

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології

Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ

Робочий зошит

для лабораторних, практичних і самостійних занять
студентів освітньої спеціальності
162 – «Біотехнології та біоінженерія»
СВО «Магістр»

Студент (а/ки) _____

Курс _____ Група _____

МИКОЛАЇВ
2020

УДК 575:577.21
ББК 28.04+28.070
3-14

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від 15 вересня 2020 р., протокол № 1.

Укладач:

М. І. Гиль – д-р с.-г. наук, професор, академік НАН ВО України, професор кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, декан факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету

Рецензенти:

О. М. Дуган – д-р біол. наук, професор, декан факультету біотехнології та біотехніки Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут»;

І. Ю. Горбатенко – д-р біол. наук, професор, академік Нью-Йоркської АН США, професор кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету.

© Гиль М.І., 2020

© Миколаївський національний аграрний університет, 2020

ЗМІСТ

Вступ	4
-------------	---

Змістовий модуль 1:

Молекулярна біологія нуклеїнових кислот та ферментів

Тема ЛЗ 1. Структура генетичного матеріалу. Розмноження нуклеїнових кислот та процеси передавання інформації з них.....	5
Тема ЛЗ 2. Ферменти молекулярно-генетичних досліджень	19
Тема ПЗ 1. Обладнання молекулярно-генетичної лабораторії та організація її роботи.....	25

Змістовий модуль 2:

Методи молекулярної діагностики

Тема ЛЗ 3. Електрофорез білків.....	37
Тема ЛЗ 4. Електрофорез нуклеїнових кислот.....	52
Тема ЛЗ 5. Виділення ДНК	63
Тема ЛЗ 6. Спектрофотометрія препаратів ДНК та РНК	75
Тема ЛЗ 7. Полімеразна ланцюгова реакція	80
Тема ЛЗ 8. Секвенування	85
Тема ЛЗ 9. RAPD-аналіз	90
Тема ЛЗ 10. ISSR-маркування. SSR-маркери.....	91
Тема ЛЗ 11. AFLP-метод. SNP	92
Тема ПЗ 2. Електрофорез білків та нуклеїнових кислот.....	93
Тема ПЗ 3. Полімеразна ланцюгова реакція. Секвенування.....	94

Змістовий модуль 3:

Особливості молекулярно-генетичної діагностики

Тема ПЗ 4. Особливості діагностики геномів флори та фауни	95
Тема ПЗ 5. Особливості діагностики геномів <i>Homo sapiens</i>	96
Література.....	96
Додатки	98

ВСТУП

Дисципліна пов'язана з молекулярною біотехнологією, молекулярною філогенетикою та біоінформатикою, імунобіотехнологією та статистичними методами у біотехнології, а також з іммобілізованими ферментами і клітинами. Ця навчальна дисципліна є основою молекулярно-генетичних досліджень в біотехнології. Вона необхідна для розуміння першопричин існування й життєдіяльності природних та штучних форм життя, нормальності та аномальності молекул нуклеїнових кислот.

Головною метою вивчення дисципліни є засвоєння молекулярно-генетичних методів діагностики, їх специфіки, різноманітності, галузей використання, а також сформувати навички виконання досліджень шляхом запровадження комплексу методів під час конкретних обставин.

У системі підготовки магістрів з «Біотехнології та біоінженерії» „Молекулярно-генетичні методи діагностики” є основою для розв'язання практичних задач з діагностики, встановлення та ідентифікації ознак, властивостей, функцій різних форм життя.

Виконувати лабораторні завдання доцільно тільки після ґрунтовного ознайомлення з матеріалом, який передбачено програмою, використовуючи рекомендовані підручники і посібники, допоміжну літературу. Бажано повністю записувати хід розв'язання задач посилюючи їх таблицями та малюнками. При складанні висновків необхідно звертати увагу не тільки на мету роботи, а й визначити практичну значимість процесу, явища для галузі біотехнології – тобто мати узагальнюючий вигляд.

Робочий зошит в цьому вигляді не претендує бути повним помічником у вивченні дисципліни; в ньому закладена методика освоєння курсу і систематика одержаних попередньо знань.

Модуль 1:

Молекулярна біологія нуклеїнових кислот та ферментів

Дата _____

Тема ЛЗ 1. Структура генетичного матеріалу. Розмноження нуклеїнових кислот та процеси передавання інформації з них

Мета заняття: Вивчити хімічний склад і будову нуклеїнових кислот. Ознайомитися з процесом реплікації. Намалювати схему будови тРНК і описати її функцію. Вивчити правила Е. Чаргаффа. Ознайомитись з гіпотезами реплікації ДНК та експериментом Мезельсона-Сталя. Розібратись та вивчити процес самокопіювання ДНК, що відбувається в клітинах прокариотичних та еукаріотичних організмів. Порівняти ці процеси між собою. Розглянути та вивчити етапи транскрипції. Ознайомитись з принципами регуляції активності генів, запропонованими Ф. Жакобом і Ж. Моно. Засвоїти особливості посттранскрипційних перетворень іРНК. Розглянути та вивчити етапи трансляції. Ознайомитись з елементами посттрансляційних перетворень білкових молекул. Засвоїти принципи перекодування інформації з послідовності нуклеотидів у послідовність амінокислот

Матеріал і обладнання:

Методичні вказівки

Завдання 1. Намалюйте схему хімічної будови ДНК та РНК. Надайте характеристику різним конформаціям ДНК. Замалюйте В- та Z-форми

Завдання 2. Охарактеризуйте основні види РНК (мРНК, рРНК, тРНК, тмРНК)

Завдання 3. *Зазначте які рРНК формують рибосому в еукаріот і прокаріот. Замалюйте схему будови тРНК, зазначивши її основні ділянки*

