

М.З.Н.

МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА

МЕТОДИЧНІ
ВКАЗІВКИ
ЩОДО ВИКОНАННЯ
ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Київ
Національний центр
«Мала академія наук України»
2023

Міністерство освіти і науки України
Національна академія наук України
Національний центр «Мала академія наук України»

МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ЩОДО ВИКОНАННЯ
ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Київ
Національний центр
«Мала академія наук України»
2023

Автор-укладач:

С. В. Антоненко — методистка лабораторії хіміко-біологічних наук НЦ «МАНУ», наукова співробітниця Інституту молекулярної біології й генетики НАН України, канд. біол. наук

Рецензенти:

Д. С. Гур'янов — науковий співробітник відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, канд. біол. наук;

З. М. Нідосєва — наукова співробітниця відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, канд. біол. наук

*Рекомендовано науково-методичною радою
Національного центру «Мала академія наук України»
(протокол № 2 від 18 серпня 2022 р.)*

Молекулярна генетика. Методичні вказівки щодо виконання
М74 лабораторних робіт / автор-укладач: С. В. Антоненко; відп. за вип.:
Т. В. Пещеріна, А. М. Буткевич. — Київ : Національний центр «Мала академія
наук України», 2023. — 100 с.
ISBN 978-617-7945-51-1

Методичні вказівки призначені для поглиблення знань та проведення лабораторних робіт із курсу «Молекулярна генетика». У виданні подаються сучасні теоретичні та практичні знання з основних розділів молекулярної генетики. Зокрема, докладно розглядається будова нуклеїнових кислот (ДНК і РНК), характеризуються основні молекулярно-генетичні механізми збереження, відтворення та передавання спадкової інформації, а також організація геномів організмів. У збірці надано практичні рекомендації щодо підготовки та проведення експериментів за основними молекулярно-генетичними методиками, підходів до вивчення каріотипу рослин, методів трансрипції та трансфекції.

Методичні вказівки підготовлені відповідно до навчальної програми «Молекулярна генетика». Видання призначене для вихованців Малої академії наук України та учнів закладів загальної середньої освіти, у яких біологія є предметом поглибленого вивчення. Матеріали можуть бути використані під час проведення занять з біології згідно зі шкільною програмою, роботи секцій закладів позашкільної освіти, планування та виконання науково-дослідницьких проєктів та реалізації викладацької діяльності.

УДК 576.32/36 + 576.08

ЗМІСТ

Вступ	5
Розділ 1	
НУКЛЕІНОВІ КИСЛОТИ. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ	8
1.1. Структура нуклеїнових кислот	8
1.2. Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК)	10
1.3. Рибонуклеїнова кислота (РНК)	12
Лабораторна робота № 1. Організація молекулярно-генетичної лабораторії	14
Лабораторна робота № 2. Виділення плазмідної ДНК	22
Лабораторна робота № 3. Виділення ДНК з рослинного матеріалу	24
Лабораторна робота № 4. Виділення ДНК із клітин букального епітелію	26
Завдання для контролю	28
Розділ 2	
МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ГЕНЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ	30
2.1. Реплікація ДНК	30
2.2. Полімеразна ланцюгова реакція	34
2.3. Механізми реалізації генетичної інформації	36
2.4. Система репарації ДНК	37
2.5. Рестрикційно-модифікаційна система	41

Лабораторна робота № 5. Полімеразна ланцюгова реакція	43
Лабораторна робота № 6. Лігування молекул ДНК	48
Лабораторна робота № 7. Ендонуклеази рестрикції	50
Лабораторна робота № 8. Електрофорез нуклеїнових кислот в агарозному гелі	52
Завдання для контролю	57
 Розділ 3	
ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ. ГЕНИ	62
3.1. Хромосоми. Структура і функції	62
3.2. Каріотип людини	66
3.3. Структурна організація генів прокаріотів та еукаріотів	69
 Лабораторна робота № 9. Визначення каріотипу рослин	70
Лабораторна робота № 10. Компетентні клітини	74
Лабораторна робота № 11. Генетична трансформація прокаріотів	75
Лабораторна робота № 12. Трансфекція клітин еукаріотів	78
Завдання для контролю	80
 Теми реферативних повідомлень	83
Список використаних джерел	84
Список ілюстрацій	88
Додатки	92

ВСТУП

Молекулярна генетика — це провідний розділ біологічної науки, який вивчає молекулярні основи спадковості та мінливості організмів. З кожним роком потреба в молекулярно-генетичних знаннях зростає — молекулярна генетика відкриває нові можливості для лікування та діагностики спадкових захворювань, моделювання й отримання білків медичного призначення, вакцин, підходи до лікування злоякісних новоутворень, лежить в основі фундаментальних біомедичних досліджень, біотехнологічних розробок, генетичної інженерії, є важливою складовою розвитку фармакології, сільського господарства та промисловості. Молекулярна генетика є потужним інструментом не лише для фундаментальних, а й практичних розробок, дає змогу встановити зв'язок мутацій з різними генетичними станами, визначає молекулярні механізми росту та розвитку організмів, злоякісних новоутворень. Використовуючи методи генетики та молекулярної біології, молекулярна генетика визначає принципи реалізації генетичної інформації та механізми мутагенезу, відіграє важливу роль у класифікації організмів, створюючи підґрунтя не лише для молекулярної систематики, а й загалом для розвитку біологічної науки. Розуміння молекулярно-генетичних основ усіх живих систем є невіддільною складовою формування наукового світогляду особистості.

Методичні вказівки розроблені відповідно до навчальної програми з позашкільної освіти дослідницько-експериментального напрямку «Молекулярна генетика», затвердженої науково-методичною радою Національного центру «Мала академія наук України» (протокол № 2 від 16.06.2021 р.). Методичні рекомендації призначені для поглиблення знань та проведення лабораторних робіт із курсу «Молекулярна генетика». У виданні подаються сучасні теоретичні та практичні знання з основних розділів молекулярної генетики. Зокрема, докладно розглядається будова нуклеїнових кислот (ДНК і РНК), характеризуються основні молекулярно-генетичні механізми збереження, відтворення та передавання спадкової

інформації, а також організація геномів організмів. У збірці надано практичні рекомендації щодо підготовки та проведення експериментів за основними молекулярно-генетичними методиками, підходів до вивчення каріотипу рослин, методів транскрипції та трансфекції.

Методичні вказівки до курсу «Молекулярна генетика» складаються з трьох розділів, які містять теоретичний матеріал, опис лабораторних робіт та завдання для контролю.

У розділі 1 «Нуклеїнові кислоти. Особливості організації молекулярно-генетичної лабораторії» представлено докладний опис біохімічної структури, рівнів організації та функцій нуклеїнових кислот. Лабораторні роботи передбачають знайомство з особливостями організації, правилами роботи та основним обладнанням молекулярно-генетичної лабораторії, набуття навичок виділення молекул ДНК із різних біологічних об'єктів, що сприяє кращому засвоєнню отриманих знань.

У розділі 2 «Молекулярні механізми генетичних процесів» висвітлено основні молекулярно-генетичні процеси клітини: реплікації, репарації, транскрипції та трансляції, докладно характеризуються ферментні системи, які забезпечують проходження цих процесів (ДНК-полімерази, лігази, ендонуклеази, рестрикції), матеріал викладено з урахуванням особливостей різних систематичних груп, зокрема, прокаріотів та еукаріотів. Розділ містить теоретичне обґрунтування одного з основних методів молекулярної генетики — полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), практичні рекомендації щодо її виконання подаються у лабораторній роботі. Окрім цього, практична частина передбачає проведення реакції лігування, рестрикції та агарозного гель-електрофорезу.

У третьому розділі «Організація геномів. Гени» розглянуто особливості організації генетичного матеріалу для прокаріотів та еукаріотів, надано

докладний опис будови хромосом метафазної пластинки, їх типів, особливостей організації хроматину, каріотипу людини, методів простого та диференційного забарвлення хромосом. Практична частина передбачає набуття навичок визначення каріотипу організмів. Також представлено методики, які дають змогу справляти вплив та модифікувати генетичний матеріал організмів і таким чином вивчати механізми проходження генетичних процесів, властивості та функції хромосом й окремих генів.

Кожний розділ методичних рекомендацій доповнено завданнями для контролювання знань, які сприяють узагальненню та закріпленню вивченого матеріалу.

До методичних вказівок додано теми реферативних повідомлень. За потреби викладач може розширити перелік запропонованих тем. Слухачі повинні мати змогу самостійно обирати тему реферативного повідомлення із наданого переліку чи запропонувати власну, якщо її виконання буде доцільним. Робота над реферативними повідомленнями сприяє зацікавленості та поглибленню знань з молекулярної генетики, здобувачі освіти вчаться працювати з науковою літературою, порівнювати й аналізувати наукові факти, доходити логічних висновків. Також у виданні подається список джерел, використаних під час підготовки методичних рекомендацій, та додатки, необхідні для виконання серії лабораторних робіт.

Видання призначене для вихованців Малої академії наук України та учнів закладів загальної середньої освіти, у яких біологія є предметом поглибленого вивчення. Матеріали можуть бути використані під час проведення занять з біології за шкільною програмою, роботи секцій закладів позашкільної освіти, планування та виконання науково-дослідницьких проєктів та реалізації викладацької діяльності.

Розділ 1



НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

1.1. СТРУКТУРА НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Нуклеїнові кислоти — це макромолекули, що забезпечують збереження, відтворення та передавання генетичної інформації. Нуклеїнові кислоти поділяють на дезоксирибонуклеїнові (ДНК) та рибонуклеїнові (РНК). Мономерами нуклеїнових кислот є нуклеотиди, які складаються з азотистих основ, пентози й залишку фосфорної (фосфатної) кислоти. Азотисті основи, своєю чергою, поділяють на пуринові (аденін, гуанін) і піримідинові (тимін, цитозин, урацил) основи. Для молекули ДНК характерні дві пуринові основи (аденін, гуанін) та дві піримідинові основи (тимін, цитозин).

У молекулі РНК замість тиміну міститься урацил. Інколи у складі нуклеїнових кислот зустрічаються міnorні основи (рідкісні, модифіковані), наприклад, 1-метилурацил, 1-метилгуанін, дигідроурацил тощо. Найбільше міnorних основ виявлено у молекулах тРНК. Для ДНК тварин і рослин характерним є переважання нуклеотидів з аденіном і тиміном, а у бактерій — нуклеотидів із гуаніном і цитозином. Вуглеводневим компонентом нуклеїнових кислот є пентоза, дезоксирибоза для ДНК та рибоза для РНК. Азотисті основи разом із пентозою утворюють нуклеозид. Після приєднання фосфорної кислоти до залишку пентози утворюється нуклеотид. Нуклеїнові кислоти є полярними, а напрямок поліпептидного ланцюга завжди вказується від 5'-кінця (вільний 5'-гідроксил пентози) до 3'-кінця (вільний 3'-гідроксил пентози), тобто 5' → 3'.

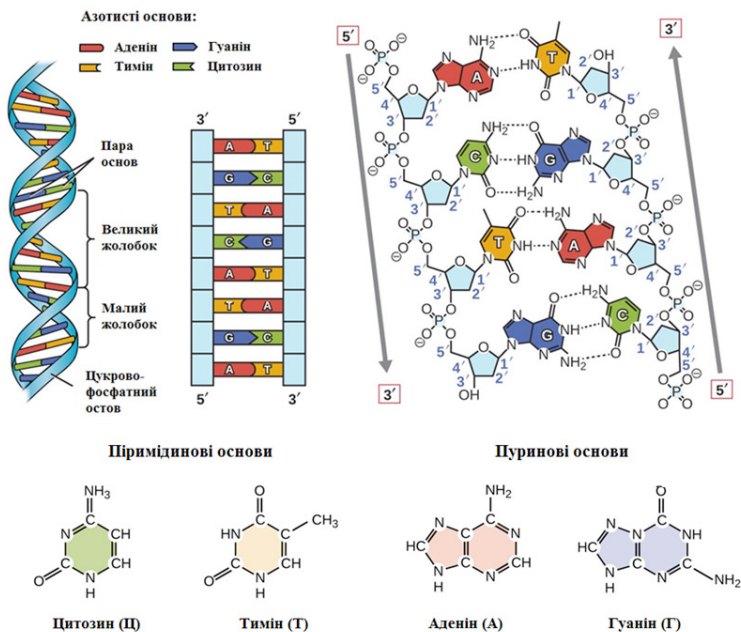


Рисунок 1. Біохімічна структура молекули ДНК.
Пуринові та піримідинові азотисті основи

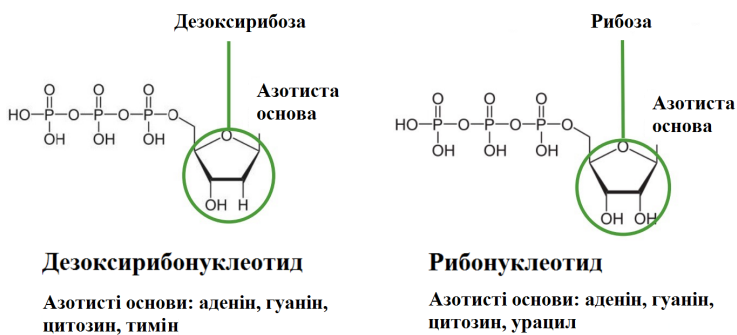


Рисунок 2. Структура дезоксирибонуклеотиду
та рибонуклеотиду

Слід наголосити, що нуклеотиди зустрічаються не лише у складі нуклеїнових кислот, а й можуть перебувати у вільному стані чи входити до складу ферментних систем і таким чином брати участь в енергетичному обміні (АМФ, АДФ, АТФ), біосинтезі глікогену (УТФ, УДФ), гліцерофосфоліпідів (ЦТФ, ЦДФ). Молекула АТФ є однією з головних макроергічних сполук, у разі відщеплення від АТФ фосфорної кислоти вивільняється 32,8–42 кДж енергії, яка використовується для підтримання різних процесів життєдіяльності, зокрема, передавання нервових імпульсів, підтримання температури тіла, скорочення м'язів, активного мембранного транспорту, процесів синтезу тощо.

Нуклеїнові кислоти мають кілька рівнів структурної організації:

- первинна структура — послідовність розміщення нуклеотидів у полінуклеотидному ланцюзі та природа міжнуклеотидних зв'язків;
- вторинна структура (певний ступінь спіралізації) — просторова конфігурація полінуклеотидних ланцюгів;
- третинна структура — суперспіралізована форма нуклеїнових кислот.

1.2. ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕЇНОВА КИСЛОТА (ДНК)

Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) є основним носієм генетичної інформації у всіх живих системах. В еукаріотів ДНК міститься у ядрах клітин, де у поєднанні з білками (гістонами) утворює хромосоми, які завдяки спеціальному забарвленню можна легко побачити під мікроскопом. Також незначна кількість ДНК концентрується у мітохондріях і пластидах, напівавтономних органелах клітини. У прокаріотів (без'ядерних організмів) молекула ДНК локалізується у цитоплазмі клітини у вигляді нуклеоїду (бактеріальна хромосома). Первинна структура молекули ДНК, як і молекули РНК, організована у вигляді лінійного поліпептиду. Вторинна структура ДНК — це подвійна правозакручена спіраль, ланцюги якої розміщені антипаралельно і закручені правильними витками довкола однієї осі. Між аденіном (А) і тиміном (Т) утворюються подвійні водневі зв'язки, а між гуаніном (Г) і цитозином (Ц) — потрійні водневі зв'язки. Ця закономірність отримала назву правила комплементарності.

Головним стабілізаційним фактором подвійної спіралі ДНК є стекинг-взаємодії, коли між комплементарними парами основ відбувається криття π -орбіталей та утворення єдиної π -електронної структури.

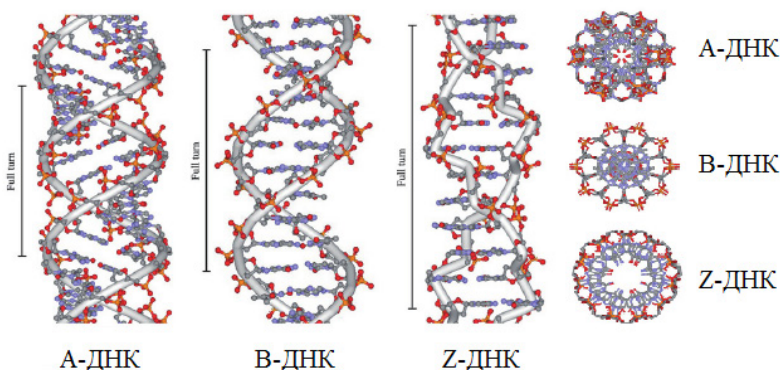


Рисунок 3. Основні конформаційні форми молекули ДНК, правозакручені (А та В форми) та лівозакручена (Z-форма)

Перекриття π -орбіталей формується і внаслідок їх паралельного розміщення у ланцюзі. Найсильніше перекриття π -орбіталей характерне за умови, якщо пуринові основи розміщені під піримідиновими. Коливання вмісту води, йонної сили тощо спричиняє конформаційні зміни молекули ДНК. Виділяють кілька конформаційних форм молекули ДНК: А, В, С (правозакручені) та Z (лівозакручена). Третинна структура передбачає суперспіралізацію кільцевої молекули ДНК у прокаріотів та багаторівневу спіралізацію ДНК у комплексі з гістонами в еукаріотів. Організація геномної ДНК у структурі хроматину (комплексу ДНК і білків гістонів) відіграє вирішальну роль у регуляції транскрипції генів, реплікації, репарації та рекомбінації.

Розміри молекул ДНК варіюються та можуть становити від кількох сотень тисяч до мільйонів пар основ. Наприклад, хромосома 1, яка є найбільшою в геномі людини, має довжину приблизно 249 мільйонів пар основ та кодує від 2000 до 2100 різних генів, тоді як хромосома 21 складається з 48 мільйонів пар основ і містить лише від 200 до 300 генів. У прокаріотів молекули ДНК мають значно менші розміри. Так, нуклеоїд бактерії *Carsonella rudii* утворений молекулою з 159 662 пар основ і 182 генів. ДНК вірусів мають ще менші розміри й мінімальну кількість генів.

