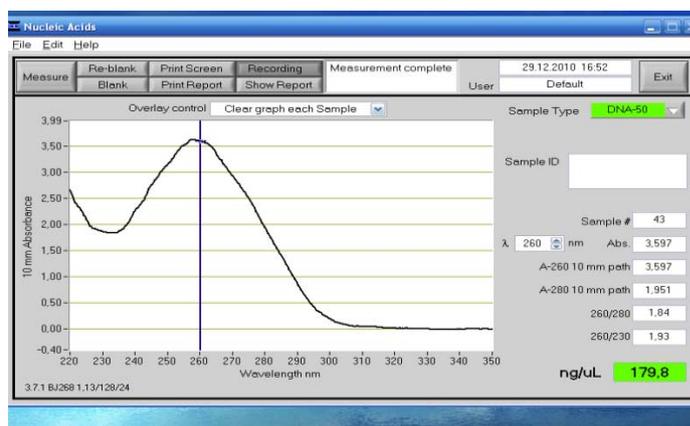


Рисунок 2 – Результат определения концентрации ДНК на спектрофотометре Nanodrop 1000

Концентрация и нативность ДНК также определяется проведением электрофореза в 0,8–1,5 % агарозном геле при напряжении 120 В в течение 20 мин. по интенсивности свечения бромистого этидия в УФ свете и отсутствии «шлейфа» фрагментов ДНК. В качестве маркера используется ДНК известной концентрации (рисунок 3).

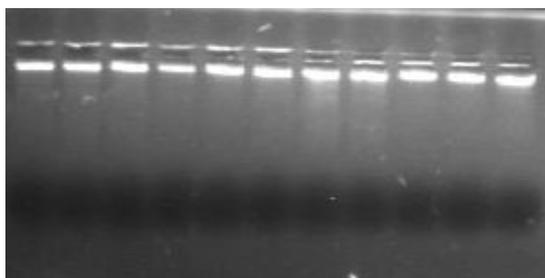


Рисунок 3 – Результаты определения концентрации, степени очистки, нативности и подвижности ДНК методом электрофореза

Задание 1. Приготовьте растворы для проведения гелевого электрофореза:

1. 1 % агарозный гель. Растворите 1 г агарозы в 99 мл 1xTBE (1 % гель). Нагрейте до 100 °С для растворения агарозы, постоянно перемешивая раствор, и медленно охладите до 40–50 °С. Добавьте в раствор агарозы бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Затем с помощью специальной кюветы и гребенки сформируйте гель с лунками.

2. Буфер 1xTBE (трис-боратный). Готовится из основного 10-кратного TBE буфера. На 1 л 10-кратного TBE буфера требуется 108 г триса, 55 г борной кислоты и 7,44 г ЭДТА. Все навески сначала растворите в 800 мл воды, а затем объем доведите до 1 литра. Для приготовления 1x буфера возьмите 100 мл 10x буфера и доведите объем до 1 л.

3. Буфер для нанесения пробы в гель. Буфер для нанесения проб в гель готовить в виде раствора 6–10-кратной концентрации. Например: 0,25 % бромфеноловый синий, 40 % (вес/объем) сахароза (хранить при 4 °С).

Задание 2. Определите концентрацию, нативность и степень очистки выделенной ДНК методом электрофореза.

Занятие 6. Способы постановки ПЦР. Составление реакционной смеси для амплификации. Постановка обычной полимеразной цепной реакции (ПЦР)

На данный момент разработаны варианты постановки ПЦР, направленные на решение следующих задач: увеличение эффективности реакции и снижение риска образования неспецифических продуктов; реализацию возможности проведения как качественного, так и количественного анализа искомым участкам молекулы ДНК/РНК.

Наиболее распространенными в клинико-диагностических лабораториях модификациями ПЦР являются:

1. ПЦР с «горячим» стартом (*hot-start PCR*) – модификация, суть которой состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров.

Для этого полимеразная активность фермента в момент постановки ПЦР блокируется антителами или имитирующими антитела небольшими молекулами до наступления первой денатурации (проводится при 95 °С в течение 10 минут). Для предотвращения преждевременного взаимодействия фермента с компонентами реакционной смеси и, как следствие, образования неспецифических продуктов реакции до момента полного прогрева используется легкоплавкий парафин или специальные масла, отделяющие полимеразу от реакционной смеси.

В зависимости от ГЦ-состава и размера праймеры имеют определенную температуру плавления (T_m), при которой образование водородных связей нестабильно. Если температура системы превышает T_m , праймер не в состоянии удерживаться на цепи ДНК и денатурирует. При соблюдении оптимальных условий, т.е. температуры отжига, близкой к температуре плавления, праймер образует двуцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и таким образом обеспечивает специфичность реакции.

Даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, в отсутствие фермента элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации.

Таким образом, ПЦР с «горячим» стартом позволяет минимизировать вероятность образования неспецифических продуктов ПЦР и возможность получения ложноположительных результатов анализа.

2. ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, RT-PCR). Используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности РНК. На первом этапе с помощью ревертазы (обратной транскриптазы), используя в качестве матрицы мРНК, проводится синтез одноцепочечной молекулы ДНК (кДНК), которая используется для последу-

ющей ПЦР. Для этого применяется обратная транскриптаза, выделенная из двух вирусов: Avian myeloblastosis virus и Moloney murine leukemia virus.

Использование ревертазы связано с некоторыми трудностями. Прежде всего, данный фермент термолабилен и поэтому может быть использован при температуре не выше 42 °С, т.к. при такой температуре молекулы РНК легко образуют вторичные структуры и эффективность реакции заметно снижается, по разным оценкам приблизительно равна 5 %. Этот недостаток может быть устранен при использовании в качестве обратной транскриптазы термостабильной полимеразы, проявляющей активность в присутствии ионов Mn^{2+} . Это единственный известный фермент, способный проявлять как полимеразную, так и транскриптазную активность.

Для проведения реакции обратной транскрипции в реакционной смеси так же, как и в ПЦР, в качестве затравки должны присутствовать праймеры и смесь 4-х дНТФ.

Возможность использования РНК в качестве мишени для ПЦР существенно расширяет спектр применения этого метода. Например, геномы многих вирусов (гепатит С, вирусы гриппа, ВИЧ и т.д.) представлены именно РНК.

3. ПЦР с анализом результатов «по конечной точке» (*End-point PCR*) – это модификация метода ПЦР, которая позволяет учитывать результаты реакции по наличию флуоресценции после амплификации, не открывая пробирки. Таким образом, решается одна из основных проблем ПЦР – контаминация ампликонами.

Одним из таких вариантов является метод «FLASH» (FLuorescent Amplification-based Specific Hybridization – специфическая гибридизация в процессе амплификации с ДНК-зондами, мечеными флуорофорами).

Ключевым элементом метода «FLASH» является использование гибридизационных олигонуклеотидных зондов, меченных молекулами флуорофора и «темнового» гасителя. Зонды добавляют в реакционную смесь наряду с праймерами и остальными компонентами реакции. Поскольку в структуре

зонда флуорофор и гаситель находятся в непосредственной близости друг от друга, то перед началом реакции флуоресценция отсутствует.

Во время реакции зонды гибридизуются с ДНК-мишенью, на стадии элонгации Taq-полимераза разрушает зонд благодаря 5'-эксонуклеазной активности и флуорофор оказывается свободным от гасителя. Таким образом, количество разрушенных зондов и, соответственно, уровень флуоресценции оказываются пропорциональными количеству образовавшихся ампликонов. Следует отметить, что регистрация флуоресценции происходит с помощью детектора флуоресценции после окончания реакции, поэтому метод не является количественным.

4. ПЦР в режиме «реального времени» (*Real-Time PCR*, ПЦР-РВ). Используется для одновременной амплификации и измерения количества искомой молекулы ДНК. Преимуществом данного подхода является возможность совмещения детекции и количественного определения специфической последовательности ДНК в образце в реальном времени после каждого цикла амплификации.

Для этого используются флуоресцентные красители, интеркалирующие в двуцепочечные молекулы ДНК (интеркаляция возможна в случае, если краситель имеет подходящие размеры и химическую природу и может поместиться между основаниями ДНК) или модифицированные дезоксинуклеотиды, которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК.

Часто ПЦР в реальном времени комбинируют с ОТ-ПЦР для измерения малых количеств мРНК, что позволяет получать количественную информацию о содержании искомой мРНК в клетке и судить об уровне экспрессии гена в отдельной клетке или ткани.

Отличительными чертами ПЦР-РВ являются не только возможность количественного определения ДНК/РНК в исследуемом материале, но и отсутствие стадии электрофореза, что позволяет минимизировать риск контаминации продук-

тами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов. Также менее строгие требования предъявляются к организации ПЦР-лаборатории, становятся возможны автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов.

5. *Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР* – это одновременная амплификация двух и более последовательностей ДНК в одной пробирке. Преимуществом данного метода является возможность выявления ряда патогенов, генетических модификаций организмов или генотипирования множественных аллелей и т.д., поместив пробу в одну пробирку.

Кроме того, возможны и другие варианты ПЦР, получившие наибольшее распространение в научно-исследовательских лабораториях, например:

1. *Гнездовая («вложенная», англ. nested PCR) ПЦР* применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используются две пары праймеров и проводится две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

2. *«Инвертированная» ПЦР* используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для этого проводится ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов.