Завдання 4. *Запишіть і вивчіть правила Е. Чаргаффа і проведіть побудову ланцюгів ДНК та РНК за правилом комплементарності (за вказівкою викладача)*

Завдання 5. *Опишіть функції й призначення РНК та ДНК*

Нуклеїнова кислота	Місце синтезу й локалізації у клітині	Особливості хімічної і просторової будови	Функції
ДНК			
рРНК			
мРНК			
тРНК			
тмРНК			

Завдання 6. *Намалюйте схеми реплікації ДНК відповідно до трьох гіпотез, що пропонували після відкриття її просторової структури*

Завдання 7. *Охарактеризуйте і схематично замалюйте експеримент М. Мезельсона і Ф. Сталя (1957 р.)*

Завдання 8. *Намалюйте та охарактеризуйте процес реплікації у прокаріотичних організмів*

Завдання 9. *Намалюйте та охарактеризуйте процес реплікації в еукаріотичних клітинах*

Завдання 10. Порівняйте процес реплікації між клітинами доменів еукаріот і прокаріот

Показник	Прокаріотична клітина	Еукаріотична клітина
Локалізація процесу		
Період життєвого циклу клітини		
Інтенсивність процесу		
Набір ферментів, що руйнують форму і зв'язки		
Набір ферментів, що здійснюють синтез копії на матричному ланцюзі		

Завдання 11. *Надайте характеристику та замалюйте етапи транскрипції генетичної інформації*

Завдання 12. *Поясніть принципи регуляції транскрипції запропоновані Ф. Жакобом і Ж. Моно (1961 р.). Замалюйте схему регуляції активності Лас-оперону E.coli*

Завдання 13. *Зазначте і охарактеризуйте етапи дозрівання пре-іРНК*

Завдання 14. *Намалюйте схематично сплайсинг іРНК та опишіть явище альтернативного сплайсингу*

Завдання 15. Порівняйте процес транскрипції між клітинами доменів еукаріот і прокаріот

Показник	Прокаріотична клітина	Еукаріотична клітина
Структура транскриптону та функції його ділянок		
Ферменти, що залучені до процесу та їх функції		
Інтенсивність процесу		

Завдання 16. Надайте характеристику і замалюйте етапи трансляції генетичної інформації

Завдання 17. Охарактеризуйте посттрансляційні модифікації поліпептидного ланцюгу та схематично замалюйте чотири рівні організації білків

Завдання 18. Один ланцюг ділянки ДНК, має наступну послідовність основ:
5' –GTAGCCTACCCATAGGCCCCCGAATATTTTCGGGTGC - 3'.
Припустимо, що з цієї ДНК транскрибується мРНК, причому матрицею слугує комплементарний ланцюг. Яка буде послідовність мРНК та який пептид буде синтезуватися в результаті її трансляції? Визначте амінокислотний склад білка, якщо припустити, що матрицею буде слугувати інший ланцюг ДНК

Завдання 19. Якій амінокислотній послідовності відповідає наступна нуклеотидна послідовність мРНК, враховуючи, що початковий відрізок (AACUG) є промотором, а за яким обов'язково є оператор, довжиною у 5 нуклеотидів? Враховуйте, що коли стоп-кодон (UGA, UAG, UAA) існує поряд зі старт-кодonom (AUG), синтезується набір окремих білків. Якщо старт-кодону нема, то наступний пептид не синтезується

1) AACUGAAUUGAUGGGGCGAGGACGUGGCGGCUAAGAACUAAAUG

UUGCCGCGUAGUUUCUACUAG

2) AACUGAAGUGAUGAUCCCAUUACAUCGUAGCUGAAUGUCUUUC

AUAACGACUAAGUAG

3) AACUGACUUGAUGCCCUGUUGGAUCAAGCCUGAAUGCACAGA

AGUUUCUUUUAA

4) AACUGAUUUGAUGGGGCAACUUUUGCCGUCCAUUAAAUAUUUA

AGACGAUACACAAAUUAA

ВИСНОВКИ:.....
.....
.....
.....

Дата _____

Тема ЛЗ 2. Ферменти молекулярно-генетичних досліджень

Мета заняття: Вивчити ферменти, що використовуються під час молекулярно-генетичних досліджень

Матеріал і обладнання:

Методичні вказівки

Завдання 1. Намалюйте схему класифікації класів ферментів

Завдання 2. *Вкажіть та охарактеризуйте основні ферменти рестрикції та модифікації: рестриктази, метилази*

Завдання 3. *Вкажіть та охарактеризуйте ферменти: полімерази*

Завдання 4. *Вкажіть та охарактеризуйте ферменти: нуклеази*

Завдання 5. *Вкажіть та охарактеризуйте ферменти: лігази*

Завдання 6. *Вкажіть та охарактеризуйте ферменти: фосфатази*

ВИСНОВКИ:.....
.....
.....
.....

Дата _____

Тема ПЗ 1. **Обладнання молекулярно-генетичної лабораторії та організація її роботи**

Мета заняття: Вивчити організацію та правила роботи в лабораторії, чинні державні інструкції, що регламентують її діяльність

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

Завдання 1. *Опишіть планування роботи в лабораторії*

Завдання 2. *Наведіть порядок організації роботи в лабораторії*

Завдання 3. *Вкажіть правила техніки безпеки в лабораторії*

Завдання 4. *Приведіть вимоги щодо контролю санітарного стану виробництва*

Завдання 5. *Наведіть порядок обстеження об'єктів на зараженість шкідниками*

Завдання 6. *Вкажіть вимоги до приміщень лабораторії*

Завдання 7. *Надайте список пристроїв, інструментів та спорядження лабораторії*

Завдання 8. *Наведіть правила роботи з лабораторним скляним посудом*

Завдання 9. *Наведіть правила роботи з лабораторним не скляним посудом*

Завдання 10. Наведіть основні вимоги наказу МОЗ України № 26 від 24.01.2008 р. «Про затвердження державних санітарних норм і правил "Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами"»

ВИСНОВКИ:.....
.....
.....
.....
.....