1.3. РИБОНУКЛЕЇНОВА КИСЛОТА (РНК)

Рибонуклеїнова кислота (РНК) — це лінійні полінуклеотиди, які за характером своєї структури та біологічних функцій поділяються на кілька типів: рибосомні РНК (рРНК), транспортні РНК (тРНК), інформаційні (іРНК), або матричні РНК (мРНК), малі ядерні РНК, мікроРНК. У деяких вірусів молекули РНК забезпечують збереження і відтворення генетичної інформації. Молекули РНК є одноланцюговими полінуклеотидами, хоча зустрічаються винятки, наприклад — дволанцюгові молекули деяких вірусів (вірусу карликовості рису, вірусів ракових пухлин рослин, реовірусів).

Інформаційна (іРНК), або матрична РНК (мРНК), синтезується в процесі транскрипції, виконує функцію перенесення генетичної інформації, використовується в ролі матриці під час синтезу білка. Первинна структура представлена послідовністю нуклеотидів у молекулі. Вторинна структура характеризується утворенням двоспіральних шпильок у межах одного полінуклеотидного ланцюга між комплементарними парами основ іРНК. У прокаріотів іРНК використовується одразу після синтезу. В еукаріотів спершу синтезується пре-іРНК, яка піддається процесингу, і лише потім використовується як матриця у процесі трансляції. іРНК становить до 5% всієї клітини РНК. Це молекула з нетривалим періодом життя – від кількох хвилин до кількох днів.

Транспортні РНК (тРНК) — це одноланцюгові молекули, які забезпечують перенесення активних форм амінокислот до рибосомального апарату для синтезу білка. Первинна структура містить велику кількість модифікованих основ. Вторинна структура є однотипною для всіх видів і нагадує листок конюшини. Третинна структура доволі компактна і має L-подібну структуру. У структурі тРНК виділяють наступні структурні елементи: псевдоуридинова петля — забезпечує зв'язок із рибосомою; дигідроуридилова петля (D-петля) — взаємодіє із ферментом аміноацилсинтетазою; антикодонова петля — містить антикодон, комплементарний кодону молекули іРНК; акцепторне стебло — найдовша спіралізована структура, до 3'-ОН-групи кінцевого залишку аденіну приєднується амінокислота. Функція додаткової петлі наразі не встановлена. Структура молекули стабілізується за допомогою водневих зв'язків та стекинг-взаємодій. тРНК становить 10–15% всієї клітини РНК.

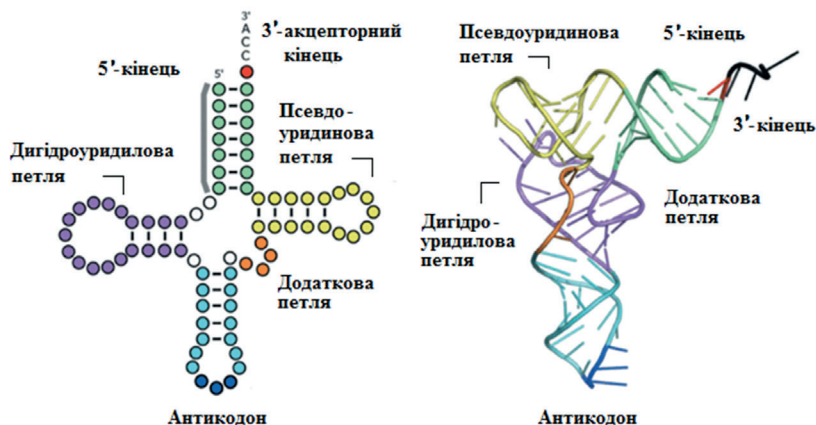


Рисунок 4. Вторинна і третинна структура рРНК

Рибосомна РНК (рРНК) належить до структури рибосом. Для прокаріотів характерні три типи рРНК: 23S, 16S, 5S; для еукаріотів — чотири: 28S, 18S, 5S, 5,8S. Вторинна структура представлена утворенням дволанцюгових шпильок, що становлять приблизно 80–90% усієї клітини РНК.

Малі інтерферуючі РНК (міРНК) — дволанцюгові молекули, розміром 21–28 пар нуклеотидів, які забезпечують контроль за активністю генів у клітинах еукаріотів (явище інтерференції). Функціонування міРНК є важливою умовою захисту клітини від чужорідної генетичної інформації (ретровірусів тощо).

Лабораторна робота № 1 ОРГАНІЗАЦІЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

Мета: ознайомитися з особливостями організації та правилами роботи в молекулярно-генетичній лабораторії, набути навичок роботи з основним лабораторним посудом та обладнанням.

Матеріали та обладнання: піпет-дозатори, культуральні планшети, пробірки типу Eppendorf, центрифуга Eppendorf, чашки Петрі, накінцівники, дистильована вода, зошит, ручка, олівець.

ХІД РОБОТИ

1. Інструктаж з техніки безпеки. Вивчити правила поведінки під час роботи у біологічній лабораторії.

Правила поведінки під час роботи у біологічній лабораторії

1. Загальні положення

1.1. Під час роботи у кабінеті біології будьте обережними, дотримуйтесь порядку й чистоти на робочому місці, а також правил техніки безпеки. Безладність, поспішність, необачність у роботі й порушення правил техніки безпеки можуть призвести до нещасних випадків.

2. Вимоги щодо безпеки перед початком роботи

- 2.1. Чітко з'ясуйте порядок і правила проведення досліду.
- 2.2. Перевіряйте наявність і надійність посуду, приладів та інших предметів, необхідних для виконання завдання.
- 2.3. Звільніть робоче місце від усіх непотрібних для роботи предметів та матеріалів.
- 2.4. Починайте виконувати завдання тільки з дозволу вчителя.
- 2.5. Виконуйте тільки ту роботу, що передбачена завданнями або доручена вчителем. Виконувати роботи, не пов'язані з завданням, забороняється.
- 2.6. Уважно слухайте пояснення вчителя, не відривайтесь від роботи самі й не відвертайте уваги інших.

3. Вимоги щодо безпеки під час виконання роботи

3.1. Для виконання завдання користуйтеся посудом і приладами, виданими вчителем.

3.2. Нагріваючи рідини, тримайте посудину отвором від себе і не спрямовуйте його на сусідів.

3.3. Обережно поводьтеся з гострими предметами (ножицями, препарувальними голками).

3.4. Розбавляючи концентровані кислоти водою, обережно доливайте кислоту у воду, а не навпаки.

3.5. Посуд, у якому проводять досліді з органічними розчинниками, перед заповненням має бути чистим та сухим.

3.6. Не пробуйте хімічні речовини на смак, адже будь-яка з них тією чи іншою мірою є отруйною.

3.7. Не заглядайте в посудину зверху (навіть у пробірку), тому що у випадку виштовхування рідини може статись нещасний випадок.

3.8. Нагріваючи рідини, не залишайте їх без нагляду навіть ненадовго.

4. Вимоги щодо безпеки по закінченні роботи

4.1. Розлиті випадково кислоти або розчини лугів збирайте і зливайте у місця, вказані вчителем.

4.2. По закінченні роботи ретельно вимийте руки з милом.

5. Вимоги щодо безпеки в аварійних ситуаціях

5.1. У разі виявлення несправності установок негайно припиніть роботу і повідомте про це вчителя.

5.2. У випадку потрапляння на шкіру чи одяг будь-яких речовин негайно припиніть роботу і повідомте про це вчителя.

З правилами ознайомлений(на)

(дата)

ПІБ

(підпис)

2. Ознайомитися з лабораторним обладнанням та посудом.

2.1. Вивчити різні типи піпет-дозаторів (самплерів), їх будову, правила роботи з ними. Отримати практичні навички роботи із різними типами піпет-дозаторів.

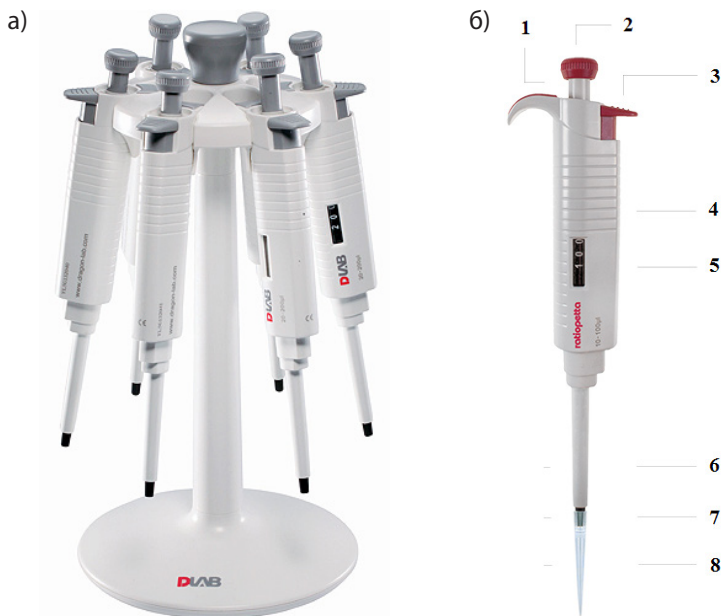


Рисунок 5. Типи піпет-дозаторів на тримачі (а), будова одноканалового піпет-дозатора (б): 1 – упор; 2 – операційний поршень; 3 – поршень для зняття накінцівника; 4 – основа дозатора; 5 – цифровий дисплей; 6 – конус для зняття накінцівника; 7 – посадковий конус для накінцівника, 8 – накінцівник

Правила роботи з піпет-дозатором

1. Надягти накінцівник на посадковий конус піпет-дозатора та встановити необхідний об'єм дозування за допомогою коліщатка на операційному поршні (коліщатко дозування може бути розміщено окремо на основі самплера).

2. Здійснити забір рідини шляхом рівномірного натискання на операційний поршень з упором (натискання потрібно виконати до внесення накінцівника у рідину).

2.2. Занотувати у *табл. 1* призначення кожного структурного елемента піпет-дозатора та здійснити порівняльну характеристику різних типів піпет-дозаторів, дані внести у *табл. 2*.

Таблиця 1. Призначення структурних елементів піпет-дозатора

Структурні елементи	Характеристика, призначення
Упор	
Операційний поршень	
Поршень для зняття накінцівника	
Основа дозатора	
Цифровий дисплей	
Конус для зняття накінцівника	
Посадковий конус для накінцівника	
Накінцівник	

Таблиця 2. Порівняльна характеристика різних типів піпет-дозаторів

Дозування	Виробник	Тип накінцівника	Призначення

2.3. Ознайомитися з різними видами пробірок типу Eppendorf, занотувати правила роботи з ними та їх основні характеристики.



Рисунок 6. Пробірки типу Eppendorf

2.4. Вивчити будову центрифуги, уважно прочитати та запам'ятати правила користування лабораторною центрифугою.



Будова центрифуги:

- 1 – кришка;
- 2 – ротор;
- 3 – замок;
- 4 – екран дисплея;
- 5 – панель управління: старт/стоп, швидкість, температура, відкриття;
- 6 – корпус;
- 7 – логотип та номер;
- 8 – ніжки

Рисунок 7. Будова центрифуги

Основні правила користування лабораторною центрифугою

1. Центрифуга повинна бути встановлена на рівній, горизонтальній і жорсткій поверхні, а простір довкола неї не має містити зайвих предметів, пальників, розчинів тощо.

2. Перед початком роботи слід уважно ознайомитися з інструкцією, що надається до центрифуги виробником, вивчити призначення кожної кнопки на панелі управління та корпусі приладу.

3. Для центрифугування можна обирати лише той тип пробірок, який вказаний виробником. Найзручнішими для використання є вакуумні

пластикові пробірки. Перед використанням потрібно уважно оглянути пробірку, вона не повинна містити жодних дефектів.

4. Перед початком центрифугування необхідно уважно перевірити ротор, він не має містити жодних сторонніх предметів і забруднень.

5. Пробірки у роторі слід розмішувати симетрично (одна навпроти одної), вони повинні мати однакову масу, а їхня кількість має становити парне число. Якщо потрібно центрифугувати непарне число пробірок, то варто доставити ще одну додаткову пробірку із дистильованою водою для врівноваження. Недотримання цих правил може призвести до дуже небезпечних наслідків, дисбалансу ротора, пошкодження центрифуги і серйозного травмування людей, що перебувають поруч.

6. Під час центрифугування пробірки мають бути закриті. Якщо пробірки значно меншого розміру ніж лунки ротора, то потрібно використовувати спеціальні адаптери.

7. Під час роботи кришка центрифуги має бути зачинена. У жодному разі не можна відкривати кришку допоки не скінчиться обертання ротора!

8. За роботою центрифуги потрібно увесь час спостерігати і за появи нехарактерного шуму, підвищеної вібрації, дисбалансу, витікання рідини, диму, запаху гару, перепадів напруги тощо її потрібно негайно зупинити і знеструмити.

9. Під час роботи центрифугу не можна переносити, спиратися на неї, ставити на її поверхню будь-які предмети.

2.5. Користуючись *додатком 1*, необхідно здійснити порівняльну характеристику різних типів центрифуг, дані внести у *табл. 3*. Що спільного та відмінного вдалося виявити? Також слід з'ясувати, якою центрифугою обладнана молекулярно-генетична лабораторія.

Таблиця 3. Порівняльна характеристика центрифуг різних типів

Тип центрифуги, виробник	Частота обертання ротора, об/хв	Кількість пробірок	Максимальний об'єм центрифугату, мл	Примітки

3. Дійти висновків і занотувати їх.

Висновки:

Лабораторна робота № 2 ВИДІЛЕННЯ ПЛАЗМІДНОЇ ДНК

Мета: виділення плазмідної ДНК із клітин *E. coli* за допомогою розчину нейонного детергенту.

Матеріали та обладнання: піпет-дозатори, накінцівники, чашки Петрі, центрифуга, термостат, водяна баня, вортекс, пробірки типу Eppendorf, клітини *E. coli*, 5%-ва сахароза, 50 мМ Tris з pH 8,0, 30 мМ EDTA, 0,75 М NH_4Cl , 0,5%-й Triton X-100, 100 мкг/мл лізоциму, 25 мкг/мл РНКаз А, ізопропанол, 70%-й етиловий спирт, поживне середовище LB, селективні антибіотики, дистильована вода, зошит, ручка, олівець.

ХІД РОБОТИ

1. Підготовчий етап: приготування розчинів для експерименту та на-працювання бактеріальної культури клітин.

Розчин нейонного детергенту для виділення плазмідної ДНК: 5%-ва сахароза, 50 мМ Tris з pH 8,0, 30 мМ EDTA, 0,75 М NH_4Cl , 0,5%-й Triton X-100, 100 мкг/мл лізоциму, 25 мкг/мл РНКаз А.

Культура клітин *E. coli*: колонію бактеріальних клітин *E. coli* вирости у поживному середовищі LB з додаванням селективного антибіотика за температури $+37^\circ\text{C}$ протягом 10–12 год.

2. Культуру клітин центрифугувати протягом 2–3 хв за 10 000 об/хв, надосад видалити.

3. До осаду із бактеріальних клітин внести 500 мкл розчину нейонного детергенту та ретельно перемішати, здійснюючи піпетування та вортексування до утворення гомогенної рідини.

4. Зразок перенести на водяну баню з температурою $+65^\circ\text{C}$ на 5 хв.

5. Отриману суспензію центрифугувати протягом 40 хв за 12 000 об/хв, після цього зі зразка видалити утворений осад.

6. Додати до зразка такий самий об'єм ізопропанолу (1:1) та центрифугувати протягом 20–30 хв за 10 000–12 000 об/хв, надосад видалити.

7. До осаду внести 500 мкл 70%-го етанолу та центрифугувати протягом 20–30 хв за 10 000–12 000 об/хв, надосад видалити, а пробірку з осадом висушити за кімнатної температури.

8. Розчинити осад у 30–50 мкл дистильованої води, підписати (назву плазмід, дату виділення) й зберігати за температури 20 °С.

9. Дійти висновків і занотувати їх.

Висновки:

Лабораторна робота № 3 ВИДІЛЕННЯ ДНК З РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ

Мета: виділення молекул ДНК із рослинного матеріалу (зеленого горошку, плодів суниці, бананів, яблук).

Матеріали та обладнання: пробірки типу Eppendorf, піпетки Пастера, мірні стакани, ваги, мийний засіб, кухонна соль (NaCl), 96%-й етиловий спирт, дистильована вода, фільтр для кави чи бинт / марля, суниці, зелений горошок, банани, яблука, зошит, ручка, олівець.

ХІД РОБОТИ

1. Підготовчий етап: отримання лізис-буферу.

Лізис-буфер: до 50 мл дистильованої води додати 5 г кухонної солі (NaCl) і 5 мл мийного засобу, ретельно перемішати.

2. Подрібнити рослинний матеріал. Для цього зразки (плоди суниці, зеленого горошку, банану тощо) потрібно механічно гомогенізувати за допомогою порцелянаної ступки (тверді плоди можна подрібнити з допомогою кухонної тертки).

3. Отримати рослинний лізат. Додати лізис-буфер до отриманого гомогенізату, ретельно перемішати та зачекати 2–3 хв.

4. Відфільтрувати водну фракцію отриманого розчину в окрему пробірку. Саме в ній міститься ДНК. Це можна зробити за допомогою фільтра для кави, бинта чи марлі.

5. Додати до фільтрату такий самий об'єм (1:1) охолодженого 96%-го етилового спирту й обережно струснути пробірку. Через кілька хвилин на межі двох фракцій можна спостерігати появу білих тяжів (ниток) молекул ДНК.

6. Дійти висновків і занотувати їх.

Висновки:

Лабораторна робота № 4 ВИДІЛЕННЯ ДНК ІЗ КЛІТИН БУКАЛЬНОГО ЕПІТЕЛІЮ

Мета: навчитися виділяти молекули ДНК із клітин букального епітелію слизової оболонки порожнини рота людини.

Матеріали та обладнання: піпет-дозатори, накінцівники, пробірки типу Eppendorf, водяна баня, NaHCO_3 , NaCl , протеїназа К / мезим, 96%-й етиловий спирт, лід, дистильована вода, ручка, олівець.

ХІД РОБОТИ

1. Розглянути мікрофотографії клітин букального епітелію слизової оболонки порожнини рота людини. З'ясувати, в яких клітинних структурах локалізується геномна ДНК, знайти їх на мікрофотографії.

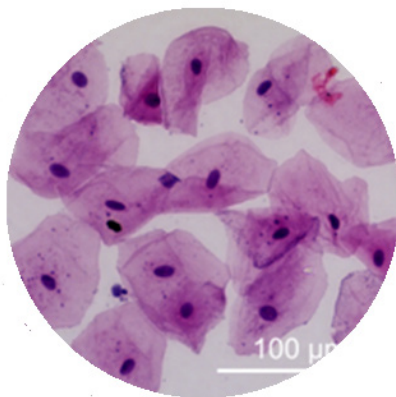


Рисунок 8. Клітини букального епітелію слизової оболонки порожнини рота людини

2. Підготовчий етап: отримання розчинів для експерименту.