3. *Ассиметричная ПЦР* проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. Сама ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке.

4. *Метод молекулярных колоний* – данная модификация основана на использовании акриламидного геля, который до начала ПЦР полимеризуется со всеми ее компонентами на поверхности. В процессе реакции в точках, содержащих ана-

лизируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.

5. *ПЦР длинных фрагментов (англ. Long-range PCR)* – вариант ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований). Для реализации данного подхода используется смесь двух полимераз, одна из которых – Таq-полимераза с высокой процессивностью (способна за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая – ДНК-полимераза с 3'-5'-экзонуклеазной активностью (Pfu-полимераза). Она необходима для корректирования ошибок, внесенных Таq-полимеразой, при этом некомплементарные нуклеотиды удаляются с помощью Pfu-полимеразы.

6. *Групп-специфическая ПЦР (англ. group-specific PCR)* – ПЦР с использованием консервативных праймеров к последовательностям ДНК для родственных групп внутри одного или между разными видами. Например, подбор универсальных праймеров к рибосомальным 18S и 26S генам для амплификации видоспецифического межгенного спейсера: последовательность генов 18S и 26S консервативна между видами, поэтому ПЦР между этими генами будет проходить для всех исследуемых видов.

Постановка обычной ПЦР

Для успешного проведения реакции необходим оптимально подобранный состав реакционной смеси, а также температурный и временной режимы ПЦР. В таблице 1 приведен состав реакционной смеси и концентрации используемых реактивов в расчете на общий объем 20 мкл. При необходимости добавляется минеральное масло (для предотвращения выпаривания реакционной смеси).

Таблица 1 – Состав реакционной смеси и концентрации используемых реактивов

Компоненты	Концентрация на 1 пробу
10xTaq-буфер	1x
MgCl ₂	0,5–5 mM
Смесь дНТФ	50–500 мкМ
Праймер 1	10–25 пМ
Праймер 2	10–25 пМ
Taq-полимераза	0,5–2,5 е.а.
ДНК	30–200 нг
H ₂ O	до 20 мкл

Концентрация компонентов смеси в расчете на одну пробу переводится в единицы объема с учетом концентрации матричных растворов.

Пересчет молярных концентраций проводится согласно формуле 1:

$$\frac{x \times c_1}{V} = c_2, \quad (1)$$

где x – необходимое количество матричного раствора (мкл) на 1 пробу;

c_1 – концентрация матричного раствора (мМ);

c_2 – необходимая концентрация компонента смеси (мМ) на 1 пробу;

V – объем реакционной смеси (мкл) на 1 пробу.

Пересчет концентрации Taq-буфера проводится аналогичным образом (смотри формулу 1).

Пересчет необходимого количества праймеров проводится согласно формуле 2:

$$\frac{c_2}{c_1} = y, \quad (2)$$

где y – необходимое количество праймера (мкл) на 1 пробу;

c_1 – концентрация матричного раствора праймера (пМ/мкл);

C_2 – необходимая концентрация праймера на 1 пробу (пМ).

Пересчет необходимого количества Таq-полимеразы проводится согласно формуле 3:

$$\frac{V \times C_2}{C_1} = z, \quad (3)$$

где z – необходимое количество Таq-полимеразы на 1 пробу (мкл);

C_2 – необходимое количество е.а. Таq-полимеразы на 1 пробу;

V – объем матричного раствора Таq-полимеразы (мкл);

C_1 – количество е.а. Таq-полимеразы в матричном растворе.

Все этапы ПЦР проводятся в специальном приборе – автоматическом термоциклере (амплификаторе), в котором программируется время проведения ПЦР и все условия ее проведения.

Задание 1. Составьте реакционную смесь по гену-рецептору MUC4 (7 intron G→C), ассоциированному с предрасположенностью молодняка свиней к неонатальной полидиарее, которая готовится в объеме 20 мкл и содержит 1хТаq-буфера, 0,3 mM дНТФ (dNTP's), 1,5 mM MgCL₂, 4 пМ каждого праймера, 0,5 е.а. Таq-полимеразы, 100–200 нг/мкл геномной ДНК.

Задание 2. Проведите постановку ПЦР, используя программу: «горячий старт» – 5 минут при 95 °С; 35 циклов: денатурация – 30 секунд при 94 °С, отжиг – 30 секунд при 56 °С, синтез – 30 минут при 72 °С; достройка – 4 минуты при 72 °С.

Занятие 7. Детекция результатов ПЦР. Визуализация амплификата методом горизонтального электрофореза

Существует несколько основных способов детекции результатов ПЦР:

1. Электрофоретический (в агарозном или полиакриламидном геле);

2. Гибридизационно-ферментный;
3. Гибридизационно-флуоресцентный:
 - регистрация продукта после окончания реакции амплификации – «анализ по конечной точке»;
 - детекция продукта в режиме «реального времени».