Модуль 2:
Методи молекулярної діагностики

Дата _____

Тема ЛЗ 3. ***Електрофорез білків***

Мета заняття: Вивчити методи отримання біоптатів, що містять білок та способи його виділення з них. Ознайомитись з принципами електрофоретичного розділення дисперсних часток та цілями такого розділення

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

Завдання 1. Виконайте електрофорез білків у ПААГ в умовах денатурації

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: камера для вертикального електрофорезу, пристрій для заливки, джерело струму, автоматичні пипетки, мірні пробирки на 15 мл й 50 мл, кінцеві насадки для пипеток, гребінки для гелю.

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини:

- 1) 1,5 М буфер для нижнього (розподіляючого) гелю, рН 8,8–8,9 (18,2 г тріс·(тріс(гідроксиметіл)амінометан) розчинити в 100 мл води, довести рН до 8,8 за допомогою HCl конц.);
- 2) 1,25 М буфер для верхнього (концентруючого) гелю, рН 6,8 (15,1 г тріс розчинити в 100 мл води, довести рН до 6,9 за допомогою HCl конц.);
- 3) буфер для проведення електрофорезу (електродний, $\times 10$), рН 8,2–8,3 (у 1 л води розчинити: 6 г тріс, 28,8 г гліцину, 2 г додецилсульфату натрію). Під час використання буфер розчиняється деіонізованою водою у десять разів;
- 4) 20 % персульфату амонію (ПСА), каталізатор полімеризації (200 мг ПСА розчинити в 1 мл води). Зберігати готовий розчин у холодильнику не більше тижня, захищати від світла;
- 5) 30 % сток-розчин акріламід-бісакріламід (29 г акріламід й 1 г метіленбісакріламід розчинити в воді та надалі довести до 100 мл);
- 6) 0,65 М буфер для солюбілізації й інкубації білкових проб:
 - а) для неденатуруючих умов: 0,785 г тріс, 3 мл 30 % гліцерину, 2,5 мг бромфенолового синього розчинити в воді й довести до 10 мл;
 - б) для денатуруючих умов: 0,785 г тріс, 3 мл 30 % гліцерину, 2,5 мг бромфенолового синього й 1 г ДСН розчинити в воді й довести до 10 мл.

Перед використанням обидва концентровані розчини слід розчинити в 5 разів, додати 2 мг дітіотреїтолу (ДТТ) на 1 мл буфера.

Важливо!

Усі розчини для електрофорезу виготовляють на деіонізованій воді mQ. Домішки йонів важких металів порушують полімеризацію гелю.

Порядок дій:

1. Приготування сток-розчину для заливання корки: перемішати 3 мл 30 % акріламід-бісакріламід, 1,5 мл 1,5 М буферу для розподіляючого гелю, 1,5 мл води. Безпосередньо перед заливкою додати 25 мкл ПСА й 5 мкл ТЕМЕД.
2. Приготування сток-розчину для концентруючого гелю (5 %): перемішати 0,63 мл 1,25 М буферу для концентруючого гелю, 0,83 мл 30 % сток-розчину акріламід-бісакріламід й 3,42 мл води. Безпосередньо перед заливкою додати 20 мкл ПСА й 3 мкл ТЕМЕД.
3. Приготування розподіляючого гелю (10 %): перемішати 5 мл 1,5 М буферу для розподіляючого гелю, 6,6 мл 30 % сток-розчину акріламід-бісакріламід й 8,1 мл води. Безпосередньо перед заливкою додати на 8 мл розчину 80 мкл ПСА й 8 мкл ТЕМЕД.

Розчини для приготування гелей без ПСА и ТЕМЕД дозволяється зберігати в холодильнику 2–3 тижні.

4. Підготування й денатурація білкових проб. Білки з гомогенату тканин бажано екстрагувати буфером для приготування проб (з SDS). Отриману речовину центрифугують за 10 000 г 15 хв й у подальшому працюють із супернатантом. Білкові проби, що отримано іншим шляхом, перемішують з буфером для приготування проб у співвідношенні 1 : 2 чи 1 : 3 (за об'ємом). У наступному підготовлені проби занурюють в окропі (води) й нагрівають 2–5 хв за 95–100 °С.

5. Заливання гелю:

5.1. Помити камеру детергентом, омий дистильованою водою, висушити. Зібрати камеру для проведення гель-електрофорезу.

5.2. Додати до потрібної кількості розчину для корки необхідну кількість ПСА й ТЕМЕД. негайно залити корку. Після завершення полімеризації корки додати в розчин до нижнього (розподіляючого) гелю ПСА й ТЕМЕД.

- 5.3. Негайно залити нижній (розподіляючий) гель. Обережно налити, без змішування, водонасичений *n*-бутанол (1–2 см).
- 5.4. Після завершення полімеризації відокремити *n*-бутанол тонкою пипеткою, 2–3 рази добре промити утворений карман дистильованою водою до видалення запаху спирту, видалити залишки води фільтрувальним папіром, але не доторкаючись до гелю.
- 5.5. Вставити (не повністю!) гребінку між склом (до дна карману має залишитися 0,5–1,0 см).
- 5.6. Додати до розчину для верхнього (концентруючого) гелю ПСА й ТЕМЕД.
- 5.7. Залити верхній (концентруючий) гель. Після полімеризації вставити верхню камеру в поддон, залити розчинений буфер для проведення гель-електрофорезу, витягнути гребінку.
- 5.8. Негайно промити лунки шприцом з $\times 1$ електродним буфером, виправити зігнуті перетинки між карманами (можливо голкою шприца).
6. Внести до карманів необхідну кількість проб; приєднати камеру до джерела струму. При розподілній в концентруючому гелі задати напругу 50 В, силу струму 50 мА, в розрешаючому – відповідно 100 В, 80 мА.