Лізис-буфер: до 120 мл дистильованої води додати 5 г харчової соди (NaHCO_3), 1,5 г кухонної солі (NaCl) та 5 мл мийного засобу, перемішати до отримання гомогенізованої маси.

Розчин протеїнази (мезиму): таблетку мезиму розтерти у ступці та розчинити у 1–1,5 мл дистильованої води. Отриманий розчин протягом 10 хв витримати на водяній бані за температури $+37^\circ\text{C}$.

96%-й етиловий спирт: охолодити на льоду чи в холодильнику.

3. Біологічний матеріал у виді клітин слизової оболонки рота отримують шляхом ретельного ополіскування ротової порожнини 3 мл питної води. Для отримання кращого результату перед збиранням клітин потрібно обережно «пожувати» внутрішній бік щік протягом 40–60 с. Зразок зібрати у пробірку.

4. Наступний етап роботи передбачає лізис клітин, зібраних на попередньому етапі. Для цього потрібно до зразка внести 3 мл лізис-буферу та ретельно перемішувати протягом 2–3 хв.

5. У отриманий розчин внести 0,25 мл протеїнази К (чи чайну ложку розчину мезиму) та перенести на водяну баню, нагріту до температури $+56^\circ\text{C}$ (чи до $+37^\circ\text{C}$ — у разі використання розчину мезиму), на 10 хв.

6. Додати до зразка такий самий об'єм (1:1) охолодженого 96%-го етилового спирту, злегка струснути пробірку й трохи почекати. Згодом у пробірці почнуть з'являтися білі тяжі (нитки) молекул ДНК.

7. Дійти висновків і занотувати їх.

Висновки:

ЗАВДАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ

1. Що спільного та відмінного між молекулами ДНК та РНК? Які молекули (ДНК, РНК, білки) можуть бути еволюційно первинними? Відповідь обґрунтувати.

2. Порівняти різні конформаційні форми молекули ДНК, дані занотувати у *табл. 4*.

Таблиця 4. Порівняльна характеристика різних конформацій молекули ДНК

Тип ДНК	A	B	C	Z
Ліво- чи правозакрученість				
Довжина витка спіралі (нм)				
Відстань між нуклеотидами (нм)				
Кількість нуклеотидів на виток				
Особливості, характеристики				

3. Чому під час центрифугування пробірки у роторі мають бути розміщені симетрично (одна навпроти одної) та мати однакову масу?

4. Молекула протеїну комплексу Гольджі має 950 амінокислотних залишків. Визначити масу та довжину гена, що кодує цей протеїн.

5. Чи можна знехтувати лізис-буфером під час виділення ДНК?

6. Чи можна осаджувати молекули ДНК за допомогою дистильованої води? Відповідь обґрунтувати.

7. Порівняти методики виділення ДНК із різних біологічних об'єктів, дані внести у *табл. 5*. Дійти висновків про спільні та відмінні ознаки розглянутих методик. Про що це свідчить? Висновки занотувати.

Таблиця 5. Порівняльна характеристика методик виділення ДНК

Біологічний матеріал			
Лізис-буфер			
Додаткові розчини			
Розчини для осадження ДНК			
Вихід ДНК, колір молекул, особливості			

Висновки:

Розділ 2



МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ГЕНЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ

2.1. РЕПЛІКАЦІЯ ДНК

Існування організмів можливе завдяки численним молекулярно-генетичним процесам, які забезпечують збереження, відтворення та реалізацію генетичної інформації. Перед кожним поділом клітини всіх організмів повинні з надзвичайною точністю реплікувати свою ДНК. Реплікація — це процес подвоєння молекули ДНК. Подвоєння ДНК є напівконсервативним процесом. Це означає, що кожний ланцюг у подвійній спіралі ДНК виступає в ролі матриці для синтезу нового комплементарного ланцюга. Тож новоутворена ДНК має один ланцюг від вихідної молекули, а один — новосинтезований. Точна реплікація геномної ДНК потрібна для успішної проліферації клітин. Швидкість синтезу ланцюга доволі висока і становить приблизно 1000 нуклеотидів за секунду. Для успішної реплікації необхідним є утворення комплексу із ДНК-матриці, ДНК-полімерази, іонів металів та правильно обраного нуклеотиду (dNTP).

ДНК-полімераза — це фермент, який каталізує синтез молекули ДНК шляхом додавання нуклеотидів за принципом комплементарності до 3'-кінця новоутвореного ланцюга, подовжуючи його у напрямку від 5' до 3'. Проте ДНК-полімераза не може самостійно почати синтез нового ланцюга, для цього їй потрібний праймер, до якого можна додати нуклеотиди. Праймери синтезуються іншим ферментом, який називається праймазою.

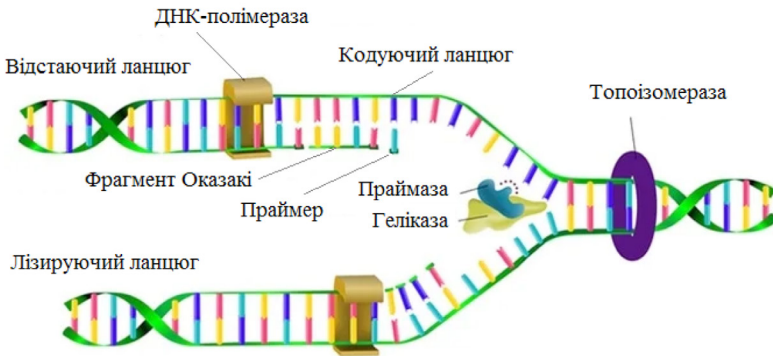


Рисунок 9. Схема реплікації молекули ДНК

ДНК-полімерази забезпечують не лише точний синтез нового ланцюга, а й запобігають приєднанню неправильних нуклеотидів. Переважна більшість ДНК-полімераз, попри відмінності в гомології послідовностей, має схожу тривимірну структуру. Ця структурна гомологія ДНК-полімераз забезпечує відносно незмінний механізм синтезу ДНК, проте різні полімерази все ж мають певні особливості. Більшість ДНК-полімераз прокаріотів та еукаріотів схожі за своєю структурою, що нагадує долоню людини. У будові вони мають активний каталітичний центр та два домени, що його оточують, — рухливі пальці (взаємодіють із матричним ланцюгом ДНК) та великий палець (взаємодіє із малим жолобком подвійної спіралі ДНК, де один ланцюг є матричним, а інший — синтезованим).

У прокаріотів ДНК-полімерази поділяють на три типи: ДНК-полімераза I (або полімераза Корнберга), ДНК-полімераза II, ДНК-полімераза III. Усі три типи полімераз мають дві ферментативні активності, а саме — полімеразну (забезпечує приєднання нуклеотидів до зростаючого ланцюга) та 3'-екзонуклеазну (відщеплення помилково приєднаних нуклеотидів, що дає змогу досягти точності синтезу). ДНК-полімераза I (або полімераза Корнберга) бере участь у видаленні РНК-праймерів на відстаючому ланцюзі та дореплікації ДНК на очищених ділянках. ДНК-полімераза II бере участь у процесі репарації ДНК. ДНК-полімераза III виконує основну каталітичну роль під час реплікації ДНК.

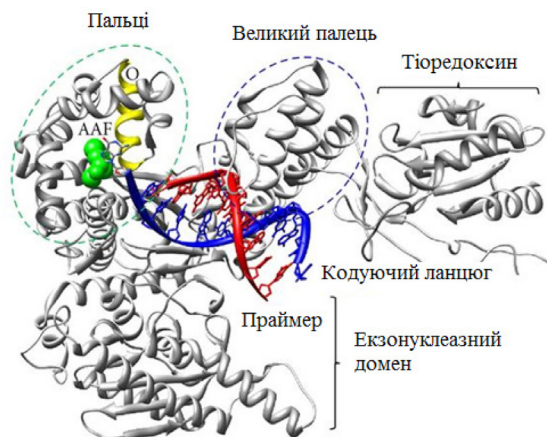


Рисунок 10. Схема будови ДНК-полімерази T7

В еукаріотів зустрічається щонайменше 15 видів ДНК-полімераз: α , β , γ , δ , ϵ , η , ι , κ , ζ , θ , λ , ϕ , σ , μ тощо.

ДНК-полімерази α (альфа), δ (дельта), ϵ (епсилон) — це основні полімерази, які беруть участь у реплікації ядерної ДНК. ДНК-полімераза α : у структурі ферменту виділяють чотири субодиниці, одна з яких виконує структурну роль, інша — ДНК-полімеразну активність та дві — РНК-полімеразну. Отже, ДНК-полімераза α може виступати в ролі праймази, а коли фрагмент досягає розміру, що охоплює приблизно 20 нуклеотидів, синтез продовжують інші полімерази — δ і ϵ . ДНК-полімерази β (бета), η (ета), ι (йота), κ (каппа) — ферменти, які забезпечують репарації ДНК. ДНК-полімераза γ (гамма) довгий час вважалася єдиною мітохондріальною ДНК, проте на сьогодні відомо, що β також наявна в мітохондріях. ДНК-полімераза ζ (дзета) бере участь у синтезі трансlezії (синтез ДНК, попри її пошкодження). Теломераза здійснює реплікацію кінцевих ділянок хромосом (теломерів). Функції інших полімераз вивчені недостатньо.

На основі гомології послідовностей та аналізу кристалічної структури ДНК-полімерази поділяються на сім родин: A, B, C, D, X, Y та RT.

Родина А — ДНК-полімерази, які виконують функцію реплікації та репарації. Ферменти мають два екзонуклеазні домени (3′–5′ та 5′–3′). Приклад полімераз: ДНК-полімераза Т7 (віруси), ДНК-полімераза I (прокаріоти), ДНК-полімерази γ , θ та ν (еукаріоти).

Родина В — ДНК-полімерази, що вирізняються високою точністю реплікації, а також виконують функцію редагування помилок, що виникають під час реплікації ДНК. Приклад полімераз: ДНК-полімераза II (прокаріоти), ДНК-полімерази α , δ , ϵ та ζ (еукаріоти).

Родина С — основні ДНК-полімерази реплікації бактерій. Приклад: ДНК-полімераза III (прокаріоти).

Родина D — ДНК-полімераза археїв. Приклад: ДНК-полімераза D (DP1 / DP2 гетеродимер).

Родина X — ДНК-полімерази, здатні виконувати реплікацію та репарацію. Характерні лише для клітин еукаріотів. Приклад: ДНК-полімерази β , σ , λ , μ та термінальна дезоксинуклеотидилтрансфераза.

Родина Y — ДНК-полімерази, що виконують функції реплікації й репарації, забезпечують транслезійний синтез. Приклад: ДНК-полімерази IV і V (прокаріоти), ДНК-полімерази ι , κ , η (еукаріоти).

Родина RT — ДНК-полімерази, які каталізують процеси реплікації й репарації. РНК-залежні полімерази. Зустрічаються у вірусів, ретровірусів та еукаріотів. Приклад: теломераза, вірус гепатиту В.

У сучасних наукових дослідженнях ДНК-полімерази широко використовуються у маніпуляціях з ДНК *in vitro*, зокрема у клонуванні ДНК, секвенуванні, мутагенезі й, звісно, полімеразній ланцюговій реакції.

2.2. ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) — це поширений лабораторний метод, що використовується для створення багатьох копій (мільйонів або мільярдів!) ділянки ДНК, яка цікавить вченого. ПЛР широко використовується у наукових молекулярно-генетичних дослідженнях, медицині, діагностиці різноманітних захворювань, криміналістиці для встановлення відповідності ДНК з місця злочину і підозрюваних тощо.



Рисунок 11. ПЛР-лабораторія

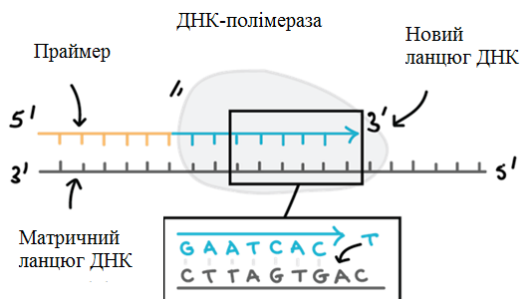


Рисунок 12. Схема полімеразної ланцюгової реакції

Ключовим ферментом ПЛР є термостійка ДНК-полімераза. Найбільш відома термостійка полімераза, яка використовується в ПЛР, — це Taq-полімераза, або ДНК-полімераза I з *Thermus aquaticus*. Вперше Taq-полімераза була виділена з *T. aquaticus*, знайдених у Єлоустонському національному парку в штаті Монтана, США. Спочатку ніхто не передбачав, наскільки цей фермент є важливим, проте згодом саме Taq-полімераза стала запорукою здійснення полімеразної ланцюгової реакції, оскільки вона не інактивується на етапі денатурації. Термостійкість ферменту безпосередньо пов'язана з температурою, за якої організм функціонує. ПЛР здійснила справжню революцію у молекулярній біології та стала незамінним інструментом у біометричних дослідженнях.

Полімеразна ланцюгова реакція — це триступеневий процес, який проводиться повторюваними циклами.

1. Денатурація: реалізується під впливом високих температур +94–96 °C, що спричиняє руйнування водневих зв'язків та розходження ланцюгів дволанцюгової молекули ДНК. Триває від 10 с до 15 хв.

2. Відпал: у середньому відбувається за температури +55 °C (від +40 °C до +70 °C), зниження температури створює умови для гібридизації праймерів із комплементарними послідовностями на одноланцюговій матричній ДНК. Тривалість етапу становить від 30 с до 2 хв.

3. Елонгація — реплікація ДНК-полімеразою матричного ланцюга шляхом додавання нуклеотидів до праймерів, що відбувається за підвищення температури до +72 °C.

Полімеразна ланцюгова реакція виконується у спеціалізованих лабораторіях та за умови суворого дотримання правил. Так, зокрема, ПЛР-лабораторія передбачає наявність трьох ізольованих кімнат.

У першій кімнаті лаборанти здійснюють виділення ДНК.

Друга кімната оснащена спеціалізованими ПЛР-боксами з ультрафіолетовими лампами. Ця кімната потрібна, власне, для проведення самої реакції, тому вона особливо потребує підтримання чистоти.

Аналіз результатів ПЛР відбувається у третій кімнаті. Зазвичай вона розміщена максимально віддалено від двох інших.

2.3. МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ

Транскрипція — це синтез молекули іРНК на матриці ДНК, перший етап експресії генів. Транскрипція відбувається в ядрі клітин еукаріотів або в нуклеоїді у прокаріотів. Процес каталізується РНК-полімеразою. Транскрипція реалізується проходженням трьох послідовних етапів: ініціації, елонгації та термінації.

1. Ініціація — це початковий етап транскрипції, який характеризується зв'язуванням РНК-полімерази з промотором цільового гена. Розкручування подвійної спіралі ДНК у місці зчитування гена.

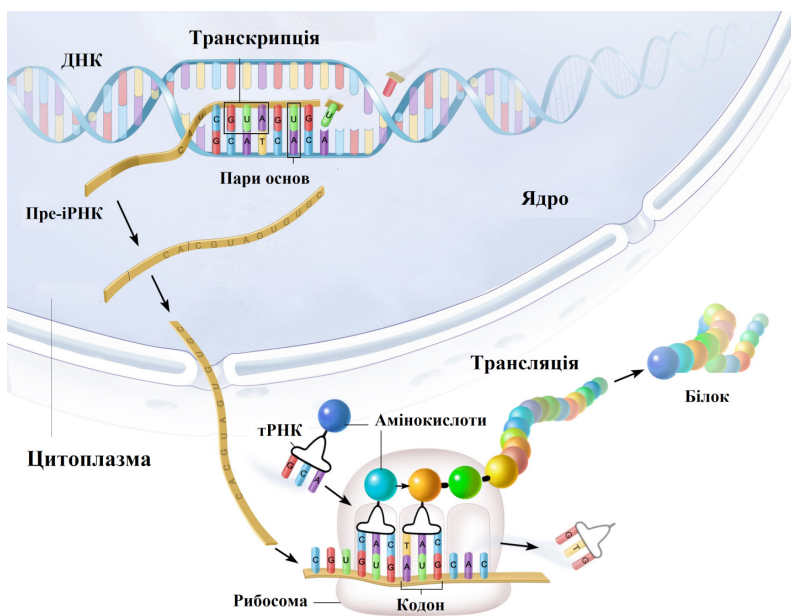


Рисунок 13. Реалізація генетичної інформації в еукаріотів: процеси транскрипції та трансляції

2. Елонгація — РНК-полімераза синтезує іРНК за принципом компліментарності, використовуючи як матрицю один ланцюг ДНК.

3. Термінація — процес завершення транскрипції; відбувається, коли полімераза транскрибує послідовність ДНК, відому як термінатор.

У бактерій іРНК після закінчення транскрипції одразу готова до трансляції, а інколи трансляція починається, коли ще триває транскрипція. В еукаріотів у процесі транскрипції утворюється пре-іРНК, яка проходить процес дозрівання (процесинг) і лише після цього переноситься з ядра у цитоплазму для трансляції (синтез білка).

Трансляція — процес біосинтезу білка, що полягає у переведенні нуклеотидної послідовності матричної РНК (мРНК) в амінокислотну послідовність білка. Це другий етап реалізації генетичної інформації.

2.4. СИСТЕМА РЕПАРАЦІЇ ДНК

Збереження структури молекули ДНК — це не лише головна умова генетичної стабільності, а й запорука протидії злоякісній трансформації клітин. Пошкодження ДНК зумовлюються вбудовуванням неправильних нуклеотидів під час реплікації ДНК та хімічними змінами, спричиненими спонтанною мутацією або під впливом факторів навколишнього середовища, наприклад, радіації тощо. Є кілька механізмів усунення помилок ДНК: пряма реактивація, ексцизійна репарація, посттрансляційна (рекомбінаційна) репарація та системи індукованої репарації (SOS-репарація).