Метод горизонтального электрофореза

Наиболее распространенным до недавнего времени являлся метод электрофореза, основанный на разделении молекул ДНК по размеру. В этом случае визуализация результатов проводится в пластине агарозного геля, который представляет собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5–2,5 % с добавлением специального красителя ДНК, например бромистого этидия в агарозном геле.

Застывшая агароза образует пространственную решетку. При заливке с помощью гребенок в геле формируются лунки, в которые вносятся продукты амплификации. Пластина геля помещается в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключается источник постоянного напряжения.

Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от минуса к плюсу. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияют: концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера и, в меньшей степени, ГЦ-состав ДНК. Краситель встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК.

Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 мин до 1 часа, гель помещается на фильтр трансиллюминатора, который излучает свет в ультрафиолетовом диапазоне (254–310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм).

Яркость полос продуктов амплификации может быть различной, поэтому часто в ПЦР-лабораториях принято оценивать результат по трех-, четырех- или пятибалльной системе. Однако это нельзя связывать с начальным количеством ДНК-мишени в образце.

Часто уменьшение яркости свечения полос связано со снижением эффективности амплификации под влиянием ингибиторов или других факторов.

Метод вертикального электрофореза

Метод вертикального электрофореза принципиально схож с горизонтальным электрофорезом. Их отличие заключается в том, что в данном случае вместо агарозы используется полиакриламид и специальная камера для вертикального электрофореза. Электрофорез в полиакриламидном геле имеет большую разрешающую способность по сравнению с агарозным электрофорезом и позволяет различать молекулы ДНК с точностью до одного нуклеотида. Однако приготовление полиакриламидного геля несколько сложнее агарозного, кроме того, акриламид является токсичным веществом. Поскольку необходимость определить размер продукта амплификации с точностью до 1 нуклеотида возникает редко, то в рутинной работе этот метод не используют.

Оба варианта электрофоретической детекции позволяют осуществлять качественный анализ.

Метод гибридизации после амплификации

Другой способ детекции продуктов амплификации основан на гибридизации олигонуклеотидных зондов с продуктами амплификации. Зонды представляют собой искусственно синтезированные участки ДНК, содержащие ту или иную метку, детектируемую специальными приборами.

Для детекции продуктов ПЦР после окончания реакции амплификации необходимо специальное оборудование – детектор флуоресценции.

В процессе своей работы прибор регистрирует флуоресцентное излучение, возникающее в реакционной смеси при

освещении образца источником возбуждающего света. Регистрация производится последовательно для каждой из пробирок при ее позиционировании относительно оптического блока с помощью шагового двигателя.

Флуорофоры для каждой из мишеней (например, для специфического искомого участка ДНК и внутреннего контроля) имеют свою длину волны, это позволяет регистрировать одновременно несколько сигналов по соответствующим каналам, что повышает производительность метода.

Такой подход позволяет свести к минимуму риск контаминации продуктами амплификации. Детекция результатов проводится в закрытых пробирках, что позволяет осуществлять ПЦР-исследования в одной комнате и обходиться меньшим количеством персонала. Кроме того, регистрация, интерпретация и хранение полученных результатов проводятся автоматически.

В результате указанный способ детекции существенно сокращает время проведения анализа и исключает возможность субъективной оценки полученных результатов, что повышает качество работы лаборатории. Тем не менее, необходимо помнить, что реализация данного подхода позволяет проводить только качественный анализ.

Различные варианты детекции по конечной точке позволяют оценить количество исходной ДНК методом серийных разведений, определяя количество работающих разведений и сравнивая их с контрольными образцами с известной концентрацией ДНК. Однако данный подход является слишком трудоемким и практически не применяется в условиях диагностических лабораторий.

Метод гибридизации в процессе амплификации

Позволяет учитывать результаты реакции, не открывая пробирки. Регистрация результатов по уровню флуоресценции происходит с помощью специального оборудования.

Ключевым элементом метода является использование гибридных олигонуклеотидных зондов, меченных молекулами флуорофора и «темнового» гасителя.

Наиболее часто применяется флуоресцентный краситель 6-ФАМ (6-карбоксифлуоресцеин) с длиной волны возбуждения 488 нм, который легко связывается с олигонуклеотидами и обеспечивает высокую интенсивность сигнала. Поэтому под анализ с его использованием адаптированы многие приборы.

Также активно применяется SYBR Green I, который при связывании с двухцепочечной ДНК вызывает увеличение флуоресценции. В качестве референсного красителя широко используется ROX.