Протокол дослідю:

Завдання 2. Виконайте проявлення електрофореграми за допомогою фарбника кумассі

Зони розподілених білків слід проявити – зробити помітними неозброєним оком. Розподілені зони білків фіксують осадженням сумішшю оцтової кислоти й етанолу (інколи – метанолу) чи розчином ТХУ та фарбують за допомогою розчину фарбника. Фіксація упереджає руйнацію зон через дифузії білкових молекул у гелі. Використовують такі фарбники: амідочорний, кумассі діамантовий блакитний (марки G-250, R-250), нітрат срібра. Інтенсивність фарбування смуг пропорційна кількості білка в зоні. На порівняння з іншими фарбниками кумассі має такі переваги:

- його чутливість вища, ніж у амідочорного (для R-250 – 0,3–1,0 мкг, для G-250 – біля 10 нг білка у смузі);
- залежність інтенсивності пофарбування від концентрації білка залишається лінійною в білш широкому діапазоні концентрацій, ніж для амідочорного;
- значно дешевше й простіше у викоистанні, ніж нітрат срібла, та не потребує надчистої дистильованої води.

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: шприць з голкою, лезо безпечної бритви й скальпель для відокремлення гелю, лоток для фарбування гелю, шейкер, водяна баня.

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини:

- 1) кумассі яскраво-синій марок R-250 чи G-250;
- 2) етанол (300 мл);
- 3) крижана оцтова кислота (150 мл);
- 4) ТХУ, 12 % розчин (200 мл).

Порядок дій:

Пофарбування кумассі яскраво-синім R-250, сумісно з фіксацією.

1. Готують водяну баню з окропом, розміщують її у витяжній шафі.
2. Готують розчин фарбника наступного складу: етанол – 300 мл, крижана оцтова кислота – 60 мл, кумассі R-250 – 0,7 г. За необхідності фільтрують (в умовах витяжки).
3. Гель додають до стакану й заливають п'ятикратним (відносно обсягу гелю) обсягом розчину фарбника. Стакан із гелем розміщують у водяній бані у витяжній шафі й кип'ятять 10 хв. За кімнатної температури пофарбування можливе, проте це станеться за 4–5 год.
4. Виконують зливання фарбника з стакану, промивають гель дистильованою водою й заливають 7 % оцтової кислоти. Кип'ятять на водяній бані 5 хв, надалі двічі замінюють розчин оцтової кислоти на свіжий й повторюють кип'ятіння. Додавання до розчину клаптиків фільтрувального папіру, фарбника-сорбента, прискорює відмиання.

Протокол досліду:

Завдання 3. Визначте молекулярну масу білка у гелі

Білок, четвертинна структура якого складається з декількох субодиниць, після обробки концентрованим розчином аніційного детергента додецилсульфату натрію (SDS) за присутності β -меркаптоетанолу розпадається на окремі поліпептидні ланцюги. Білки з єдиною субодиницею утворюють один поліпептид. Взаємодія будь-яких поліпептидів з SDS надає їм негативний заряд, що забезпечує їх рух до анода за використання електрофорезу в ПААГ. Присутність додецилсульфату натрію забезпечує лінійну залежність між молекулярною масою білків і їх рухливістю. Чим більше молекулярна маса білка, тим повільніше вона рухається через пори гелю і, таким чином, за одиницю часу проходить меншу відстань в гелі. Відстань, пройдена білком у гелі, називається *електрофоретичною рухливістю*. Вона позначається R_f і визначається як відношення відстані від дна лунки до смуги білка, до відстані від дна лунки до лідируючого барвника. Таким чином, завжди $R_f < 1$.

Для визначення маси невідомого білка необхідно порівняти його електрофоретичну рухливість з рухливістю декількох білків з відомою масою (маркером молекулярних мас).

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: лінійка, ПК, проявлений гель з електрофореграмою білків.

Хід роботи:

1. Розгляньте гель. Знайдіть на ньому маркер молекулярних мас, визначте за каталогом фірми-виробника, яку масу мають білки-маркери.
2. За допомогою лінійки визначте довжину гелю і пробіг кожного з маркерних білків.
3. Розрахуйте електрофоретичну рухливість для маркерних пептидів, занесіть дані до електронної таблиці.
4. Знайдіть логарифм молекулярної маси референтних пептидів, побудуйте графік лінійної залежності логарифму маси білка від його електрофоретичної рухливості.
5. Виберіть на гелі в доріжках зі зразком, що цікавлять вас, білки. Визначте їх електрофоретичну рухливість. Знайдіть, де на отриманому графіку (див. пункт 4) буде знаходитися крапка шуканого білка. Визначте масу білка.

Протокол досліджу:

Завдання 4. Виконайте нативний електрофорез. Проведіть виявлення ізоферментних спектрів пероксидази

Виявлення ізоферментів пероксидази здійснюється відповідно до тексту, наведеного в роботі А. І. Єрмакова з співавт. [Єрмаков и др., с. 41-45]. Візуалізація ізоформ відбувається у вигляді синіх смуг на прозорому гелі.

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: лоток для прояву гелю, автоматичні піпетки і наконечники до них, камера для вертикального електрофорезу, джерело струму, шейкер.

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини:

- 1) 0,5% оцтова кислота;
- 2) тріс-гліциновий буфер, рН 8,3 (0,6 г тріс, 2,34 г гліцину, 0,1 г борної кислоти розчинити в 1 л води);
- 3) бензидиновий реагент (125 мг основного або солянокислого бензидину розчинити в 1 мл крижаної оцтової кислоти і після повного розчинення довести обсяг водою до 50 мл);
- 4) 0,1% розчин перекису водню (0,5 мл 3% перекису водню додати до 14,5 мл води).