Пряма реактивація (репарація) охоплює зшивання одноланцюгових розривів ДНК-лігазою та руйнування піримідинових димерів, які виникли під впливом ультрафіолетового світла (фотореактивація). ДНК-лігази — це ферменти, які каталізують утворення фосфодиефірних зв'язків у разі одноланцюгових розривів у дволанцюговій молекулі ДНК. ДНК-лігази беруть участь у репарації, а також реплікації та рекомбінації ДНК. Вони мають велику різноманітність амінокислотних послідовностей, молекулярних розмірів та властивостей. Залежно від кофакторної специфічності ДНК-лігази поділяють на ті, що потребують НАД⁺ (зустрічаються лише у клітинах прокаріотів), і ті, що потребують АТФ (характерні для еукаріотів, вірусів, бактерій та археїв). Вірусні АТФ-залежні лігази зазвичай мають невеликі розміри й використовуються як моделі для вивчення каталітично-

го механізму. В еукаріотів, у тому числі й геномі людини, наявні три гени АТФ-залежних ДНК-лігаз: LigI, LigIII, LigIV. Представники родин ДНК-лігаз I та IV зустрічаються у всіх еукаріотів, тоді як ДНК-лігази III обмежені хребетними. ДНК-лігази I (LigI) та IV (LigIV) функціонують виключно в ядрі, тоді як ДНК-лігази III (LigIII) активні як у ядрі, так і в мітохондріях. Обидва типи лігаз мають подібне каталітичне ядро, що складається із мотивів (частин молекули), які необхідні для зв'язування з кофактором, координації йонів металів та реакції лігування. Каталітична область ДНК-лігаз людини складається з трьох доменів: ДНК-зв'язувального домену (DBD), домену нуклеотидилтрансферази (NTD) та домену олігонуклеотиду / олігосахариду (OBD). Також є додаткові некаталітичні домени в N-кінцевій та / або C-кінцевій області каталітичного ядра.

Реакція лігування має три послідовні кроки реалізації.

Перший етап пов'язаний з активацією лігази, що відбувається шляхом перенесення АМФ (аденозин 5'-монофосфату) до активного центру лізини.

Другий етап передбачає перенесення АМФ з лігази на 5'-фосфатну групу на місці одноланцюгового розриву.

На третьому етапі ДНК-лігаза каталізує створення фосфодиефірного зв'язку з супутнім вивільненням вільного АМФ та утворення лігваного продукту.

ДНК-лігази відіграють важливу роль у підтримці генетичної стабільності, тому порушення їх функцій пов'язане з розвитком різних генетичних захворювань. У ссавців дефекти лігування ДНК пов'язані зі збільшенням захворюваності на рак та нейродегенерацію.

Лігази є критичними реагентами у процесах молекулярного клонування та біотехнологічних дослідженнях ДНК, у тому числі й молекулярній діагностиці та методах секвенування тощо.

ДНК-лігази:

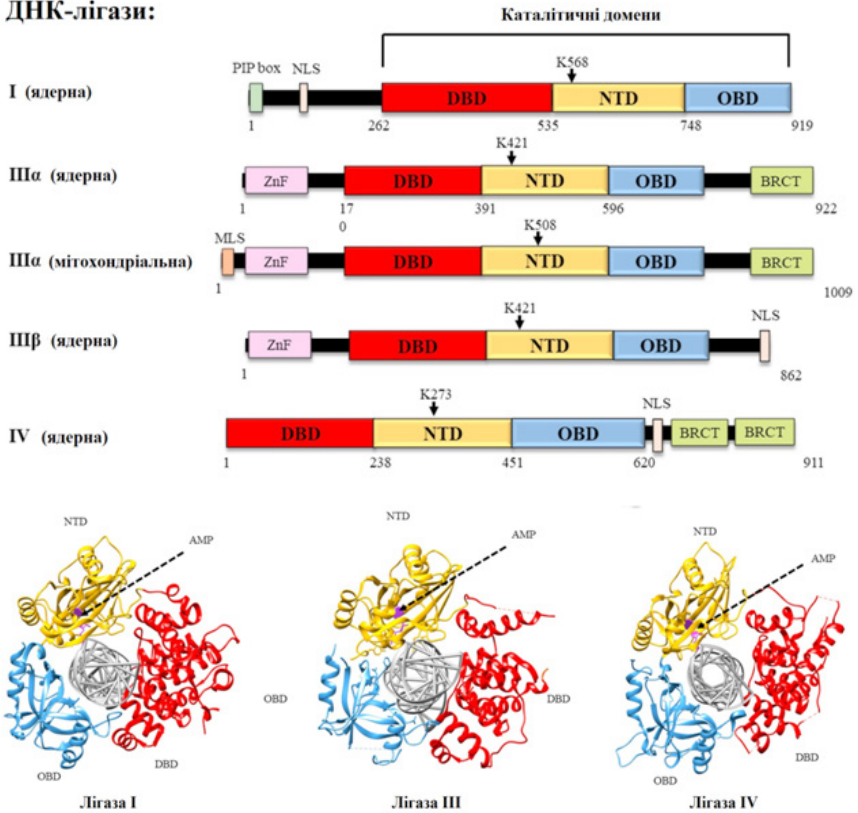


Рисунок 14. ДНК-лігази людини. Схематичне зображення структури та 3D-моделі лігази I, лігази III та лігази IV

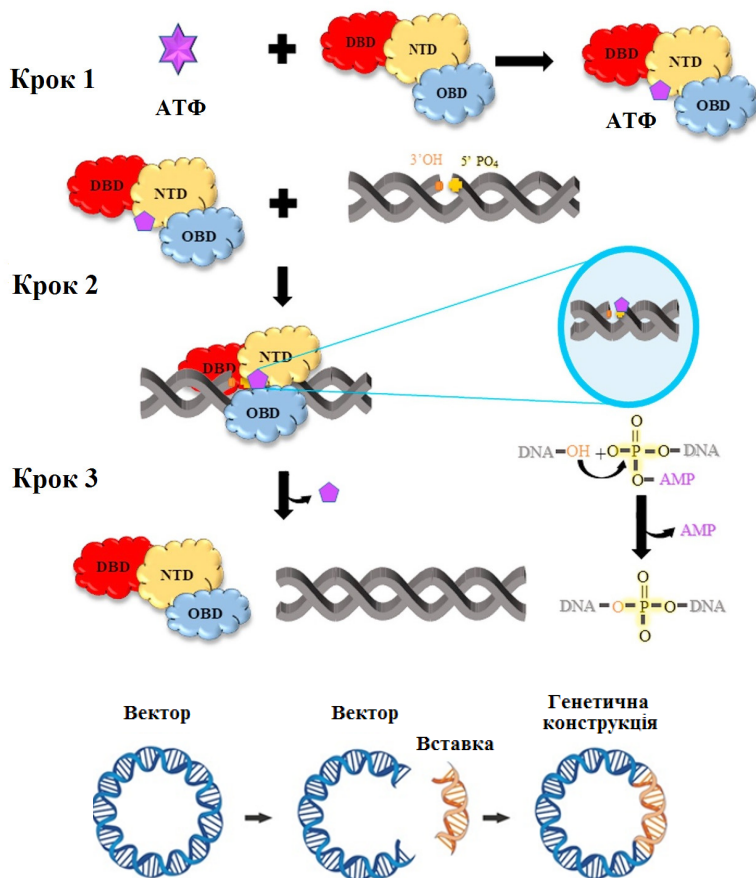


Рисунок 15. Схема реакції лігування та клонування генів з використанням ДНК-лігази T4

2.5. РЕСТРИКЦІЙНО-МОДИФІКАЦІЙНА СИСТЕМА

У процесі еволюції клітини набули здатності передавати генетичний матеріал нащадкам у незміненому стані та захищатися від чужорідної генетичної інформації. Прикладом такого механізму є рестрикційно-модифікаційна система, або RM-система, у бактерій, яка забезпечує руйнування чужорідної молекули ДНК, що потрапила у клітину (бактеріофагів, плазмід тощо). Основну роль у цьому процесі виконують ендонуклеази рестрикції, або рестриктази, які здатні розпізнавати певні специфічні ділянки ДНК (сайти) та розрізати її. Зазвичай сайт розпізнавання складається з 4–8 пар основ, а процес розрізання відбувається двома шляхами — розрізання дволанцюгової молекули ДНК у шаховому порядку паліндрома з утворенням одноланцюгового виступу («липкий» кінець) або розрізання в одному місці на кожній нитці з формуванням «тупих» кінців.

Усі рестриктази поділяють на ферменти I, II, III та IV типів тощо.

Рестриктази I типу складаються з трьох субодиниць — R-субодиниця (каталізує рестрикцію), M-субодиниця (каталізує метилування) та S-субодиниця (забезпечує специфічність розпізнавання сайту рестрикції). Для цього типу рестриктаз характерно неспецифічне розрізання, оскільки гідроліз ДНК відбувається в межах до 1000 нуклеотидів від сайту рестрикції. Прикладом таких рестриктаз є EcoV та EcoK.

Рестриктази II типу містять ферменти двох видів — рестриктазу і метилазу, які функціонують не залежно одна від одної.

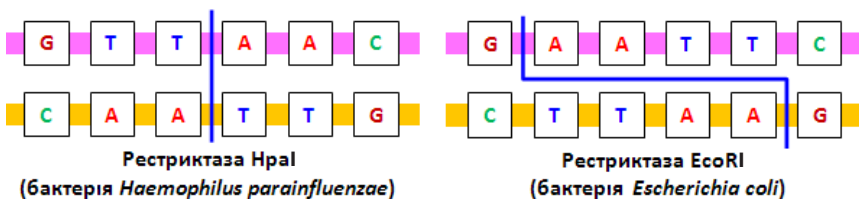


Рисунок 16. Рестриктази, які розрізають молекулу ДНК за принципами «тупих» та «липких» кінців

Особливістю рестриктаз II типу є специфічне розрізання рестрикції всередині сайту чи біля нього. Завдяки цій властивості ферменти широко використовуються в різних молекулярно-генетичних дослідженнях. Прикладом рестриктаз II типу є EcoRI, AluI, HindIII тощо.

Рестриктази III типу мають проміжні властивості ферментів I й II типу, складаються з двох субодиниць, що каталізують реакції рестрикції й метилювання. Гідроліз ланцюгів ДНК відбувається віддалено від сайту рестрикції, в межах 24–26 нуклеотидів.

Рестриктази IV типу здатні каталізувати реакцію лише за умови наявності метильованих, гідроксиметильованих чи глікозил-гідроксиметильованих основ молекули ДНК.

Завдяки властивості специфічного розрізання молекули ДНК рестриктази стали потужним інструментом генетичної інженерії, зокрема — під час клонування генів, картування, розшифрування послідовностей ДНК тощо.

Лабораторна робота № 5 ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ

Мета: підібрати праймери за допомогою вебсерверу Primer-BLAST та ампліфікувати кодуючу послідовність цільового гена шляхом полімеразної ланцюгової реакції.

Матеріали та обладнання: піпет-дозатори, накінцівники, вортекс, пробірки типу Eppendorf, ампліфікатор «5333 MasterCycler Thermal Cycler» (Eppendorf, Німеччина), 10X амонійний буфер, $MgCl_2$, 10 mM dNTP, 10 мкМ праймера (форвард, реверс), ДНК-матриця (25 мкг/мкл), Tag ДНК-полімераза, дистильована вода, ноутбук із доступом до Інтернету, лід, зошит, ручка, олівець.

ХІД РОБОТИ

1. Підбір праймерів для ампліфікації цільової послідовності гена.

1.1. Підбір праймерів здійснюється за допомогою програми Primer-BLAST, розміщеної на сервері NCBI (National Center for Biotechnological Information). Для доступу до сторінки сервера необхідно перейти за покликанням: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

1.2. Спершу потрібно знайти послідовність гена, до якого слід підібрати праймери. Для цього у групі розділів, розташованій біля віконця пошуку, потрібно обрати розділ Gene, а у віконце пошуку вписати назву гена та натиснути на значок пошуку.

1.3. Зайти на сторінку необхідного гена, де потрібно знайти підрозділ mRNA and Protein(s), обрати послідовність іРНК (mRNA) ізоформи, перейти на її сторінку та вибрати режим FASTA, скопіювати послідовність гена у буфер обміну.

1.4. Зайти на сторінку програми Primer-BLAST за покликанням: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Програма дає можливість здійснювати пошук без додаткових налаштувань, тому достатньо вставити скопійовану послідовність гена у віконце пошуку сервера й натиснути на «Get primers», розміщений внизу сторінки.

1.5. Проаналізувати отримані результати та обрати необхідну пару праймерів (форвард, реверс). Занотувати нуклеотидну послідовність праймерів у зошит.

2. Вивчити характеристики температурних циклів ПЛР, скориставшись *табл. 6*.

Таблиця 6. Характеристика температурних циклів ПЛР

Цикли	Температура	Час
Ініціація денатурації	+94 °C	5 хв
Денатурація	+94 °C	30 с
Відпал	+55 °C	45 с
Елонгація	+72 °C	1 хв
Фінальна елонгація	+72 °C	5 хв

3. Здійснити розрахунки та внести компоненти ПЛР (табл. 7) у пробірку типу Eppendorf на 200 мкл.

Таблиця 7. Компоненти ПЛР

Компоненти ПЛР	Реакція 1	Реакція 2
dH ₂ O	36 мкл	
10X амонійний буфер	5 мкл	
MgCl ₂	2,5 мкл	
10 mM dNTP	1 мкл	
10 мкМ праймер 1 (форвард)	1 мкл	
10 мкМ праймер 2 (реверс)	1 мкл	
ДНК-матриця (25 мкг/мкл)	3 мкл	
Таг ДНК-полімераза	0,5 мкл	

Під час роботи Таг ДНК-полімераза має перебувати на льоду.

4. Реакційну суміш ретельно перемішати шляхом піпетування.

5. Пробірку з реакційною сумішшю перенести до ампліфікатора «5333 MasterCycler Thermal Cycler» (Eppendorf, Німеччина) чи альтернативного ампліфікатора з дотриманням таких умов: ініціація денатурації — за температури +94 °C протягом 5 хв; денатурація: +94 °C — 30 с, +55 °C — 45 с, +72 °C — 1 хв 30 с (30 циклів). Фінальну елонгацію проводити за температури +72 °C протягом 5 хв.

Розглянути схему ПЛР (рис. 17) та вказати температуру і час для кожного етапу реакції.

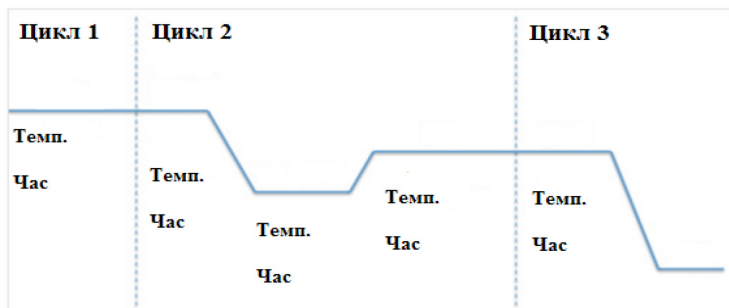
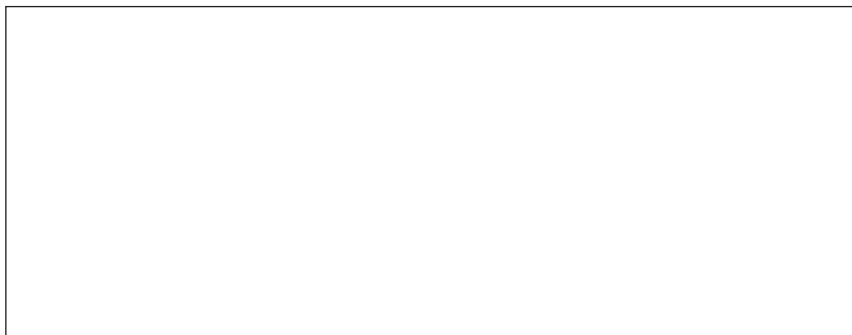


Рисунок 17. Температурні цикли полімеразної ланцюгової реакції

6. Візуалізація результатів за допомогою агарозного гель-електрофору (див. лабораторну роботу № 8). Зафіксувати результати за допомогою фотосистеми. Здійснити аналіз електрофореграми, визначити розмір цільового гена та зарисувати результати.



7. Дійти висновків і занотувати їх.

Лабораторна робота № 6 ЛІГУВАННЯ МОЛЕКУЛ ДНК

Мета: лігування фрагментів ДНК за допомогою ДНК-лігази T4 (Thermo Fisher Scientific, США).

Матеріали та обладнання: піпет-дозатори, накінцівники, пробірки типу Eppendorf, водяна баня, вортекс, плазмідна ДНК (від 0,5 до 1 мкг/мкл), лігаза T4 DNA (Thermo Fisher Scientific, США), буфер лігази 10X / буфер 2X Tango + АТФ, маркер молекулярних мас, лід, дистильована вода, рукавички, ручка, олівець.

ХІД РОБОТИ

1. Здійснити розрахунки реакції лігування, дані занотувати у *табл. 8*.

Таблиця 8. Компоненти реакції лігування молекул ДНК

Компоненти реакції	Реакція 1	Реакція 2
Лінійні фрагменти ДНК (від 0,5 до 1 мкг/мкл)	3 мкл	
Буфер лігази 10X / буфер 2X Tango + АТФ	1 мкл / 1+1 мкл	
Лігаза T4 DNA	1 мкл	
dH ₂ O	5 мкл / 4 мкл	

2. За допомогою піпет-дозатора внести компоненти реакції у пробірку типу Eppendorf. Накінцівник на піпет-дозаторі потрібно змінювати після кожного реактиву. Під час роботи лігаза має перебувати на льоду. Після внесення всіх компонентів у реакційну суміш слід обережно перемішати за допомогою вортексу (чи піпетування).

3. Інкубувати реакційну суміш за кімнатної температури протягом 2–3 год або за температури +16 °C — протягом 12–18 год (залежно від умов реакції час інкубації може бути змінений).

4. Інактивувати ДНК-лігазу T4 шляхом інкубації на водяній бані за температури +65 °C протягом 20 хв.

5. Ефективність реакції проаналізувати за допомогою агарозного гель-електрофорезу. Як маркер молекулярних мас можна обрати O'GeneRuler plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

6. Дійти висновків і занотувати їх.

Лабораторна робота № 7 ЕНДОНУКЛЕАЗИ РЕСТРИКЦІЇ

Мета: розщеплення плазмідної ДНК за допомогою ендонуклеази рестрикції EcoRI (Thermo Fisher Scientific, США).