Для выявления продуктов амплификации применяются следующие наиболее распространенные подходы:

1. Выщепление 5'-концевой метки – метод основан на использовании 5'-экзонуклеазной активности полимеразы. В реакционную смесь добавляются ДНК-зонды, в состав которых входят флуоресцентная метка в 5'-положении, гаситель флуоресценции в 3'-положении, а также фосфатная группа в 3'-положении. Эти зонды имеют места посадки внутри амплифицируемой области. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу.

В ходе ПЦР во время стадии отжига праймеров происходит присоединение ДНК-зонда к комплементарной цепи ДНК, при этом чем больше продуктов амплификации образуется в ходе ПЦР, тем больше молекул зондов свяжется с соответствующими ампликонами. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и при достижении зонда начинает его расщеплять благодаря наличию 5'-экзонуклеазной активности.

Таким образом, происходит разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к увеличению детектируемого свечения. Очевидно, что чем больше ампликонов было

наработано в ходе ПЦР на данный момент времени, тем интенсивнее будет свечение.

2. Использование зондов с комплементарными концевыми последовательностями – методика отличается от описанной выше тем, что концевые последовательности зонда представляют собой взаимно комплементарные области, а флуорофор и гаситель присоединяют к концевым нуклеотидам. При температуре отжига свободные зонды образуют шпильки за счет наличия комплементарных участков. При этом флуорофор и гаситель оказываются в непосредственной близости, что приводит к тушению флуоресценции.

При отжиге праймеров зонды комплементарно присоединяются к амплифицируемому участку ДНК, гаситель оказывается пространственно отделен от флуорофора и наблюдается рост флуоресцентного сигнала. Такие зонды часто называют «молекулярными беконами» (molecular beacons).

Таким образом, количество присоединившихся зондов и, соответственно, уровень флуоресценции оказываются пропорциональными количеству образовавшихся специфических продуктов ПЦР.

3. Применение 2-х зондов с резонансным переносом энергии – данный способ детекции отличается повышенной специфичностью, т.к. увеличение флуоресценции происходит при комплементарном связывании с ампликонами сразу 2-х ДНК-зондов. Принцип метода заключается в переносе энергии от одного флуорофора, находящегося на 3'-конце первого зонда, ко второму флуорофору, который находится на 5'-конце второго зонда, причем расстояние между флуорофорами составляет 1–3 нуклеотида. При одновременном связывании обоих зондов с ДНК матрицей излучение, испускаемое первым флуорофором, передается на второй флуорофор, а его излучение детектируется прибором.

4. Использование интеркалирующих красителей – этот способ детекции основан на том, что флуоресценция интеркалирующих красителей значительно возрастает при их

внедрении в двухцепочечные молекулы ДНК. Таким образом, можно наблюдать за накоплением продуктов амплификации.

5. Для анализа в режиме «реального времени» используются специальные ДНК-амплификаторы с оптическим блоком, позволяющие детектировать флуоресценцию внутри реакционной пробирки в ходе реакции. При амплификации образца детектируемый флуоресцентный сигнал может состоять из трех последовательных участков:

1 – базовая линия (сигнал не превышает предела детектирования прибора);

2 – экспоненциальная амплификация;

3 – плато.

Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастает пропорционально количеству продукта амплификации. Мониторинг сигнала позволяет построить кинетическую кривую реакции, при этом момент заметного увеличения сигнала и отрыва его от фонового (так называемый пороговый цикл) зависит от исходного количества ДНК-мишени. Чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл.

Главным преимуществом детекции результатов ПЦР в режиме «реального времени» является возможность проведения количественного анализа.

При количественном исследовании образцов каждая серия экспериментов сопровождается постановкой амплификации с контрольными образцами, в которых заведомо известно количество копий ДНК (калибровочные образцы). Сравнение кинетики накопления продуктов амплификации в экспериментальных и контрольных образцах позволяет оценить концентрацию ДНК в диапазоне разведений контрольных препаратов ДНК.

Следует отметить, что для выполнения количественного ПЦР-анализа рекомендуется использование препаратов ДНК с высокой степенью очистки, т.к. присутствие нежелательных примесей (ингибиторов) снижает эффективность амплификации исследуемой и контрольной ДНК.

Для контроля точности количественного анализа используются калиброванные внутренние контроли. В некоторых случаях возможны потери ДНК на стадии выделения, приводящие к существенному искажению значения реального количества ДНК в образце. Для контроля за такими потерями в образец перед пробоподготовкой вносят внутренний контроль, количество которого определяют вместе с количеством ДНК инфекционного агента.

Кроме того, появляется возможность реализовать анализ кривых плавления, когда после окончания ПЦР реакционная смесь нагревается и непрерывно измеряется флуоресценция. По достижении температуры плавления продукта амплификации флуоресценция резко снижается.