Хід роботи:

1. Для проведення електрофорезу проби вирівнюють по вмісту білка (зазвичай близько 10 мкг). Електрофорез виконують у 10% поліакриламідному гелі в неденатуруючих умовах згідно до методики Леммлі (Laemmli, р. 681), виключаючи ДСН з усіх розчинів. Поділ проводять за напруги 2 В/см² (див. завдання 1). Як електродний буфер використовують тріс-гліциновий буфер (рН 8,3) з додаванням борної кислоти в концентрації 0,1%.
2. Після проведення електрофорезу гель поміщають в розчин 0,5% оцтової кислоти. Через 5-10 хв, зливають оцтову кислоту, гель заливають свіжовиготовленим бензидиновим реагентом і залишають на шейкері на 20 хв.
3. Бензидиновий реагент видалають, і гель 1 раз споліскують 0,5% розчином оцтової кислоти.
4. Гель заливають 0,1% розчином перекису водню і спостерігають появу синіх смуг ізоформ пероксидази. У випадку появи забарвлення перекис водню зливають, гель відразу фотографують або сканують, оскільки забарвлення не стійке.

Протокол досліду:

Завдання 5. Виконайте виявлення ізоферментних спектрів супероксиддисмутази

Супероксиддисмутаза (СОД) - один з ключових ферментів антиоксидантного захисту рослин. Він каталізує перетворення високотоксичного супероксидного радикала в менш реакційноздатний перекис водню. Виявлення ізоформ супероксиддисмутази в поліакриламідному гелі виконують згідно до методу, що запропонований Бошаномп і Фрідовічем (Beauchamp, Fridovich, p. 277), з модифікаціями.

Ізоформи супероксиддисмутази виявляють у вигляді світлих смуг на фіолетовому тлі. Фарбування гелю у фіолетовий колір обумовлено фотоіндукованим вільнорадикальним окисленням нітросинього тетразолу. Відсутність фарбування гелю засвідчує про відсутність вільних радикалів, усунення яких відбувається за рахунок активності супероксиддисмутази.

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: камера для вертикального електрофорезу, джерело струму, люмінесцентна лампа, шейкер, лоток для фарбування гелю, скальпель, автоматичні піпетки, наконечники.

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини:

- 1) 50 мМ К-На-фосфатний буфер, рН 7,8. Для приготування К-На-фосфатного буферу необхідні наступні сток-розчини: 0,2 М KH_2PO_4 (1,36 г KH_2PO_4 довести до 50 мл водою), 0,2 М NaOH (400 мг NaOH довести до 50 мл водою). Приготування 50 мМ К-На-фосфатного буфера, рН 7,8: 25 мл 0,2 М KH_2PO_4 і 22,25 мл 0,2 М NaOH змішати і довести до 100 мл водою. Перевірити рН розчину і, якщо необхідно, скоригувати за допомогою концентрованої H_3PO_4 або 5% NaOH ;
- 2) тріс-гліциновий буфер, рН 8,3: 0,6 г тріс-амінометану, 2,34 г гліцину, 0,1 г борної кислоти розчинити в 1 л води);
- 3) забарвлюючий розчин (45 мг етілендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) і 1 мг рибофлавіну розчинити в 40 мл 50 мМ 30 К-На-фосфатного буферу (рН 7,8). Безпосередньо перед загрузкою гелю додати 4 мг нітросинього тетразолія.

Обладнання: прилад для проведення електрофорезу, джерело струму, холодильник, люмінесцентні лампи, фотоапарат.

Хід роботи:

1. Для проведення електрофорезу проби вирівнюють за вмістом білку (зазвичай близько 20 мкг). Поділ білків здійснюють в 10% поліакриламідному гелі в електродному тріс-гліциновому буфері (див. завдання 1) без додецілсульфату натрію (ДСН), за методом Леммлі [Laemmli, p. 277-278]. Поділ здійснюють при 4 °С, поміщаючи камеру до холодильнику, зупиняючи процес поділу відразу після того, як лідируючий барвник повністю вийде з розподільного гелю і корока.
2. Після електрофорезу гель розташовують у забарвлюючому розчині та інкубують 20 хв у темряві за кімнатної температури. У подальшому гель переносять в чисту прозору ємність і опромінюють люмінесцентними лампами денного світла до появи необхідної чіткості й інтенсивності фарбування. При цьому відбувається зміна забарвлення гелю від світло-жовтого до фіолетового. Ізоформи супероксиддисмутази проявляються у вигляді світлих непофарбованих смуг.
3. Реакція зупиняється вимиканням світла. Гель швидко фотографують або сканують.

Протокол досліді:

Реагент	Адресна дія	Режими та умови
---------	-------------	-----------------

--	--	--

Завдання 5. Виконайте ізоферментний аналіз генетичного поліморфізму у популяції рослин

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: свіжі або заморожені органи рослин (листя, бруньки, стебла, цибулини, бульби та ін.), центрифуга з охолодженням, ступки з товкачками, оксид алюмінію, вертикальна камера для заливки гелю і електрофорезу, охолоджуючий термостат або крижані блоки для охолодження. Якщо використовуються заморожені органи рослин, їх необхідно розтирати в рідкому азоті.