Матеріали та обладнання: піпет-дозатори, накінцівники, пробірки типу Eppendorf, водяна баня, вортекс, плазмідна ДНК (від 0,5 до 1 мкг/мкл), рестриктаза EcoRI, буфер Tango, лід, дистильована вода, рукавички, зошит, ручка, олівець.

ХІД РОБОТИ

1. Здійснити розрахунки реакції рестрикції, користуючись *додатком 2*. Підібрати відповідний рестрикційний буфер для досягнення 100% каталітичної ефективності ферменту.

2. Внести компоненти реакції у пробірку типу Eppendorf та обережно піпетувати. Накінцівник на піпет-дозаторі потрібно змінювати після кожного реактиву. Під час роботи рестриктаза має перебувати на льоду.

Таблиця 9. Компоненти реакції рестрикції

Компоненти реакції	Реакція 1	Реакція 2
ДНК (від 0,5 до 1 мкг/мкл)	3 мкл	
Буфер 2X Tango/ _____	4 мкл	
Рестриктаза EcoRI/ _____	1 мкл	
dH ₂ O	12 мкл	

3. Реакційну суміш інкубувати за температури +37 °C протягом 1,5–2 год (залежно від умов реакції та каталітичної активності час інкубації може бути змінений).

4. Інактивувати рестриктазу шляхом інкубації на водяній бані за температури +65 °C протягом 20 хв.

5. Ефективність реакції аналізувати за допомогою агарозного геле-електрофорезу. Як маркер молекулярних мас можна обрати O'GeneRuler plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

6. Дійти висновків і занотувати їх.

Лабораторна робота № 8 ЕЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ В АГАРОЗНОМУ ГЕЛІ

Мета: здійснити електрофоретичне розділення фрагментів ДНК та визначити їх молекулярну масу.

Матеріали та обладнання: піпет-дозатори, накінцівники, пробірки типу Eppendorf, камера для агарозного гель-електрофезу, УФ-транслюмінатор, агароза, 40 мМ трис-ацетатного буферу (40 мМ Tris, 20 мМ CH_3COOH , 1 мМ ЕДТА з рН 8,3), GeneRuler 1 kb DNA ladder, ready-to-use (ThermoFisher Scientific, США), буфер для нанесення, фарба для візуалізації ДНК, дистильована вода, рукавички, зошит, ручка, олівець.

ХІД РОБОТИ

1. Уважно розглянути та проаналізувати схему проведення агарозного гель-електрофезу.

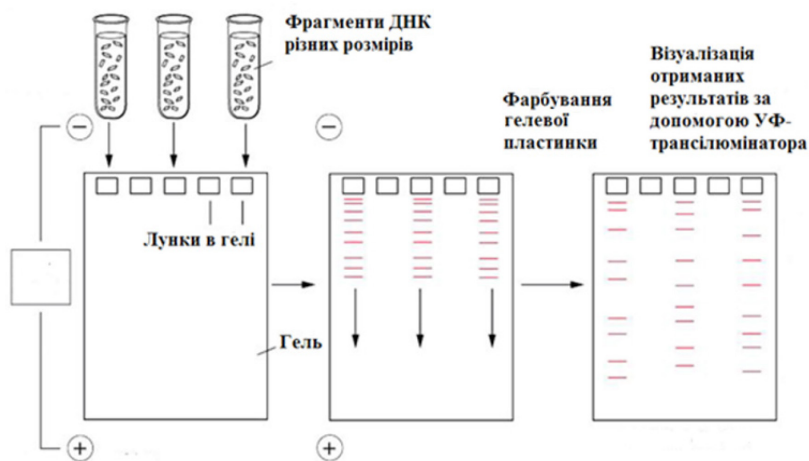


Рисунок 18. Схема проведення агарозного гель-електрофезу

2. Зібрати камеру горизонтального електрофорезу та форму для отримання агарозної пластинки.

3. Підібрати необхідну концентрацію агарозного гелю за даними з *табл. 10*.

Таблиця 10. Концентрація гелю і розділення фрагментів ДНК

Концентрація агарози, %	Розміри фрагментів, т. п. н.
0,6	20 і більше
0,8	9–0,7
1	7–0,5
1,5	4–0,2
2	3–0,1

4. Отримати агарозну пластинку.

4.1. Здійснити розрахунки складу агарозного гелю, дані занотувати у *табл. 11*.

Таблиця 11. Компоненти агарозного гелю

Компоненти агарозного гелю	1%-й гель	
Агароза	0,5 г	
ТАЕ буфер 50X	1 мл	
dH ₂ O	довести до 50 мл	

4.2. Компоненти реакції внести у термостійку колбу та розчинити шляхом нагрівання у мікрохвильовій печі. Агароза має повністю розчинитися (розчин повинен бути прозорий). Працювати потрібно у спеціальних рукавичках чи з тримачами, оскільки колба в результаті нагрівання може бути дуже гарячою.

4.3. Охолодити реакційну суміш за кімнатної температури до +50 °С.

4.4. Залити розплавлений агарозний гель у форму (уникати утворення бульбашок) та встановити гребінки. Залишити за кімнатної температури на 10–15 хв до повного застигання гелю. Потрібно слідкувати, щоб форма була розташована на рівній поверхні.

4.5. Після повного застигання агарозної пластинки слід дістати гребінки та перемістити гель у камеру для електрофорезу із 1X TAE буфером (буфер має повністю покривати гель).

5. До зразка досліджуваної ДНК вносять буфер для нанесення та ретельно піпетують.

6. Зразок вносять у лунки агарозної пластинки. Для визначення розміру фрагментів ДНК поряд вносять маркер молекулярних мас GeneRuler 1 kb DNA ladder, ready-to-use (ThermoFisher Scientific, США), який можна замінити на інший альтернативний варіант.

7. Приєднати електроди до електрофоретичної камери й блоку живлення. Слідкувати за правильним під'єднанням «+» та «-» електродів на камері та блоці живлення! Електрофоретичне розділення фрагментів молекули ДНК здійснити за напруги 5 В/см протягом 40–45 хв.

8. Гелеву пластинку дістати з камери (обережно, вона крихка) та пофарбувати у розчині для візуалізації ДНК (працювати у витяжній шафі!).

9. Гелеву пластинку промити дистильованою водою та детектувати на УФ-трансільюмінаторі (обережно: потрібно користуватися окулярами, що захищають очі від УФ-випромінювання). Отримані результати зафіксувати за допомогою фотосистеми.

10. Зарисувати та проаналізувати отримані результати, визначити розміри фрагментів ДНК відповідно до маркера молекулярних мас GeneRuler 1 kb DNA ladder, ready-to-use (ThermoFisher Scientific, США), порівняти з електрофореграмою на запропонованому прикладі (рис. 19).

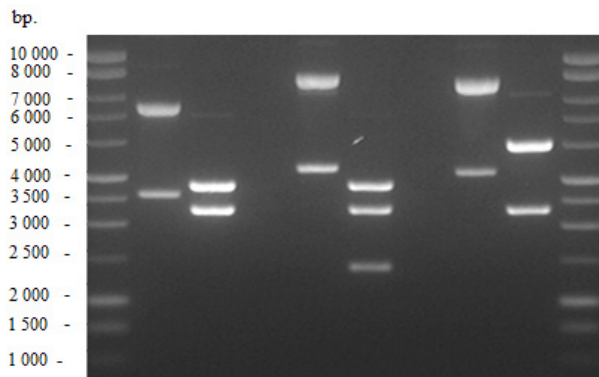


Рисунок 19. Приклад електрофореграми

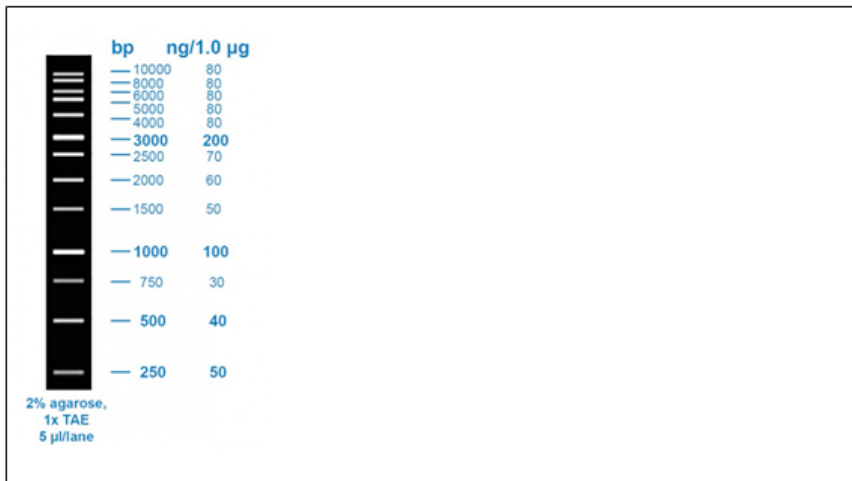


Рисунок 20. Маркер молекулярних мас

11. Дійти висновків і занотувати їх.

ЗАВДАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ

1. Яке значення має ПЛР для розвитку сучасного світу?
2. Здійснити порівняльну характеристику температурних циклів ПЛР, дані занотувати у *табл. 12*.

Таблиця 12. Порівняльна характеристика температурних циклів ПЛР

Етапи	Характеристика	Температура	Значення
Ініціація денатурації			
Денатурація			
Відпал			
Елонгація			
Фінальна елонгація			

3. У процесі транскрипції було синтезовано фрагмент ділянки іРНК з такою нуклеотидною послідовністю:

5' ААУ АГЦ УЦА ААГ УГГ ГЦГ ГГЦ УУА УГЦ ААА УАГ 3'.

Визначити нуклеотидну послідовність ланцюга ДНК, який був використаний як матриця для синтезу.

4. Білок USP1 складається із 2434 амінокислотних залишків. Визначити молекулярну масу білка та гена, що його кодує. З'ясувати, скільки часу триватиме синтез білка.

5. Визначити, які рестриктази із запропонованого списку розрізають молекули ДНК за принципами «тупих» та «липких» кінців.

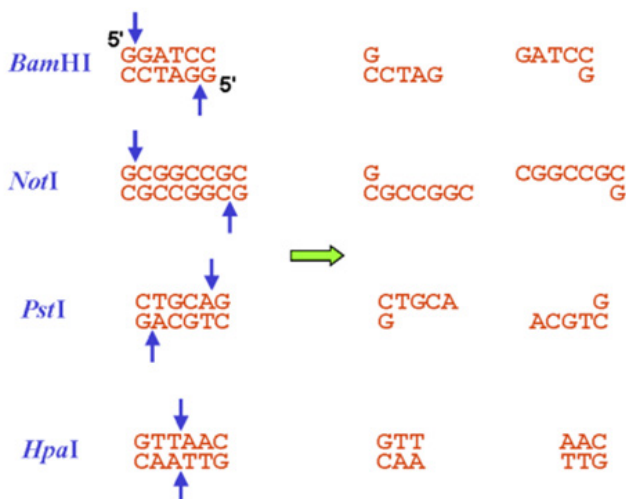


Рисунок 21. Приклади сайтів рестрикції

6. Які типи ДНК-полімераз характерні для прокаріотів та еукаріотів, що спільного та відмінного між ними, яку роль вони виконують у клітинах?

7. Пояснити, яким чином відбувається реакція лігування. Яку роль виконують лігази у репарації ДНК?

8. Чому під час проведення ПЛР використовують термостійку ДНК-полімеразу?

9. За допомогою якого програмного забезпечення можна підібрати праймери для проведення ПЛР? Яку роль виконують праймери у полімеразній ланцюговій реакції?

10. Які молекулярні процеси забезпечують реалізацію генетичної інформації?

11. З якою метою використовують лігази й рестриктази у генетичній інженерії?

12. П'ять різних плазмідних векторів розрізали за допомогою рестриктази KpnI. Розглянути електрофореграму та встановити, скільки сайтів рестрикції KpnI було на кожному плазмідному векторі. Визначити приблизний розмір кожного фрагмента ДНК на електрофореграмі.

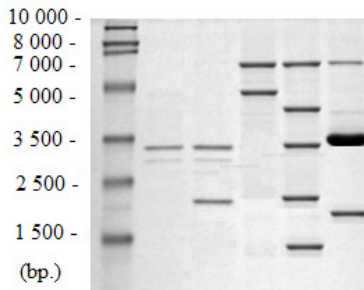


Рисунок 22. Приклад електрофореграми

13. Порівняти різні типи рестриктаз, дані занотувати у *табл. 13*.

Таблиця 13. Порівняльна характеристика типів рестриктаз

Типи рестриктаз	Активність, структура ферменту	Специфічність розпізнавання	Приклади рестриктаз
Рестриктаза I			
Рестриктаза II			
Рестриктаза III			

14. Уважно розглянути схему та з'ясувати, яку реакцію представлено на ній. Визначити, які етапи на ній позначено.

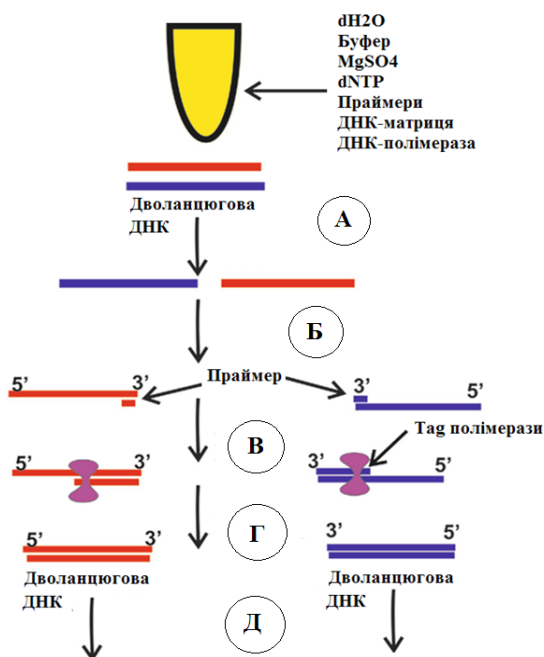


Рисунок 23. Схема реакції для визначення

А _____ Г _____
 Б _____ Д _____
 В _____

15. Згідно з даними Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) здійснити характеристику генів та білків, які вони кодують за пунктами 1, 2, 3, 4.

Гени:

USP1 _____
ZNF217 _____
ABL1 _____
SLC6A4 _____
SMC1A _____
HSPB1 _____
PER1 _____

1. З'ясувати місце локалізації гена _____
2. Вказати кількість нуклеотидів у іРНК гена _____
3. Визначити кількість можливих ізоформ білка _____
4. Ознайомитися з функціями білка та обрати одну із характеристик, яка найбільше йому підходить (табл. 14).

Таблиця 14. Визначення функціональних властивостей білків

Характеристика	Білки
Деубіквітинує білки, запобігає протеасомній деградації	
Контролює експресію генів	
Забезпечує транспорт серотоніну	
Білок теплового шоку, бере участь у відповіді на стрес	
Фосфорилує білки, дерегуляція білка призводить до різних захворювань	
Бере участь у клітинному циклі, мітозі, мейозі, репарації ДНК, ацетилюванні	
Фосфопротеїн, бере участь у регуляції біологічних ритмів	



Розділ 3

ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ. ГЕНИ

3.1. ХРОМОСОМИ. СТРУКТУРА І ФУНКЦІЇ

Геномна ДНК має вигляд кільцевої молекули у прокаріотів та лінійних молекул в еукаріотів. Хромосоми — це нуклеопротейнові структурні елементи ядра клітини, які забезпечують збереження, відтворення та передавання спадкової інформації. Кожний біологічний вид характеризується постійним кількісним та якісним складом хромосом, тобто каріотипом. Морфологію хромосом вивчають у метафазі мітозу клітини. У будові хромосом еукаріотів виділяють первинну перетяжку, що виглядає, як звуження на хромосомі й поділяє її на два плеча: q — довге та p — коротке. У первинній перетяжці розташована центромера — ділянка, яка забезпечує приєднання ниток веретена поділу. Це реалізується за допомогою білкового комплексу, який називається кінетохором. У будові кінетохору виділяють фіброзну корону, зовнішній, центральний та внутрішній кінетохори. Фіброзна корона забезпечує захоплювання мікротрубочок, зовнішній кінетохор зв'язує мікротрубочки, центральний кінетохор відповідає за фіксацію натягування мікротрубочок, а внутрішній — виконує структурну роль. Найпростіша будова кінетохору характерна для дріжджів, а в багатоклітинних організмах вона значно складніша.

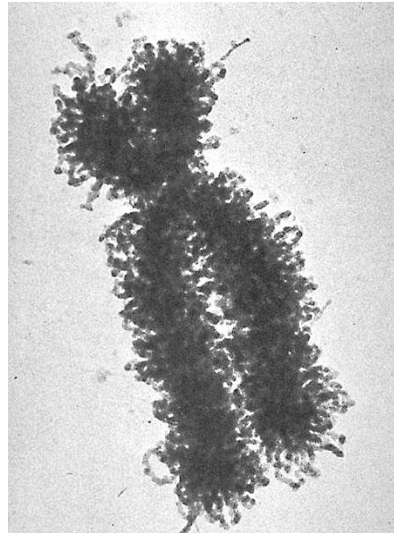
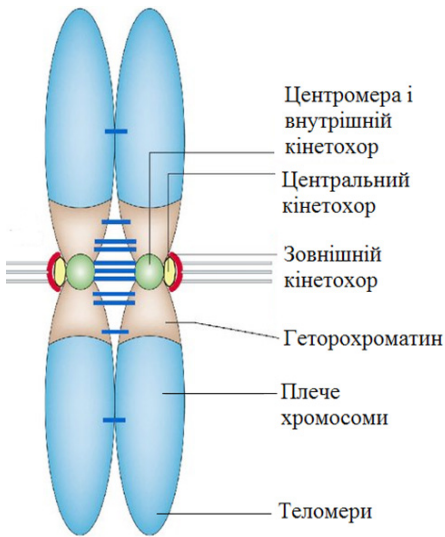


Рисунок 24. Морфологія метафазної хромосоми, її схема та зображення, отримане з допомогою електронної мікроскопії

Залежно від місця розташування первинної перетяжки виокремлюють чотири типи хромосом:

- 1) метацентричні — перетяжка розділяє хромосоми на рівні плечі, що формою нагадують літеру V;
- 2) субметацентричні — хромосоми з плечима неоднакової довжини, що формою нагадують літеру L;
- 3) акроцентричні — хромосоми з одним великим, а іншим — дуже коротким, майже не помітним плечем;
- 4) телоцентричні — паличкоподібні хромосоми з центросомою на проксимальному кінці.