Каждое резкое уменьшение флуоресценции на графике соответствует числу полосок, получаемых на электрофореze, т.е. числу разных типов ампликонов. Применение кривых плавления не ограничивается только детекцией продуктов амплификации с помощью интеркалирующих флуорофоров.

При использовании кривых плавления в системах с ДНК-зондами возможно различать точечные мутации, расположенные внутри областей связывания ДНК-матрицы и зонда.

Наличие таких мутаций способно привести к изменению температуры плавления зонда и изменениям в графике кривой плавления. Использование кривых плавления не требует от оператора амплификатора никаких дополнительных манипуляций с пробирками, а интерпретация полученных данных автоматизирована и формализована.

Таким образом, данный подход имеет ряд преимуществ по сравнению с методами анализа по конечной точке:

- количественный анализ специфической ДНК в широком диапазоне концентраций;
- сравнительный количественный анализ нескольких типов ДНК в одной пробирке;
- обнаружение и определение процентного содержания ДНК с измененной последовательностью;
- автоматизация и стандартизация ПЦР-анализа.

Задание 1. Приготовьте 2 % агарозный гель для проведения гель-электрофореза:

– растворите 2 г агарозы в 99 мл 1xTBE. Нагрейте до 100 °С для растворения агарозы, постоянно перемешивая раствор, и медленно охладите до 40–50 °С. Добавьте в раствор агарозы бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Затем с помощью специальной кюветы и гребенки сформируйте гель с лунками.

Таким же образом готовится 1,5–5 % агарозный гель (растворите от 1,5 до 5 г агарозы в 1xTBE).

Задание 2. Проведите визуализацию амплификата по гену MUC4 (7 intron G→C) методом горизонтального электрофореза.

Детекция результатов амплификации по гену MUC4 (7 intron G→C): 8 мкл продукта амплификации + 0,5 мкл бромфенолового синего раскатать в 2 % агарозный гель (110 W, 30–35 мин.). Длина амплифицированного фрагмента: 367 п.н.

Для электрофореза используется 1xTBE буфер.

Визуализация и анализ результатов осуществляются на системе гель-документации.

Занятие 8. Постановка ПДРФ-анализа и визуализация полученного продукта

Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ, Restriction fragment length polymorphism, RFLP) – варьирование по длине фрагментов ДНК, образуемых специфическими рестрикционными эндонуклеазами из геномной ДНК двух или более индивидов или видов. ПДРФ является следствием перестроек или других мутаций, ведущих к образованию или делетированию сайтов узнавания для эндонуклеаз. Он может быть также результатом присутствия повторов ДНК в различном количестве копий в определенных областях хромосом. Широко используется для создания геномных карт, локализации генов в сложных геномах, для установления различий между близкородственными особями.

Анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДРФ-анализ) включает следующие этапы: выделение геномной ДНК, ее рестрикцию специфической эндонуклеазой, электрофоретическое разделение образующихся фрагментов ДНК и идентификацию фрагментов ДНК, содержащих полиморфный сайт рестрикции, путем блот-гибридизации по Саузерну.

Наличие сайтов рестрикции в геномной ДНК и их взаимное расположение однозначно определяются последовательностью нуклеотидов исследуемой ДНК, поскольку сам сайт рестрикции – не что иное, как строго определенная последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая и расщепляемая рестриктазами. Следовательно, любая мутация, изменяющая последовательность нуклеотидов сайта рестрикции, уничтожает этот сайт. Полное расщепление анализируемой геномной ДНК отдельными рестриктазами приводит к образованию определенного набора фрагментов ДНК, число и размеры которых соответствуют расположению сайтов рестрикции.

Гибридизация по Саузерну позволяет определять размеры и взаимное расположение рестриционных фрагментов ДНК после их электрофоретического разделения. Мутационная изменчивость в сайтах рестрикции может быть легко обнаружена по изменению длины рестриционных фрагментов ДНК, гибридизующихся со специфическими ДНК-зондами.

Мутация в одном из сайтов рестрикции приводит к тому, что этот сайт остается нерасщепленным после завершения рестрикции, что приводит к слиянию соседних рестриционных фрагментов ДНК, разделяемых мутантным сайтом, и образованию фрагмента ДНК большего размера. Следовательно, при отсутствии рестрикции в полиморфном сайте на электрофореграммах или радиоавтографах (в зависимости от типа мечения ДНК-зонда) будет выявляться один крупный фрагмент, соответствующий по длине последовательности ДНК между двумя соседними константными сайтами рестрикции для той же эндонуклеазы.

При наличии рестрикции в полиморфном локусе на электрофореграмме будет присутствовать меньший по размерам фрагмент, равный расстоянию между полиморфным сайтом рестрикции и одним из ближайших константных сайтов рестрикции. В результате длина рестрикционных фрагментов ДНК, содержащих мутантные сайты, становится полиморфной, что выявляется при сравнении ДНК из разных источников методом ПДРФ.