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини:

- 1) екстрагують буфер (на 100 мл): тріс-НСІ 1М - 10 мл, аскорбінова кислота - 100 мг, бичачий сироватковий альбумін - 20 мг, α -амінокапронова кислота - 20 мг, сахароза - 16 г, Tween-80 - 1 мл, PVP 2% - 2 г, β -меркаптоетанол - до 0,1% (додається безпосередньо перед екстракцією). Зберігається в холодильнику;
- 2) буфер тріс-НСІ 8,0 (для фарбування): тріс - 48,4 г, H_2O - біля 1 л, НСІ - до рН 8,0, H_2O - до 2 л;
- 3) буфер ТЕВ 8,0 для камери: тріс - 84 г, ЕДТА (трілон В) - 7,2 г, борна кислота - 60 г, H_2O - до 2 л. Перед заливанням до камери розводити водою 1:2. Використовувати в якості нижнього і верхнього буферів;
- 4) буфер 8,6 (для заливки гелів): тріс - 43 г, ЕДТА - 3,5 г, борна кислота - 22 г, H_2O - до 1 л;
- 5) гель, що концентрує (на 65 мл): розчин акриламід (верхній) - 17 мл, буфер ТЕВ для гелів - 13 мл, вода дистильована - 35 мл, персульфат амонію - 54 мг;
- 6) гель, що вирішує (на 200 мл): розчин акриламід (нижній) - 66 мл, буфер ТЕВ для гелів - 62 мл, вода дистильована - 72 мл, персульфат амонію - 180 мг;
- 7) розчин акриламід (нижній): акриламід - 192 г, біакриламід - 8 г, H_2O - до 1 л;
- 8) розчин акриламід (верхній): акриламід - 192 г, біакриламід - 16 г, H_2O - до 1 л.

Розчини для виявлення зон активності деяких ферментів (Левітес, 1986)

Аконітаза (АКО): 50 мкг *цис*-аконітової кислоти в 12,5 мл тріс-НСІ буфер (рН 8,0), що містить $MgCl_2$ (1М) - 100 мкл, МТТ - 0,5 мл, ФМС - 0,3 мл; довести рН до 7-8, агар (1%) - 12,5 мл (Температура агару не повинна бути вище 45 °С). Додати перед вживанням НАДФ - 10 мкг, ізоцитратдегідрогеназу - 2 мкл; проявляється в термостаті при 37 °С.

Алкогольдегідрогеназа (ADH): 1 мл етанолу в 50 мл тріс-НСІ буфера (рН 8,0), що містить НАД - 15 мкг, МТТ - 1 мл, ФМС - 0,5 мл; 37 °С.

Аспаратамінотрансфераза (GOT): тріс-НСІ буфер, рН 8,0 (До 100 мл); піридоксаль-5-фосфат - 8 мг; *L*-аспарагінова кислота - 340 мг; міцний синій ББ сіль - 300 мг; α -кетоглутарова кислота - 150 мг; 37 °С.

Ізоцитратдегідрогеназа (IDH): 20 мг ізоцитрату в 12,5 мл тріс-НСІ буфера (рН 8,0), що містить НАДФ - 10 мкг, $MgCl_2$ (1М) - 100 мг, МТТ - 0,5 мл, ФМС - 0,3 мл, агар 1% - 12,5 мл; 37 °С.

Форміатдегідрогеназа (FDH): тріс-НСІ буфера (рН 8,0) - до 50 мл, форміат - 1 г, аспарагінова кислота - 200 мг, α -кетоглутарова кислота - 50 мг, піридоксаль - 4 мг; безпосередньо перед вживанням додати Fast Blue - 100 мг, якщо необхідно, профільтрувати суміш; 37 °С.

Фосфоглюкоізомераза (PGI): тріс-НСІ буфера (рН 8,0) - 12,5 мл, фруктоза-6-фосфат - 10 мкг, $MgCl_2$ (1М) - 100 мкл, НАДФ - 10 мкг, глюкоза-6-фосфотдегідрогеназа - 4 мкл, МТТ - 0,5 мл, ФМС - 0,3 мл, агар 1% - 12,5 мл; 37 °С.

6-фосфоглюконатдегідрогеназа (6-PGD): тріс-НСІ буфера (рН 8,0) - 12,5 мл, 6-фосфоглюконова кислота - 10 мкг, НАДФ - 10 мкг, $MgCl_2$ (1М) - 100 мкл, МТТ - 0,5 мл, ФМС - 0,3 мл, агар - 12,5 мл; 37 °С.

Хід роботи:

1. Для екстракції ферментів 120-160 мг свіжого листя або інших частин рослин розтерти в 1 мл екстрагуючого буфера в ступці. Гомогенізований зразок

- перенести в пробірку «Еппендорф». У тому випадку, якщо електрофорез не проводиться відразу після екстракції, зразки необхідно зберігати в морозильнику.
2. Гомогенізовані зразки центрифугувати 5 хв (13 тис. об/хв при +4 °С), додавши перед цим 200 мл чотирьоххлористого вуглецю (CCl₄). Усі операції виконувати таким чином, щоб температура зразків не перевищувала 15 °С, інакше активність ферментів знижується.
 3. Зібрати вертикальні камери і залити їх ПААГ гелем. Нижній шар - розділяє гель, верхній шар – концентрує гель. Після заливки першого гелю нашаровується водо насичений *n*-бутанол для більш рівної полімеризації. Перед заливанням концентруючого гелю встановлюють гребінки, що формують осередки для внесення зразків.
 4. Після полімеризації гребінки виймаються і камера встановлюється до ванни з буфером. В саму камеру заливають електродний буфер. Камеру підключають до джерела струму і в перебігу 10-15 хв проводять предотгонку для видалення з буфера іонів.
 5. У кожен клітинку гелю саплером акуратно вноситься від 10 до 50 мкл зразка, в одну з комірок вноситься барвник (наприклад, бавовняний блакитний). За рухом барвника можна відслідковувати рух зразків. Умови електрофорезу: температура не повинна перевищувати 15 °С; в низькій камері напруга 150-180 В, сила струму - 299 мА, у високій камері напруга 100-220 В, сила струму - 299 мА.
 6. Температура в камерах (+10 °С) підтримується за допомогою охолоджуючого термостата і додаткових охолоджуючих елементів.
 7. Після електрофорезу гелі розрізають поздовжньо

Протокол досліду:

ВИСНОВКИ:.....
.....
.....
.....
.....