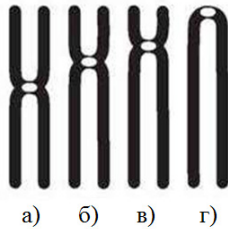


Рисунок 25. Типи хромосом за місцем розташування первинної перетяжки:

- а) метацентричні;
- б) субметацентричні;
- в) акроцентричні;
- г) телоцентричні

Деякі хромосоми містять вторинну перетяжку, яка має вигляд звуженої ділянки. На відміну від первинної перетяжки вторинна не є обов'язковим структурним елементом хромосоми та не містить ділянок для прикріплення веретена поділу. Вторинна перетяжка може відокремлювати кулясте потовщення — супутник. Деякі вторинні перетяжки беруть участь в утворенні ядерцець та мають назву ядерних організаторів. Місце розташування первинної та вторинної перетяжки є постійним для кожної хромосоми, тому є важливою діагностичною ознакою.

Теломери — це ділянки, розташовані на кінцях лінійних хромосом. Вони складаються із послідовності з шести нуклеотидів (TTAGGG), які повторюються тисячі разів. Теломери виконують функцію захисту молекули ДНК. У 1961 році Л. Гейфлік довів, що клітини в культурі помирають після 50–52 поділів. Пізніше було з'ясовано, що це пов'язано зі скороченням теломерів на хромосомах, так звана межа / ліміт Гейфліка. Хромосоми, які втратили теломери, здатні об'єднуватися.

Отже, головними елементами хромосом, що забезпечують їх функціонування, є центромера, необхідна для підтримки сегрегації, точки ініціації реплікації, та теломери, що забезпечують цілісність хромосом.

Інтерфазний хроматин (основна стадія клітини, що не ділиться) поділяють на еухроматин та гетерохроматин, які відображають рівень його ущільнення та активність клітини. Еухроматин — це деконденсовані ділянки, легко доступні для ядерних ферментів, видимі під мікроскопом як світлі ділянки; він переважає у клітинах, які транскрипційно активні. Гетерохроматин виглядає як дрібні темні, сильно спіралізовані ділянки, ступінь конденсації яких майже не змінюється протягом клітинного ци-

клу. Функції гетерохроматину пов'язані з приглушенням експресії генів. Виділяють конститутивний та факультативний гетерохроматин. Конститутивний хроматин — це постійно конденсовані ділянки, розміщені на прицентромерних та теломерних ділянках, де є велика кількість сателітної ДНК. Факультативний хроматин зберігає здатність переходити в еухроматин, ступінь його спіралізації залежить від клітинного циклу, фізіологічних умов. Прикладом факультативного гетерохроматину можуть бути не лише окремі ділянки, а й цілі хромосоми, зокрема X-хромосома.

В інтерфазному ядрі хромосоми важко відрізнити одну від одної. Проте вони займають дискретний простір всередині ядра — так звану територію хромосом. Під час поділу клітини хромосоми конденсуються, що дає можливість легко їх візуалізувати та вивчати каріотип організму. Каріотип — це сукупність кількісних і морфологічних ознак диплоїдного набору хромосом. Каріотип можна зобразити у вигляді ідіограми, що є схемою розташування хромосом від найбільшої до найменшої.

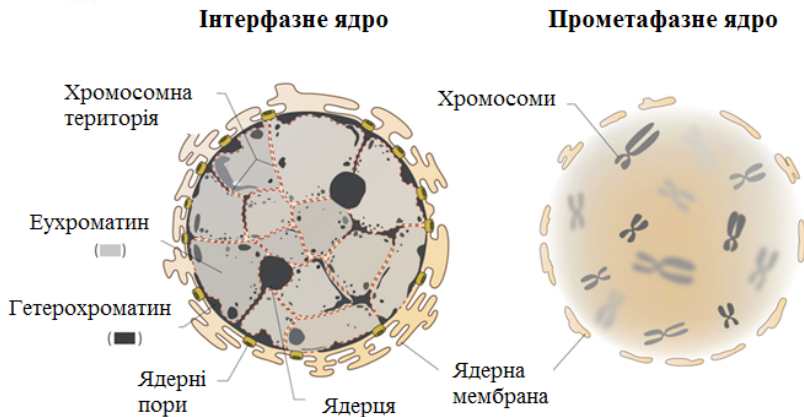


Рисунок 26. Інтерфазне ядро еукаріотів
(еухроматин — світлі ділянки, гетерохроматин — темні ділянки)

3.2. КАРІОТИП ЛЮДИНИ

Каріотип людини складається з 23 пар хромосом, з них 22 — автосомні й 1 пара статевих хромосом: XX (жіночі), XY (чоловічі). Незначна частина генетичного матеріалу зберігається в кільцевих мітохондріальних молекулах ДНК, що складаються з 16 000 пар (позахромосомна спадковість). Розміри хромосом у різних організмів варіюються від 0,2 до 50 мкм, розмір хромосоми людини становить 1,5–10 мкм.

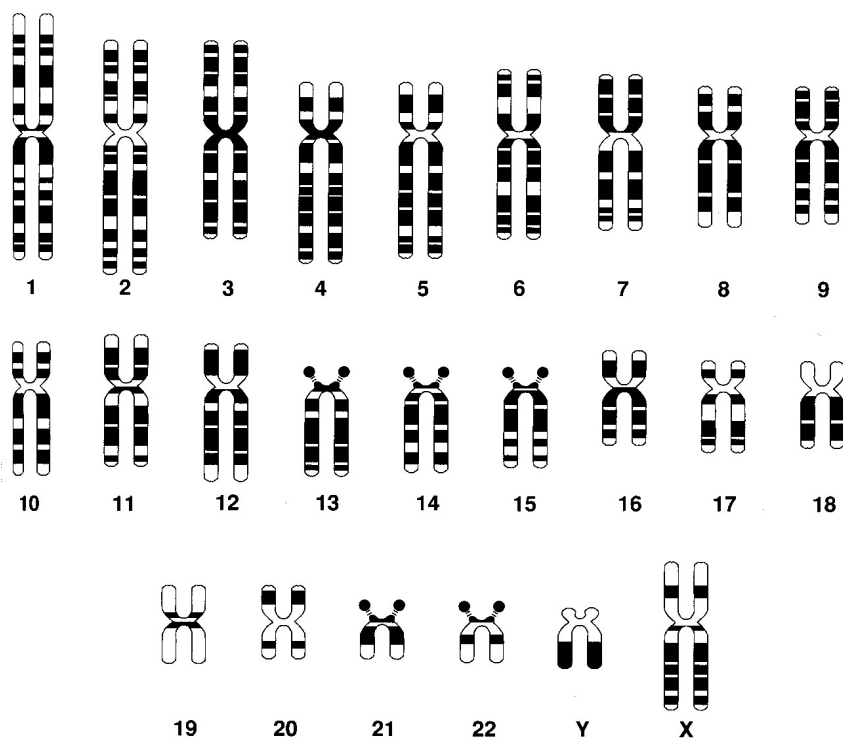


Рисунок 27. Ідіограма каріотипу людини

Найбільш поширеними хромосомними аномаліями людини є синдром Дауна (47 хромосом, трисомія 21-ї пари), синдром котячого крику (делеція короткого плеча 5-ї хромосоми), синдром Патау (47 хромосом, трисомія 13-ї пари), синдром Едвардса (47 хромосом, трисомія 18-ї пари), синдром Клайнфельтера (47 хромосом, зайва статевих хромосом — ХХУ), синдром Шерешевського — Тернера (45 хромосом, відсутня одна Х-хромосома), синдром полісомії за Х-хромосомою (47 хромосом, три статеві хромосоми — ХХХ).

Для простого забарвлення хромосом, яке забезпечує рівномірне та повне забарвлення, використовують барвники Романовського — Гімзи, 2%-й ацетокармін, 2%-й ацетоорсеїн.

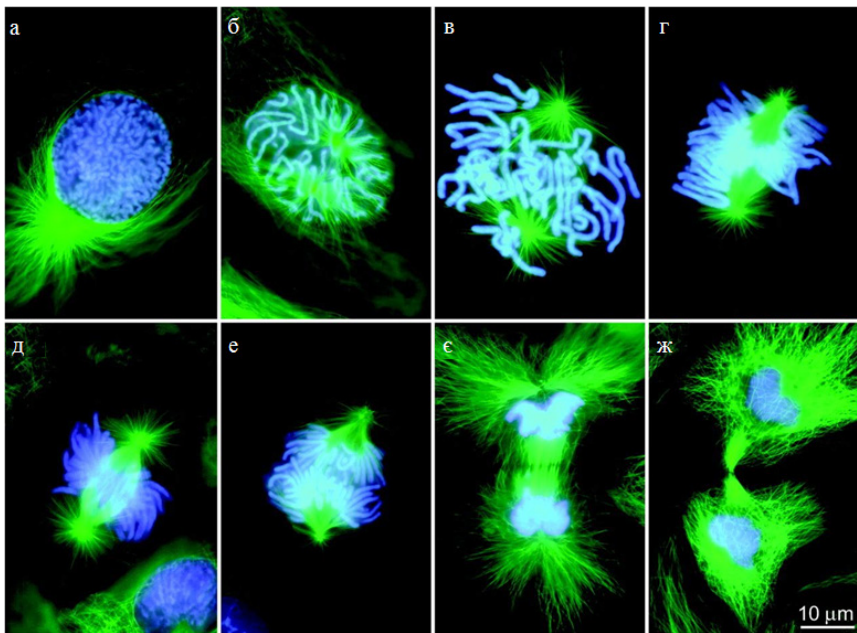


Рисунок 28. Фази мітозу клітин: а — рання профза, б — профза, в — прометафаза, г, д — метафази, е — анафаза, є — пізня анафаза, ж — телофаза. Конфокальна мікроскопія: хромосоми — сині, веретено поділу — зелене

Диференційного забарвлення хромосом можна досягти за допомогою кількох підходів, зокрема Q-методом, G-методом, R-методом, C-методом. Історично першим є Q-метод, який дає можливість побачити АТ-багаті ділянки ДНК (55–65%) за допомогою флуоресцентної мікроскопії. G-метод — найпопулярніший метод диференційного забарвлення хромосом, полягає в отриманні G-смуг (темних смуг) із використанням трипсину і барвника Гімзи. R-метод (зворотне забарвлення) дає змогу ідентифікувати ділянки, розташовані між Q-сегментами або G-сегментами. C-метод використовують для ідентифікації прицентромерних ділянок хромосом. Найпрогресивнішим методом цитогенетичних досліджень є FISH-метод (Fluorescence in situ Hybridization), який дає можливість виявити окремі ділянки, гени як в метафазних, так і інтерфазних хромосомах.

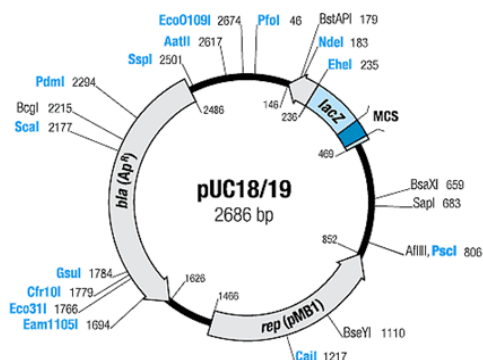


Рисунок 29. Мікрофотографія плазмиди,
отримана за допомогою електронного мікроскопа,
та схематичне зображення плазмідного вектора pUC18/19

3.3. СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНІВ ПРОКАРІОТІВ ТА ЕУКАРІОТІВ

У прокаріотичній клітині геномна ДНК не відділена мембраною від цитоплазми, проте вона з'єднана у компактну структуру — нуклеоїд. До складу нуклеоїду входять ДНК, білки, РНК. Сумарний розмір хромосомної ДНК у кілька разів перевищує розміри клітини бактерії, тому й постала потреба у суперспіралізації генетичного матеріалу. Крім нуклеоїду бактерії мають допоміжний генетичний матеріал у виді плазмід, незалежних позахромосомних спадкових елементів. Плазміди поділяють на кілька типів: F-фактор, або спадковий фактор — плазміди, які відповідають за кон'югацію бактерій, R-фактор — тип плазмід, які забезпечують резистентність бактерій до різних хімічних сполук, у тому числі й антибіотиків, Col-фактор — кодує коліліни, сполуки, здатні призводити до загибелі бактерій різних видів чи в межах одного виду. Функціональною одиницею генетичного матеріалу прокаріотів є оперон — ділянка ДНК, яка складається з промотора, оператора, структурних генів та термінатора. Промотор — це місце початку транскрипції, з якою зв'язується ДНК-залежна РНК-полімераза. Оперон виконує регуляторну роль з участю білка репресора. Термінатор сигналізує про закінчення транскрипції.

В еукаріотів гени складаються з екзонів та інтронів (екзонно-інтронна організація генів). Під час сплайсингу генів інтронні ділянки видаляються, таким чином до зрілої іРНК потрапляють лише екзони. Інтрони не експресуються, проте вони можуть брати участь в організації хроматину, виконувати регуляторну роль тощо. В деяких генах інтронні ділянки можуть становити 90% інформації. Експресія генів у еукаріотів — це складний процес, який регулюється на різних рівнях реалізації генетичної інформації.

Лабораторна робота № 9 ВИЗНАЧЕННЯ КАРІОТИПУ РОСЛИН

Мета: визначити каріотип рослини за допомогою методики давлених препаратів з використанням світлової мікроскопії.

Матеріали та обладнання: світлові мікроскопи, пробірки типу Ерпендорф, чашки Петрі, предметні та покривні скельця, спиртівки, сірники, пінцет, скальпель чи лезо, фільтрувальний папір, ацетоорсеїн, крижана оцтова кислота, 96%-й етиловий спирт, манікюрний лак, дистильована вода, зернівки ячменю, ручка, олівець.

ХІД РОБОТИ

1. Розглянути мікрофотографії, визначити стадії поділу клітини та занотувати характерні особливості кожної фази. Вивчити каріотип рослини на запропонованих мікрофотографіях та зробити припущення щодо виду рослини.

2. Підготовчий етап. Приготування реактивів.

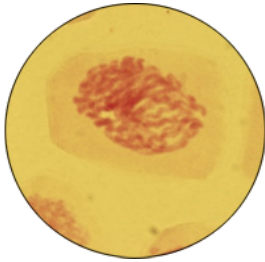
Розчин Карнуа: 3 частини 96%-го етилового спирту й 1 частина крижаної оцтової кислоти (3:1). Працювати у витяжній шафі!

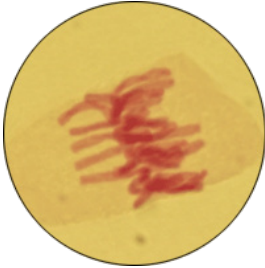
3. Закладення експерименту. Рівномірно розподілити зернівки ячменю на фільтрувальному папері у чашці Петрі та обережно зволожити папір дистильованою водою. Чашку Петрі поставити у термостат з температурою +23–25 °C та тримати протягом 24–48 год.

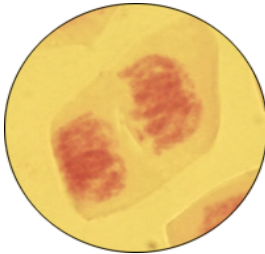
4. Фіксація насінин. Зернівки з чашки Петрі обережно, щоб не пошкодити корінчики, перемістити у пробірку із розчином Карнуа і тримати 2–3 год (за потреби час можна зменшити до 1 год). Це забезпечить збереження ультраструктури клітинних органел.

5. Для видалення залишків фіксувального розчину зернівки двічі промивають 70%-м етиловим спиртом протягом 1 год.

6. Забарвлення ацетоорсеїном (чи іншим ядерним барвником — аце-нафтенном, метиленовим синім тощо). Для цього зернівки з етилового спирту слід перенести у пробірку з ацетоорсеїном та інкубувати від 3 до 24 год (залежно від активності та свіжості приготування барвника).







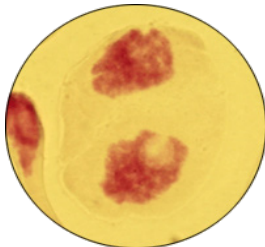


Рисунок 30. Мікрофотографії: мітоз у клітинах рослин

7. Отримання мікропрепарату.

7.1. За допомогою пінцета обережно витягти зернівки із барвника і покласти у центр предметного скла. Використовуючи скальпель чи лезо, відрізати кореневий чохлак на одному із корінців (становить приблизно 0,7–1 мм на кінці корінця), насінину видалити зі скла.

7.2. З допомогою фільтрувального паперу видалити залишки фарби й нанести на кореневий чохлак одну-дві краплі 45%-ї оцтової кислоти (потрібно робити швидко, щоб корінець не пересох).

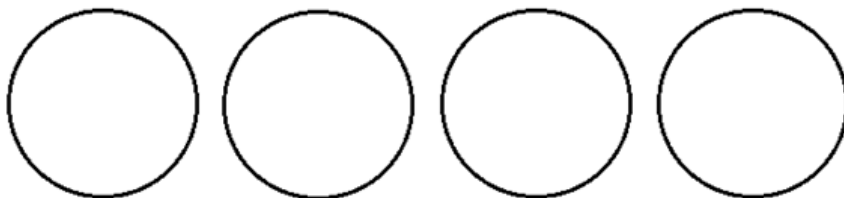
7.3. Прогріти над полум'ям спиртівки зразок та видалити залишки оцтової кислоти. На корінець повторно нанести одну-дві краплі 45%-ї оцтової кислоти та прогріти над полум'ям.

7.4. Залишки оцтової кислоти видалити фільтрувальним папером та ще раз нанести на корінець краплю оцтової кислоти, накрити покривним склом.

7.5. Препарат тримати пінцетом. Обережно, щоб не зламати предметне скло, натиснути на кореневий чохлак дерев'яною паличкою (чи сірником) і таким чином роздавити корінець. Клітини корінця повинні рівномірно розподілятися під покривним склом, цього можна досягти додатковим постукуванням по препарату.

7.6. Краї препарату зафіксувати за допомогою манікюрного лаку, парафіну, гліцерину тощо.

8. Аналіз мікропрепарату під мікроскопом. Зарисувати мітотичні пластинки на різних стадіях поділу. Визначити каріотип рослини.



9. Дійти висновків і занотувати їх.

Лабораторна робота № 10 КОМПЕТЕНТНІ КЛІТИНИ

Мета: отримання компетентних клітин *E. coli* штаму DH5α для трансформації плазмідним вектором.