Постановка ПДРФ-анализа проводится в отдельном помещении при наличии твердотельных термостатов. Существенным моментом является приготовление рестрикционной смеси.

Реакционная смесь обычно готовится в объеме 15 мкл:

1. 1 мкл H_2O ;
2. 2,5 мкл буфера;
3. 1,5 мкл рестрикционного фермента;
4. 10 мкл амплификата.

Все тщательно перемешивается на вортексе и образцы помещаются в термостат на необходимое для рестрикции время.

Проводится электрофорез и оценивается полученный результат.

Задание. Проведите рестрикцию амплифицированного участка гена MUC4 (7 intron G→C).

Для рестрикции амплифицированного участка гена MUC4 (7 intron G→C) используют эндонуклеазу XbaI. Реакцию проводят при температуре 37 °С. Продукты рестрикции гена разделяют электрофоретически в 2 % агарозном геле в TBE буфере с использованием бромистого этидия при напряжении 40 В в течение 40 минут.

При расщеплении продуктов амплификации по гену MUC4 (7 intron G→C) идентифицируются следующие генотипы (на системе гель-документирования):

– MUC4^{CC} – фрагменты 216, 151 п.н. (устойчив к F4 ab/ac-инфекциям);

- MUC4^{CG} – фрагменты 367, 216, 151 п.н. (не устойчив к F4 ab/ас-инфекциям);
- MUC4^{GG} – фрагмент 367 п.н. (не устойчив к F4 ab/ас-инфекциям).

Занятие 9. Определение частот аллелей и генотипов при кодоминантном наследовании и двухаллельной системе гена

У большинства полиморфных систем доминирования одного аллеля над другим нет, а наблюдается кодоминирование, при котором в фенотипе проявляются оба аллеля. При этом среди гомозиготных генотипов легко можно выделить гетерозиготные генотипы. Например, у гена каппа-казеина (CSN3), детерминирующего наличие белка в молоке, известны два аллеля А и В, обуславливающие синтез двух форм белка трех генотипов АА, АВ, ВВ.

Если обозначить частоту аллеля CSN3^A символом p_A , а частоту аллеля CSN3^B символом q_B , то при такой структуре локуса и кодоминантном наследовании величины частот p и q определяются по формулам 4 и 5:

$$p_A = \frac{2n_1 + n_3}{2N}; \quad (4)$$

$$q_B = \frac{2n_2 + n_3}{2N}; \quad (5)$$

при этом сумма $p_A + q_B = 1$. Здесь n_1 и n_2 – количество особей гомозиготного генотипа ($n_1 = \text{CSN3}^{\text{AA}}$, $n_2 = \text{CSN3}^{\text{BB}}$);

n_3 – количество гетерозиготных особей (CSN3^{AB});

$2N$ – число аллелей в локусе диплоидного организма в популяции, насчитывающей N особей.

Концентрация в данной популяции животных всех трех генотипов определяется подсчетом по каждому типу каппа-казеина численности особей и отнесением этого показателя к общему количеству обследованных животных. В таком случае частота трех генотипов будет составлять (формулы 6, 7, 8):

$$p_{AA} = \frac{n_1}{N}; \quad (6)$$

$$q_{BB} = \frac{n_2}{N}; \quad (7)$$

$$z_{AB} = \frac{n_3}{N}. \quad (8)$$

Сумма частот должна составить единицу, т.е. $p + q + z = 1$.

Пример: в стаде крупного рогатого скота насчитывается 1000 животных, среди которых было 300 особей генотипа $CSN3^{AA}$, 650 особей генотипа $CSN3^{BB}$ и 50 животных генотипа $CSN3^{AB}$.

Сначала по формулам максимального правдоподобия определяются частоты аллелей А и В:

$$p_A = \frac{2n_1 + n_3}{2N} = \frac{2 \times 300 + 50}{2 \times 1000} = 0,3250;$$

$$q_B = \frac{2n_2 + n_3}{2N} = \frac{2 \times 650 + 50}{2 \times 1000} = 0,6750;$$

$$p_A + q_B = 0,3250 + 0,6750 = 1.$$

Статистическая ошибка для обеих частот определяется по формуле 9:

$$\begin{aligned} m_p = m_q &= \sqrt{\frac{q(1-q)}{2N}} = \sqrt{\frac{p \times q}{2N}} = \sqrt{\frac{0,3250 \times 0,6750}{2 \times 1000}} = \\ &= \sqrt{\frac{0,219375}{2000}} = \sqrt{0,00011} = 0,010. \quad (9) \end{aligned}$$

Частоты и их ошибки записываются обычным способом:

$$p_A + m_p = 0,3250 \pm 0,010;$$

$$q_B + m_q = 0,6750 \pm 0,010.$$

Так как величина ошибки более чем в 3 раза меньше показателя частоты (критерий достоверности t_p и $t_q > 3$), то приведенные выше частоты аллелей статистически достоверны.