Дата _____

Тема ЛЗ 4. ***Електрофорез нуклеїнових кислот***

Мета заняття: Вивчити методи отримання біоптатів, що містять ДНК та способи її виділення з них. Ознайомитись з принципами електрофоретичного розділення дисперсних часток та цілями такого розділення

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

Завдання 1. Виконайте електрофорез у 6% поліакриламідному денатуруючому гелі та процедуру пофарбування поліакриламідних гелів нітратом срібла

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: вертикальна камера для електрофорезу, джерело струму, шейкер-качалка, ванна для інкубації і фарбування гелів, ампліфіковані зразки, дозатори.

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини:

- 1) склад 6% денатуруючого акриламідного гелю: акриламід - 5,7 г, біс-акриламід - 0,3 г, 5x тріс-ЕДТА-боратний буфер - 20 мл, сечовина (карбамід) - 42 м. Довести обсяг розчину дистильованою водою до 100 мл. Перемішати, профільтрувати, деаерувати, у подальшому додати (безпосередньо перед використанням) персульфат амонію (10% розчин) - 1 мл і тетраметілендіамін (TEMED) - 60 мкл;
- 2) склад формамідного LD-барвника для нанесення проб на денатуруючий поліакриламідний гель: ксіленціанол - 10 мг, бромфеноловий синій - 10 мг;
- 3) ЕДТА (0,5 М) - 200 мкл;
- 4) формамід - 100 мл;
- 5) склад 10x тріс-ЕДТА-боратного (ТВЕ) буфера (рН 8,3): тріс - 107,8 г, борна кислота - 55,0 г, ЕДТА (натрієва сіль) - 7,4 г, дистильована вода - 1000 мл.

П р и м і т к а. Під час приготування 5x тріс-ЕДТА-боратного буфера обсяг дистильованої води становить 200 мл.

Хід роботи:

1. Покласти велике скло на гумові підставки гладкою стороною вгору.
2. Повністю сухе мале скло під тягою обробити таким складом: 200 мкл крижаної оцтової кислоти; 1,0 мл етанолу; 1 мкл bindsilane (перед використанням перемішати). Розчин залити в середину скла і розтерти безворсовою паперовою серветкою. Залишити на 10-15 хв.
3. Налити в середину скла 1-2 мл етанолу, розподілити етанол чистою серветкою по поверхні і протерти скло спочатку в одному напрямку, потім перпендикулярно. Повторити обробку спиртом ще 2 рази. Залишити скло на 5-10 хв.
4. Покласти на велике скло спейсери і поверх них - мале скло оброблене стороною вниз, притиснути затискачами.
5. Залити 6% акриламідний гель між скельцями, домагаючись відсутності пустот, після чого акуратно вставити гребінки рівною стороною, потім додати затискачі і вичавити надлишки гелю. Залишити на 10-15 хв для полімеризації, потім сендвіч з двох скелець і гелю між ними промити під краном, прибрати гребінки, протерти зовні фільтрувальним папером.
6. Закріпити сендвіч у вертикальній камері для електрофорезу. Закрити клапан між верхньою і нижньою частинами камери. Залити в верхню і нижню частину камери 1x ТВЕ-буфер.
7. Закрити камеру і приєднати до джерела постійної напруги (стабілізація за потужністю 75 Вт). Виконувати передотгонку впродовж 30 хв.
8. Додати до ПЛР-продукту формамідного LD-барвника з розрахунку 1:1. Поставити пробірки з ПЛР-продуктом до ампліфікатору й включити програму денатурації (85 °С), дати пробіркам прогрітися не менше 2 хв. Вимкнути напругу, вставити гребінки зубчастою стороною в гель і витягнути, промити утворені лунки 10x ТВЕ-буфером з шприца, залити проби по 2,5-4,0 мкл в лунки з піпетки.
9. Включити напругу і проводити електрофорез близько 2 год. У подальшому вимкнути напругу, вийняти сендвіч і відокремити мале скло від великого для наступного фарбування, не допускаючи пошкодження поверхні гелю.
10. У кювету з гелем залити фіксуючий розчин (10% р-н оцтової кислоти) і інкубувати 20 хв у ванні що хитається за кімнатної температури.
11. Фіксуючий розчин злити і промити гель три рази по 5 хв дистильованою водою.
12. Помістити гель до фарбуючої суміші (0,1% розчин нітрату срібла, додати 1,5

мл формаліну на 1 л розчину перед використанням) і інкубувати 30 хв у ванні що хитається за кімнатної температури.

13. Вийняти гель з фарбувальної суміші, опустити гель в дистильовану воду (не більше ніж на 8 с!) і помістити в розчин для проявлення (3% розчин безводного карбонату натрію, 0,03% NaOH; розчин охолодити до 10 °C; безпосередньо перед використанням додати 1,5 мл формаліну і 200 мкл тіосульфату натрію на 1 л розчину) й інкубувати, похитуючи, до появи чітких бурих смужок (в середньому 6-8 хв), після чого швидко додати 10% розчин оцтової кислоти для гасіння. Продовжити погойдування 1-2 хв, потім промити гель дистильованою водою і залишити сушитися. Для видалення гелю скло поміщають в розчин NaOH (біля 10 г на 1 л води).

Протокол досліду:

Завдання 2. Виконайте електрофорез у 1% агарозному гелі і ТАЕ-буфері

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: камера для горизонтального електрофорезу, джерело струму, ампліфіковані зразки, дозатори наконечники, гель-документатор.