Матеріали та обладнання: піпет-дозатори, накінцівники, пробірки типу Ерпендорф, водяна баня, центрифуга, середовища LB (1% NaCl, 1% бактотриптон, 0,5% дріжджовий екстракт), 0,1 М CaCl₂ з 15% гліцерину, 96%-й етиловий спирт, *E. coli* штаму DH5α (Stratagene, США), селективні антибіотики, лід, дистильована вода, рукавички, ручка, олівець.

ХІД РОБОТИ

1. Культуру клітин *E. coli* штаму DH5α (Stratagene, США) вирощувати у 30–50 мл середовища LB (1% NaCl, 1% бактотриптон, 0,5% дріжджовий екстракт). До вирощеної культури додати відповідний антибіотик та культивувати протягом 3–5 год за температури +37 °С до досягнення густини OD600 за довжини хвилі 540 нм (5×10^7 клітин/мл).

2. Підготувати лід та виконувати всі зазначені нижче операції лише на льоду.

3. Центрифугувати клітини 20 хв за швидкості 1500 об/хв і температури +4 °С.

4. Супернатант вилучити, до клітин внести охолоджений розчин 0,1 М CaCl₂ з 15% гліцерину, обережно ресуспендувати та залишити на льоду на 1–2 хв.

5. Клітини центрифугувати 20 хв за швидкості 1500 об/хв.

6. Супернатант видалити, а до осаду внести 3 мл охолодженого розчину 0,1 М CaCl₂ з 15% гліцерину та інкубувати 20 хв на льоду.

7. Клітини розфасувати у мікропробірки й зберігати за температури –80 °С.

8. Дійти висновків і занотувати їх.

Лабораторна робота № 11 ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ПРОКАРІОТІВ

Мета: трансформувати клітини *E. coli* штаму DH5 α плазмідним вектором pGlo шляхом теплового шоку.

Матеріали та обладнання: піпет-дозатори, накінцівники, пробірки типу Ерпендорф, центрифуга, водяна баня, мікрохвильова піч, шпателі Дригальського, УФ-трансілюмінатор, спиртівки, захисні окуляри від УФ, компетентні клітини, селективний антибіотик, ваги, поживне середовище LB (1% NaCl, 1% бактотриптон, 0,5% дріжджовий екстракт), плазмідний вектор pGlo, агар, лід, дистильована вода, ручка, олівець.

ХІД РОБОТИ

1. Підготовчий етап. Приготування поживного середовища.

1.1. Здійснити розрахунки для приготування рідкого та агаризованого поживного середовища LB (чи NB).

Таблиця 15. Компоненти рідкого поживного середовища

Компоненти поживного середовища	Розрахунки на 100 мл	Розрахунки на ____
LB (чи NB)	2,5 г (для NB — 1,3 г)	
dH ₂ O	до 100 мл	

Таблиця 16. Компоненти агаризованого поживного середовища

Компоненти поживного середовища	Розрахунки на 100 мл	Розрахунки на ____
LB (чи NB)	2,5 г (для NB — 1,3 г)	
Агар	2 г	
dH ₂ O	до 100 мл	

1.2. Внести компоненти у термостійку колбу та довести до кипіння за допомогою мікрохвильової печі (потрібно слідкувати, щоб усі компоненти розчинилися у воді).

1.3. До охолодженого агаризованого середовища (приблизно +50 °С), додати селективний антибіотик, ретельно перемішати, залити у чашки Петрі й залишити на 10–15 хв, щоб середовище застигло.

Працювати потрібно біля полум'я спиртівки, щоб зберегти стерильні умови та не допустити контамінації!

2. Розморозити компетентні клітини на льоду, розфасувати по 50–70 мкл та внести 2–3 мкл (від 0,5 до 1 мкг/мкл) плазмід, піпетувати.

3. Залишити на льоду на 30 хв.

4. Зразок швидко перемістити на водяну баню з температурою +42 °С на 90 с, а потім знову швидко повернути на лід на 2–3 хв.

5. Внести до клітин 400 мкл рідкого поживного середовища та помістити у термостат з температурою +37 °С на 40 хв.

6. Центрифугувати зразок 5 хв за швидкості 1000 об/хв. Надосад видалити, залишивши лише 30–50 мкл та осад клітин, обережно піпетувати.

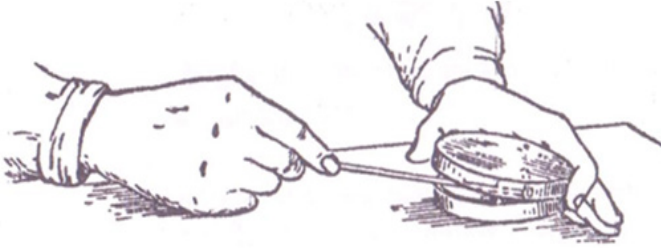


Рисунок 31. Висівання бактеріальної культури
на агаризоване поживне середовище

7. Висіяти клітини на агаризоване поживне середовище в чашці Петрі за допомогою шпателя Дригальського. Чашку закрити й підписати, вказавши назву експерименту, дату, прізвище дослідника. Працювати біля полум'я спиртівки.

8. Чашку Петрі залишити у термостаті за температури $+37^{\circ}\text{C}$ на 10–12 год.

9. Проаналізувати отримані колонії під УФ-транслюмінатором.

Під час роботи з УФ-транслюмінатором необхідно використовувати окуляри, які захищають від УФ.

10. Дійти висновків і занотувати їх.

Лабораторна робота № 12

ТРАНСФЕКЦІЯ КЛІТИН ЕУКАРІОТІВ

Мета: трансфікувати еукаріотичну лінію клітин плазмідним вектором рEGFP із флуоресцентним тагом та отримати мікропрепарати трансфікованих клітин для флуоресцентної / конфокальної мікроскопії.

Матеріали та обладнання: конфокальний чи флуоресцентний мікроскоп, CO₂-інкубатор, ламінарний бокс, пробірки типу Eppendorf, чашки Петрі, 96%-й етиловий спирт, еукаріотична лінія клітин, плазмідний вектор рEGFP, DAPI, PBS, пеніцилін (50 од/мл), стрептоміцин (100 мкг/мл), середовище Ігла в модифікації Дульбекко DMEM (ThermoFisher Scientific, США), 10%-ва ембріональна сироватка великої рогатої худоби (FBS), середовище CitiFluor™ AF1, прозорий лак для нігтів, дистильована вода, ручка, олівець.

ХІД РОБОТИ

1. Еукаріотичну лінію клітин культивувати на покривних скельцях у чашці Петрі в середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко DMEM (ThermoFisher Scientific, США), з додаванням 10%-ї ембріональної сироватки великої рогатої худоби (FBS), пеніциліну (50 од/мл), стрептоміцину (100 мкг/мл) за умов вологості камери 95%, 5% CO₂ за температури +37 °С до досягнення 70–80% конфлюентності.

2. Приготування реакційної суміші: 3 мкг рEGFP розчинити у 200 мкл DMEM та додати відповідний об'єм PEI (3:1, мкл PEI / мкг ДНК), ретельно вортексувати (чи піпетувати) та залишити за кімнатної температури на 20–30 хв.

3. Реакційну суміш рівномірно внести у чашку Петрі з культурою клітин та продовжити інкубацію протягом 24–48 год.

4. Отримання мікропрепаратів: покривні скельця з культурою клітин обережно дістати з чашки Петрі та промити за допомогою розчину PBS. У пробірку внести 16 мкл розчину для заключення CitiFluor™ AF1 та 4 мкл 4X розчину DAPI, перемішати, нанести на предметне скло й покласти зверху покривне скло з клітинами (клітинами до покривного скла).

Зачекати, поки відбудеться полімеризація розчину, краї скла зафіксувати за допомогою прозорого лаку для нігтів.

5. Мікропрепарат вивчати за допомогою флуоресцентної чи конфокальної мікроскопії. Результати зафіксувати за допомогою фотосистеми та проаналізувати ефективність трансфекції: знайти на зображенні ядро клітини, зробити припущення про місце локалізації трансфікованого флуоресцентного білка, порівняти результати із прикладами на *рис. 32*.

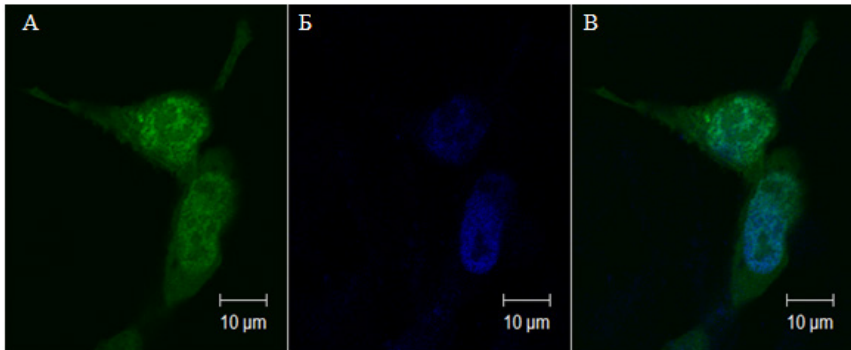


Рисунок 32. Трансформація лінії клітин HEK293T плазмідним вектором rEGFP (А, зелене). Ядра клітин, забарвлені за допомогою DAPI (Б, синє). Перекриття зображень (В). Конфокальна мікроскопія, $\times 100$

6. Дійти висновків і занотувати їх.

ЗАВДАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ

1. Що таке хромосома? Назвати головні структурні елементи хромосом, що забезпечують їх функціонування.
2. Що таке каріотип? Скільки хромосом у каріотипі людини?
3. Порівняти структурні елементи кінетохору, дані занотувати у *табл. 17*.

Таблиця 17. Порівняльна характеристика структурних елементів кінетохору

Структурні елементи кінетохору	Локалізація	Структура	Функції
Фібозна корона			
Зовнішній кінетохор			
Центральний кінетохор			
Внутрішній кінетохор			

4. Що відмінного та спільного між інтерфазним та метафазним ядром?
5. Яка різниця між простим та диференційним забарвленням хромосом? За допомогою яких барвників можна досягти простого забарвлення хромосом? Які є види диференційного забарвлення хромосом?
6. Що відбудеться з хромосомою, яка втратила центромеру під час мітозу клітини?
7. Чи є обов'язковим структурним елементом вторинна перетяжка та чи можна її вважати діагностичною ознакою для хромосоми?
8. Визначити каріотип рослини за мікрофотографією. За якою клітиною це можна зробити? Пояснити свій вибір.

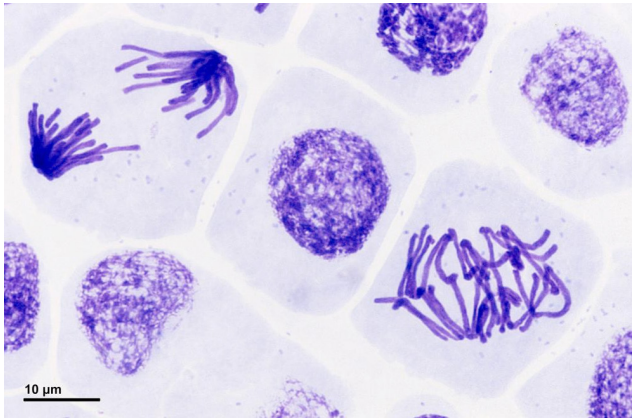


Рисунок 33. Мікрофотографія каріотипу рослин

9. З чим пов'язано існування межі / ліміту Гейфліка?
10. Що таке компетентність клітин? Яка різниця між природною та штучною компетентністю?
11. Порівняти різні типи плазмід, заповнити *табл. 18*.

Таблиця 18. Властивості різних типів плазмід

Назва плазміди	Властивості та функції
F-фактор або спадковий фактор	
R-фактор	
Col-фактор	

12. Які фактори геному бактерій забезпечують формування резистентності до антибіотиків? До чого може призвести неконтрольоване вживання антибіотиків?

13. Що спільного та відмінного в організації генів прокаріотів та еукаріотів?

14. Ген GFP широко використовується в різних молекулярно-генетичних дослідженнях. З якою метою?

15. Поясніть метод трансформації прокаріотів методом теплового шоку.

16. Що є функціональною одиницею генетичного матеріалу прокаріотів?

17. Охарактеризувати будову та властивості структурних елементів оперона прокаріотів, дані занотувати у *табл. 19*.

Таблиця 19. Структурні елементи оперона

Структурні елементи	Будова	Локалізація	Функції
Промотор			
Оператор			
Ген-регулятор			
Структурні гени			
Термінатор			

18. Яку роль у геномі еукаріотів виконують інтрони? Чи правомірно інтронні ділянки називати «сміттевою ДНК»?

19. Пояснити механізм отримання рекомбінантних білків медичного призначення.

ТЕМИ РЕФЕРАТИВНИХ ПОВІДОМЛЕНЬ

1. Історія розвитку молекулярної генетики в Україні.
2. Молекулярна генетика — досягнення та перспективи розвитку.
3. Сучасні молекулярно-генетичні підходи до лікування спадкових захворювань.
4. Картування генів за допомогою ендонуклеаз рестрикції.
5. Молекулярно-генетичні методи у діагностиці захворювань людини.
6. Редагування геному. Перспективи лікування спадкових захворювань.
7. Молекулярно-генетичні механізми природи старіння.
8. Експресія генів у різних культурах клітин.
9. Оптимізація реакції лігування для різних генів.
10. GFP-технологія: методологія та застосування у дослідженні генів.
11. Технології отримання РНК-вакцин.
12. Метод ПЛР у діагностиці захворювань.
13. Мутагени навколишнього середовища та механізми репарації ДНК.
14. Технологія CRISPR/Cas9 і редагування геному.
15. Порівняльна характеристика методів виділення геномної ДНК із рослинного матеріалу.
16. Прорив у науці: секвенування геному людини.
17. Молекулярно-генетичні методи у криміналістиці.
18. Геномні бібліотеки. Методи отримання та значення.
19. Молекулярні механізми генетичної рекомбінації.
20. Модифікаційна мінливість у рослин.
21. Молекулярно-генетичні методи у вивченні еволюції організмів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Буйдін В. В. Молекулярна біологія : навчальний посібник. Полтава : ПНПУ, 2011. 98 с.
2. Гоженко А., Козирєв А., Цебржинський О., Гоженко О., Жуков В. Основи молекулярної біології та персональна геноміка фізичних і психічних здібностей людини : навчальний посібник. RSW. Одеса : Бидгощ, 2017. 340 с.
3. Лабораторні центрифуги. URL: https://ukranalitika.com.ua/goods/tsentrifugi/?SECTION_CODE=tsentrifugi (дата звернення: 10.12.2022).
4. Медична генетика : підручник для вузів / В. М. Запорожан, Ю. І. Бажора, А. В. Шевеленкова, М. М. Чеснокова. Одеса : Одес. держ. мед. ун-т, 2005. 260 с.
5. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія : підручник. Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. 384 с.
6. Тоцький В. М. Генетика : підручник. Одеса : Астропринт, 2008. 712 с.
7. Центрифуга Eppendorf. URL: <https://chemtest.com.ua/tsentryfuha-5427r> (дата звернення: 28.08.2022).
8. Abou H., Garavís M., González C., Damha M. J. I-Motif DNA: Structural Features and Significance to Cell Biology. *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46, № 16. P. 8038–8056.
9. Albert P., Zhang T., Semrau K., Rouillard J., Kao Y., Wang C. et al. Whole-chromosome paints in maize reveal rearrangements, nuclear domains, and chromosomal relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. № 116. P. 1679–1685.
10. Alkan C. Genome-wide characterization of centromeric satellites from multiple mammalian genomes. *Genome Res.* 2011. № 21. P. 137–145.
11. Antonenko S., Telegeev G. Inhibition of USP1, a new partner of Bcr-Abl, results in decrease of Bcr-Abl levels in K562 cells. *Experimental oncology.* 2020. Vol. 42, № 2. P. 109–114.
12. Berg M., Giguere D., Dron J. etc. Targeted sequencing reveals expanded genetic diversity of human transfer RNAs. *RNA Biol.* 2019. Vol. 16, № 11. P. 1574–1585.
13. Bujnicki J. M. Molecular Phylogenetics of Restriction Enzymes. *Restriction Enzymes.* New York : Springer, 2004. Vol. 14. P. 63–93.
14. Dey P. Polymerase Chain Reaction: Principle, Technique and Applications in Pathology. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology.* 2018. Vol. Jun. P. 201–211.
15. DLab micropipettes. URL: <https://granum.ua/en/dlab-micropipettes> (дата звернення: 24.10.2022).

16. Epigenetic-Aging-Signature for Buccal Swabs. URL: <https://www.cygenia.com/our-assays/epigenetic-age/epigenetic-aging-signature-buccal-swabs> (дата звернення: 28.10.2022).
17. Falconer E., Lansdorp P. M. Strand-seq: a unifying tool for studies of chromosome segregation. *Semin. Cell Dev. Biol.* № 24. P. 643–652.
18. Federley R., Romano L. DNA Polymerase: Structural Homology, Conformational Dynamics, and the Effects of Carcinogenic DNA Adducts. *Journal of Nucleic Acids*. 2010. № 12. P. 457176.
19. García-Ramos J., Galindo-Murillo D., Guzmán F., Ruiz-Azuara L. Metal-based drug-DNA interactions. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 2013. Vol. 57, № 3. P. 160–174.
20. Gersbach C., Gaj T., Barbas C. III Synthetic Zinc Finger Proteins: The Advent of Targeted Gene Regulation and Genome Modification Technologies. *Acc Chem Res*. 2014. Vol. Aug, № 8. P. 2309–2318.
21. Ghaffaripour S., Karimizadeh R., Mohammadi M. Karyotypes and evaluation of studies in some genotypes of hull-less barley. *Turkish Journal of Field Crops*. 2011. Vol. 16, № 2. P. 245–250.
22. Hearn R., Arblaster P. Laboratory Exercise DNA Extraction Techniques for Use in Education. *Biochemistry and molecular biology education*. 2010. Vol. 38, № 3. P. 161–166.
23. Ha T., Kozlov A., Lohman M. Single-molecule Views of Protein Movement on Single-Stranded DNA. *Annu. Rev. Biophys.* 2012. № 41. P. 295–319.
24. Handel E. M., Cathomen T. Zinc-finger nuclease based genome surgery: it's all about specificity. *Curr. Gene Ther.* 2011. Vol. 11. P. 28–37.
25. Hansel-Hertsch R., Di A., Balasubramanian S. DNA G-Quadruplexes in the Human Genome: Detection, Functions and Therapeutic Potential. *Nat. Rev. Mol. Cel Biol.* 2017. Vol. 18, № 5. P. 279–284.
26. Horton J., Liebert K., Bekes M., Jeltsch A., Cheng X. Structure and substrate recognition of the Escherichia coli DNA adenine methyltransferase. *J. Mol. Biol.* 2006. № 358. P. 559–570.
27. Hu J., Wu M., Jiang L., Zhong Z., Zhou Z., Rujiralai T., et al. Combining Gold Nanoparticle Antennas with Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer (smFRET) to Study DNA Hairpin Dynamics. *Nanoscale*. 2019. Vol. 10, № 14. P. 6611–6619.
28. Kai W., Guo W., Yang Z., Yan H., Zhang W., Zhou B., et al. Structure and size variations between 12A and 12D homoeologous chromosomes based on high-resolution cytogenetic map in allotetraploid cotton. *Chromosoma*. 2010. № 119. P. 255–266.