Частота генотипов в популяции составляет:

$$p_{AA} = \frac{n_{AA}}{N} = \frac{300}{1000} = 0,3000;$$

$$q_{AB} = \frac{n_{AB}}{N} = \frac{50}{1000} = 0,050;$$

$$z_{BB} = \frac{n_{BB}}{N} = \frac{650}{1000} = 0,650.$$

Задание.

1. Определите частоты аллелей С и G, если в популяции свиней насчитывается 2000 животных, среди которых было 700 особей генотипа $MUC4^{CG}$, 850 особей генотипа $MUC4^{CC}$ и 450 животных генотипа $MUC4^{GG}$.

2. Определите ошибку для обеих частот.

3. Определите частоту генотипов $MUC4^{CG}$, $MUC4^{CC}$, $MUC4^{GG}$.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бакай, А.В. Генетика / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М. : КолосС, 2007. – 448 с. : ил.
2. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин. – Минск : Выш. шк., 2005. – 463 с.
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – пер. с англ. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
4. Иванова, В.И. Геномика / В.И. Иванова. – М. : ИКЦ «Академкнига», 2007. – 638 с. : ил.
5. Инге-Вечтомов, С.Г. Генетика с основами селекции / С.Г. Инге-Вечтомов. – СПб. : Изд-во Н-Л, 2010. – 720 с. : ил.
6. Основы генетики : учебник для студентов учреждений высш. проф. образования / А.Ю. Асанов [и др.]. – М. : Издательский центр «Академия», 2012. – 288 с. : ил.
7. Попов, В.В. Геномика с молекулярно-генетическими основами : монография / В.В. Попов. – М. : Либроком КД, 2009. – 304 с.
8. ПЦР «в реальном времени» / Д.В. Ребриков [и др.]. – М. : БИНОМ ; Лаборатория знаний, 2009. – 223 с. : ил.
9. Рыбчин, В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин ; 2-е изд., перераб. и доп. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. – 522 с.
10. Сазанов, А.А. Геномика / А.А. Сазанов. – СПб. : ЛГУ им. А.С. Пушкина, 2011. – 264 с.
11. Уильямс, С.К. Основы генетики / С.К. Уильямс, С.К. Клаг. – М. : Техносфера, 2007 – 896 с.
12. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия : учеб.-справ. пособие / С.Н. Щелкунов. – 3-е изд., испр. и доп. – Новосибирск : Сиб. Унив. Изд-во, 2008. – 514 с. : ил.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
ТЕМА 1. УСТРОЙСТВО ПЦР-ЛАБОРАТОРИИ	4
Занятие 1. Организация работы ПЦР-диагностической лаборатории. Перечень необходимого оборудования	4
ТЕМА 2. МЕХАНИЗМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ	12
Занятие 2. Компоненты реакционной смеси. Циклический температурный режим	12
ТЕМА 3. СТАДИИ ПОСТАНОВКИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ	16
Занятие 3. Подготовка пробы биологического материала. Приготовление растворов для выделения ДНК перхлоратным методом	16
Занятие 4. Методы выделения ДНК. Выделение ДНК перхлоратным методом	19
Занятие 5. Определение концентрации, нативности ДНК и степени ее очистки	28
Занятие 6. Способы постановки ПЦР. Составление реакционной смеси для амплификации. Постановка обычной полимеразной цепной реакции (ПЦР)	29
Занятие 7. Детекция результатов ПЦР. Визуализация амплификата методом горизонтального электрофореза...	36
Занятие 8. Постановка ПДРФ-анализа и визуализация полученного продукта	44
Занятие 9. Определение частот аллелей и генотипов при кодоминантном наследовании и двухаллельной системе гена	47
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	50

Учебное издание

Каспирович Дмитрий Анатольевич
Глинская Наталья Анатольевна
Волкова Елена Михайловна

**Молекулярные механизмы генетических процессов:
методы изучения геномов**

Методическое пособие

Ответственный за выпуск *П.Б. Пигаль*

Корректор *Ю.В. Цвикевич*

Подписано в печать 26.06.2015 г. Формат 60×84/16.
Бумага офсетная. Гарнитура «Таймс». Ризография.
Усл. печ. л. 3,02. Уч.-изд. л. 1,83.
Тираж 60 экз. Заказ № 951.

Отпечатано в редакционно-издательском отделе
Полесского государственного университета.
225710, г. Пинск, ул. Днепровской флотилии, 23