29. Kurnaz A. Techniques in Genetic Engineering CRC. Press is an imprint of the Taylor & Francis Group, an informa business, 2015. P. 346.
30. Lin Z., Xie Y., Nong W., Ren X., Li R., Zhao Z. Formation of artificial chromosomes in *Caenorhabditis elegans* and analyses of their segregation in mitosis, DNA sequence composition and holocentromere organization. *Nucleic Acids Research*. 2021. Vol. 49, № 16. P. 9174.
31. Liu X., Sun S., Wu Y., Zhou Y., Gu S., Yu H., et al. Dual-color oligo-FISH can reveal chromosomal variations and evolution in *Oryza* species. *Plant J*. 2019. № 101. P. 112–121.
32. Loenen W. A., Raleigh E. A. The other face of restriction: modification-dependent enzymes. *Nucleic Acids Res*. 2014. Vol. 42. P. 56–69.
33. Lou Q., Zhang Y., He Y., Li J., Jia L., Cheng C. Single-copy gene-based chromosome painting in cucumber and its application for chromosome rearrangement analysis in *Cucumis*. *Plant J*. 2014. № 78. P. 169–179.
34. Lu G., Duan J., Shu S. et al. Ligase I and ligase III mediate the DNA double-strand break ligation in alternative end-joining. *PNAS February*. 2016. Vol. 113, № 5. P. 1256–1260.
35. McNulty S. M., Sullivan B. A. Alpha satellite DNA biology: finding function in the recesses of the genome. *Chromosome Res*. 2018. № 26. P. 115–138.
36. Meng Z., Zhang Z., Yan T., Lin Q., Wang Y., Huang W., et al. Comprehensively characterizing the cytological features of *Saccharum spontaneum* by the development of a complete set of chromosome-specific oligo probes. *Front. Plant Sci*. 2018. Vol. 9. P. 1624.
37. Miga K. H. Telomere-to-telomere assembly of a complete human X chromosome. *Nature*. 2020. № 585. P. 79–84.
38. Minchin S., Lodge J. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays Biochem*. 2019. Vol. 63, № 4. P. 433–456.
39. Molecular mechanism of DNA replication. URL: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/replication/a/molecular-mechanism-of-dna-replication> (дата звернення: 24.10.2022).
40. Nurk S. HiCanu: accurate assembly of segmental duplications, satellites, and allelic variants from high-fidelity long reads. *Genome Res*. 2020. Vol. Sept. P. 1291–1305.
41. PCR protocol, PCR steps. URL: <https://www.genscript.com/pcr-protocol-pcr-steps.html> (дата звернення: 28.10.2022).
42. Sallmyr A., Rashid I., Bhandari S. Human DNA ligases in replication and repair. *DNA Repair*. 2020. № 93. P. 102908.

43. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1161 p.
44. Smith Y., B. Pharm. DNA Replication and Repair. URL: <https://www.news-medical.net/life-sciences/DNA-Replication-and-Repair.aspx> (дата звернення: 05.11.2022).
45. Sudmant P. H. Diversity of human copy number variation and multicopy genes. *Science*. 2010. № 330. P. 641–646.
46. Urnov F. D., Rebar E. J., Holmes M. C., Zhang H. S., Gregory P. D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 2010. Vol. 11. P. 636–646.
47. Wang W., Cortes J. E., Tang G., Khoury J. D., Wang S., Bueso-Ramos C. E., et al. Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*. 2016. № 127. P. 2742–50.
48. What is biotechnology. Plasmid. URL: <https://www.whatisbiotechnology.org/index.php/science/summary/plasmid/> (дата звернення: 25.10.2022).
49. What is chromatin, heterochromatin and euchromatin? URL: <https://www.mechanobio.info/genome-regulation/what-is-chromatin-heterochromatin-and-euchromatin/> (дата звернення: 14.10.2022).
50. Yu X.-H., Wang X.-H., Yang Q.-H. Genetic diversity and phylogenetic relationship of *Saccharum spontaneum* L. with different ploidy levels based on SRAP markers. *Sugar Tech*. 2019. № 21. P. 802–814.
51. Zhou R., Yang O., Déclais A., Jin H., Gwon G., Freeman A. et al. Junction Resolving Enzymes Use Multivalency to Keep the Holliday junction Dynamic. *Nat. Chem. Biol.* 2019. Vol. 15, № 3. P. 269–275.
52. Zhu H., Gao F. Regulatory Molecules and Corresponding Processes of BCR-ABL Protein Degradation. *J Cancer*. 2019. Vol. 10, № 11. P. 2488.

СПИСОК ІЛЮСТРАЦІЙ

- C. 9 Рис. 1. Адаптовано з:
Structure and Function of DNA. Biochemistry of the Genome. URL:
<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/structure-and-function-of-dna> (дата звернення: 24.10.2022)
- C. 9 Рис. 2. Адаптовано з:
Nucleic Acids. URL: <https://www.lecturio.com/concepts/nucleic-acids/>
(дата звернення: 30.10.2022)
- C. 11 Рис. 3. Адаптовано з:
Different conformations adopted by DNA. URL: https://www.researchgate.net/figure/Different-conformations-adopted-by-DNA_fig1_256544992 (дата звернення: 13.11.2022)
- C. 13 Рис. 4. Адаптовано з:
RNA Structure. URL: <https://www.guyhowto.com/rna-structure-types/>
(дата звернення: 03.11.2022)
- C. 16 Рис. 5. Адаптовано з:
DLab micropipettes. URL: <https://granum.ua/en/dlab-micropipettes>
(дата звернення: 24.10.2022)
- C. 18 Рис. 6. Адаптовано з:
Molecular Biology Essentials. URL: <https://www.thermofisher.com/ua/en/home/products-and-services/promotions/life-science/molecular-biology-essentials.html?icid=WB36115> (дата звернення: 24.07.2022)
- C. 19 Рис. 7. Адаптовано з:
Центрифуга Eppendorf. URL: <https://chemtest.com.ua/tsentryfuha-5427r>
(дата звернення: 28.08.2022)
- C. 26 Рис. 8. Адаптовано з:
Epigenetic-Aging-Signature for Buccal Swabs. URL: <https://www.cygenia.com/our-assays/epigenetic-age/epigenetic-aging-signature-buccal-swabs> (дата звернення: 28.10.2022)
- C. 31 Рис. 9. Адаптовано з:
Smith Y., B. Pharm. DNA Replication and Repair. URL: <https://www.news-medical.net/life-sciences/DNA-Replication-and-Repair.aspx> (дата звернення: 05.11.2022)
- C. 32 Рис. 10. Адаптовано з:
DNA Polymerase: Structural Homology, Conformational Dynamics, and the Effects of Carcinogenic DNA Adducts. URL: <https://www.hindawi.com/journals/jna/2010/457176/fig4/> (дата звернення: 22.10.2022)

- C. 34 Рис. 11. Адаптовано з:
ПЛР-лабораторія. URL: <https://suspilne.media/33931-plr-laboratoria-v-kremencuci-otrimala-dozvil-vid-mozu/> (дата звернення: 22.11.2022)
- C. 34 Рис. 12. Адаптовано з:
Molecular mechanism of DNA replication. URL: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/replication/a/molecular-mechanism-of-dna-replication> (дата звернення: 24.10.2022)
- C. 36 Рис. 13. Адаптовано з:
Transcription. Dictionary of Genetics Terms. URL: <https://nci-media.cancer.gov/pdq/media/images/761782.jpg> (дата звернення: 12.09.2022)
- C. 39 Рис. 14. Адаптовано з:
Sallmyr A., Rashid I., Bhandari S. Human DNA ligases in replication and repair. *DNA Repair*. 2020. № 93. P. 102908. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8727047/> (дата звернення: 13.11.2022)
- C. 40 Рис. 15. Адаптовано з:
Sallmyr A., Rashid I., Bhandari S. Human DNA ligases in replication and repair. *DNA Repair*. 2020. № 93. P. 102908. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8727047/> (дата звернення: 13.07.2022)
- C. 41 Рис. 16. Адаптовано з:
Рестрикція ДНК. URL: https://ksuonline.kspu.edu/pluginfile.php/77960/mod_resource/content/1/mb.pr7.pdf (дата звернення: 27.10.2022)
- C. 46 Рис. 17. Адаптовано з:
PCR protocol, PCR steps. URL: <https://www.genscript.com/pcr-protocol-pcr-steps.html> (дата звернення: 28.10.2022)
- C. 52 Рис. 18. Адаптовано з:
Геномний аналіз. URL: <https://ppt-online.org/48198> (дата звернення: 09.10.2022)
- C. 55 Рис. 19. Адаптовано з:
Introducing Plasmid DNA Fingerprinting in the Quality Control of pDNA Vaccine. URL: https://www.researchgate.net/figure/Restriction-profiling-of-plasmids-gWiz-blank-gWizHbs-preparations-Afollowing-digestion_fig2_284899747 (дата звернення: 24.11.2022)
- C. 55 Рис. 20. Адаптовано з:
O'GeneRuler DNA Ladder. URL: <https://www.fishersci.es/shop/products/fermentas-o-generuler-ready-to-use-50-bp-dna-ladder/10558740> (дата звернення: 14.11.2022)

- C. 58 Рис. 21. Адаптовано з:
Генетична інженерія і методи молекулярної генетики. URL: <https://narodna-osvita.com.ua/637-genetichna-nzhenerya-metodi-molekul-yaranoi-genetiki.html> (дата звернення: 18.10.2022)
- C. 59 Рис. 22. Адаптовано з:
Introducing plasmid DNA fingerprinting in the quality control of pDNA vaccine. URL: <https://www.thefreelibrary.com/Introducing+plasmid+D-NA+fingerprinting+in+the+quality+control+of+pDNA...-a0323258179> (дата звернення: 13.09.2022)
- C. 60 Рис. 23. Адаптовано з:
Dey P. Polymerase Chain Reaction: Principle, Technique and Applications in Pathology. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. 2018. Vol. Jun. P. 201–211. URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-8252-8_20#Fig1 (дата звернення: 06.10.2022)
- C. 63 Рис. 24. Адаптовано з:
Chromosomal Nature-Before, During and After Gene Activation. URL: http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Gene_Expression_II13-Chromosomal_Nature_Before_During_and_After_Gene_Activation.htm (дата звернення: 11.11.2022)
- C. 64 Рис. 25. Адаптовано з:
Types on metaphase chromosomes based on location of centromere. URL: https://www.researchgate.net/figure/1-Types-on-metaphase-chromosomes-based-on-location-of-centromere_fig1_285770355 (дата звернення: 23.10.2022)
- C. 65 Рис. 26. Адаптовано з:
What is chromatin, heterochromatin and euchromatin? URL: <https://www.mechanobio.info/genome-regulation/what-is-chromatin-heterochromatin-and-euchromatin/> (дата звернення: 14.10.2022)
- C. 66 Рис. 27. Адаптовано з:
Ідіограма каріотипу людини. URL: <http://www.araucaria2000.cl/biologia/IDIO2.JPG> (дата звернення: 14.11.2022)
- C. 67 Рис. 28. Адаптовано з:
Cytoskeleton and Cell Motility. URL: https://www.researchgate.net/figure/A-to-H-Fluorescence-micrographs-of-mitosis-in-fixed-newt-lung-cells-stained-with_fig5_51938774 (дата звернення: 18.11.2022)

- C. 68 Рис. 29. Адаптовано з:
(Ліве) What is biotechnology. Plasmid. URL: <https://www.whatisbiotechnology.org/index.php/science/summary/plasmid/> (дата звернення: 25.10.2022).
(Праве) Mengistu Endris. Isolation, cloning and transformation studies of Glucan binding protein (GBP) from *Streptococcus mutans*. URL: https://www.researchgate.net/figure/ector-pUC-18-Ligation-The-digested-vector-was-used-to-insert-the-amplified-product-in_fig1_236143042 (дата звернення: 25.10.2022)
- C. 71 Рис. 30. Адаптовано з:
Клітинний цикл. URL: <https://studfile.net/preview/7102770/page:14/> (дата звернення: 28.10.2022)
- C. 77 Рис. 31. Адаптовано з:
Методичні вказівки до лабораторних робіт з дисципліни «Основи технічної мікробіології». URL: <http://eco-paper.kpi.ua/images/documents/metodichki/eco/1k/9065techmicrobio.pdf> (дата звернення: 19.10.2022)
- C. 79 Рис. 32. З особистого архіву С. В. Антоненко
- C. 81 Рис. 33. Адаптовано з:
Microscope image of cells in various stages of mitosis. URL: <https://teachmephysiology.com/biochemistry/cell-growth-death/mitosis/> (дата звернення: 19.11.2022)
- C. 92–94 Додаток А. Лабораторні центрифуги. URL: https://ukranalitika.com.ua/goods/tsentrifugi/?SECTION_CODE=tsentrifugi (дата звернення: 10.12.2022)
- C. 95–96 Додаток Б. Адаптовано з:
Характеристика рестриктази EcoRI. Інформаційний лист від виробника. URL: <https://www.thermofisher.com/search/browse/category/ua/en/90220140/enzymes+and+inhibitors> (дата звернення: 30.11.2022)

ДОДАТКИ

Додаток А

ТИПИ ЛАБОРАТОРНИХ ЦЕНТРИФУГ



Центрифуга лабораторна CM-8 MICROmed

Напруга — 220 В

Частота — 50 Гц

Швидкість обертання ротора — 4000 об/хв

Максимальний фактор поділу — 900 г

Максимальний об'єм центрифугату — 12 мл

Кількість встановлюваних мікропробірок:

6×2 мл, 6×1,5 мл, 6×0,5 мл, 6×0,2 мл (16×0,2 мл)

Рівень шуму — не більше ніж 38,9 дБ

Габаритні розміри (Д×Ш×В) — 170×150×13 см

Маса — не більше ніж 1,5 кг



Центрифуга лабораторна ОПн-3.02 (медична), Дастан

Напруга — 220 В

Частота — 50 Гц

Потужність — не більше ніж 300 Вт

Швидкість обертання ротора — 1000, 1500,
3000 об/хв

Максимальний фактор поділу — 1670 г

Максимальний об'єм центрифугату — 150 мл

Кількість встановлюваних пробірок — 10 од.

Габаритні розміри (Д×Ш×В) — 445×430×235 мм

Маса — не більше ніж 15 кг



Центрифуга лабораторна CM-3MT, MICROMed

Напруга — 220 В

Частота — 50 Гц

Потужність — не більше ніж 120 Вт

Швидкість обертання ротора — 100–4000 об/хв

Максимальний фактор поділу — 1700 г

Максимальний об'єм центрифугату — 288 мл

Максимальний об'єм центрифугату
в пробірці — 12 мл

Кількість встановлюваних пробірок — 24 од.

Рівень шуму — не більше ніж 45 дБ

Габаритні розміри (Д×Ш×В) —
430×310×290 мм

Маса — 15 кг



Центрифуга лабораторна CM-3M, MICROMed

Напруга — 220 В

Частота — 50 Гц

Максимальний фактор поділу — 1933 г

Максимальний обсяг центрифугату — 180 мл

Кількість пробірок — 12 од.

Максимальний об'єм центрифугату
в пробірці — 15 мл

Частота обертання ротора — 1000–4000 об/хв

Рівень шуму — не більше ніж 37 дБ

Габаритні розміри (Д×Ш×В) —
420×340×280 мм

Маса — 9 кг



Центрифуга лабораторна CM-5, MICROmed

Напруга — 220 В

Частота — 50 Гц

Потужність — не більше ніж 90 Вт

Кількість встановлюваних мікропробірок
у роторі — 12 од.

Максимальний об'єм центрифугату — 24 мл

Об'єм застосовуваних пробірок — 1,5; 2,0 мл

Кут нахилу пробірок у роторі — 45°

Швидкість обертання ротора, RPM —
100–16000 об/хв

Максимальний фактор поділу, RCF — 17800 g

Максимальний шум — 46 дБ

Габаритні розміри (Д×Ш×В) —
300×240×240 мм

Маса — 15 кг

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Overdigestion Assay

No detectable change in the specific fragmentation pattern is observed after an 80-fold overdigestion with EcoRI (5 U/μg lambda DNA × 16 hours).

Ligation and Recleavage (L/R) Assay

The ligation and recleavage assay was replaced with LO test after validating experiments showed LO test ability to trace nuclease and phosphatase activities with sensitivity that is higher than L/R by a factor of 100.

Labeled Oligonucleotide (LO) Assay

No detectable degradation of single-stranded or double-stranded labeled oligonucleotides occurred during incubation with 10 units of EcoRI for 4 hours.

Blue/White (B/W) Cloning Assay

The B/W assay was replaced with LO test after validating experiments showed LO test ability to detect nuclease and phosphatase activities with sensitivity that equals to that of B/W test.

Quality authorized by:



Jurgita Zilinskiene

PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals. Please refer to www.thermoscientific.com/clonejoy for Material Safety Data Sheet of the product.

© 2012 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

[illegible]

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

[illegible]

Навчальне видання

С. В. Антоненко

МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА

Методичні вказівки
щодо виконання лабораторних робіт

Редагування *О. Б. Степанюк*
Верстання *О. А. Жупанська*
Дизайн обкладинки *К. Ю. Мацюта*

Формат 60х84 1/16. Папір офс. 80 г/м².
Друк цифровий. Ум. друк. арк. 5,81.
Наклад 300 прим.

Видавництво: Національний центр «Мала академія наук України»,
Кловський узвіз, буд. 8, м. Київ, 01021

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи:
ДК № 6999 від 04.12.2019