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини:

- 1) склад 1% агарозного гелю: агароза - 1 г, 1x тріс-ЕДТА-ацетатний буфер - 100 мл (п р и м і т к а: для 2% гелю - 2 г агарози на 100 мл);
- 2) склад 50x тріс-ЕДТА-ацетатного (ТАЕ) буфера (рН 8,0): тріс - 242,2 г, оцтова кислота - 89,6 мл, ЕДТА (натрієва сіль) - 18,616 м. Довести дистильованою водою до 1 л.

Хід роботи:

1. Довести розчин агарози до кипіння, охолодити до 60 °С, у подальшому додати 5 мкл етідіумброміду.
2. У заливний столик для камери вставити гребінки і залити гель. Дати гелю охолонути (близько 30 хв).
3. Витягнути гребінки, встановити форму в горизонтальну камеру для електрофорезу і залити в камеру 1x ТАЕ-буфер.
4. Помістити в лунки по 3-10 мкл розчину ДНК (ампліфікованого). Якщо при ПЛР-реакції використовували суміш для ПЛР ScreenMix або пофарбований буфер, барвник додавати не потрібно.
5. Закрити камеру, під'єднати до джерела постійної напруги і включити її з розрахунку 5 В на 1 см довжини гелю.
6. Зупинити електрофорез через 23 год (час підбирається дослідним шляхом).
7. Вийняти гель з форми і покласти на транслюмінатор (джерело УФ-випромінювання) для перегляду і документації.

Протокол досліду:

Завдання 3. Виконайте виділення ДНК з агарозного гелю та виконайте її очищення

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини: склад NaI-буфера: NaI · 2H₂O - 123 г, Na₂SO₃ - 0,1 г, крезоловий червоний (Na) - 0,01 г, H₂O (дистильована) - до 100 мл. Колір розчину довести оцтовою кислотою (близько 20 мкл) до жовтого. Зберігати за кімнатної температурі до 2 міс.

Хід роботи:

1. Вирізати необхідну смужку під довгохвильовим УФ (360 нм), підклавши під гель фольгу, поступово відкриваючи шукані ділянки. Розмістити смужку до пробірки.
2. Зважити смужку (вага відповідає обсягу).
3. При концентрації агарози в гелі 1,0-1,5% додати 3 об'єму NaI-буфера на 1 обсяг гелю, при концентрації 2% - 4 обсягу, при підвищенні концентрації на 1% додавати один обсяг.
4. Пробірку зі смужкою поставити до термостату та інкубувати за 50 °С 5 хв або поки вся агароза не розплавиться (час від часу помішуючи); прибрати з термостату, дати охолонути.
5. Якщо розчин має помаранчевий або червоний колір, то додати 1 мкл 10% оцтової кислоти. Розчин повинен пожовтіти.
6. Додати 6 мкл суспензії діоксиду кремнію (збовтати перед додаванням).
7. Перемішати і чекати 2 хв.
8. Центрифугувати 20-30 с при 13 тис. об/хв.
9. Рідину злити. До осаду додати 160 мкл NaI-буфера, ретельно перемишати, ЦФ - 20 с при 13 тис. об/хв, прибрати супернатант.
10. Додати 0,5 мл 70% етанолу, збовтати, ЦФ - 20 с при 13 тис. об/хв, злити рідину.
11. Повторити пункт 10.
12. Сушити осад 20 хв.
13. За низької концентрації ДНК додати 15 мкл H₂O, проте за високої - 25 мкл. Збовтати.
14. Інкубувати 3 хв при 50 °С.
15. ЦФ - 30 с при 13 тис. об/хв.
16. Перенести супернатант у нову пробірку.
17. Визначити концентрацію ДНК (для секвенування повинна бути не менше 10 нг/мкл).

Приготування суспензії діоксиду кремнію:

1. Суспензувати за допомогою магнітної мішалки 10 г SiO₂ у ~ 100 мл азотної кислоти протягом 2 год. Дати відстоятися, злити кислоту.
2. Шість разів промити в дистильованій воді.
3. Залити дистильованої води у відношенні близько 1:1. Зберігати суспензію за кімнатної температури до 1 міс.

Протокол дослідю:

Завдання 4. *Замалюйте схематично та опишіть принципи розподілу часток дисперсної фази під час електрофорезу*

Завдання 5. *Надайте характеристику різновидам електрофорезу та зазначте у яких галузях суспільного життя його застосовують*

Завдання 6. Упорядкуйте набір і призначення реагентів під час електрофорезу

Реагент	Адресна дія	Режими та умови

ВИСНОВКИ:.....
.....
.....
.....
.....

Дата _____

Тема ЛЗ 5. **Виділення ДНК**

Мета заняття: Ознайомитись із процедурою виділення ДНК
Оволодіти методиками виділення ДНК

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

Завдання 1. Виконайте метод сольової екстракції ДНК з фенольною депротеїнізацією

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: рослинна тканина, заморожена скрапленням азотом, свіжа або висušена в гербарії або селікагелі, ступки з товчачиками, центрифуга, мікроцентрифужні пробірки, витяжна шафа, твердотільний термостат («Терміт»), вортекс.

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини:

- 1) тріс-НСІ 1 М буфер: Н₂О - приблизно 70 мл, тріс - 12,1 г, НСІ конц. - 8 мл відразу, у наступному по 100 мкл до досягнення необхідного значення рН (перевірити за допомогою рН-метра або індикаторного паперу). Довести водою до 100 мл;
- 2) ЕДТА (рН 8,0) - 0,5 М: Н₂О - близько 70 мл, ЕДТА - 14,6 м. Довести рН сухим NaOH до 8,0. Використовувати рН-метр або індикаторний папір. Довести водою до 100 мл;
- 3) буфер TE: тріс-НСІ 1 М (рН 8,0) - 1 мл, ЕДТА 0,5 М (рН 8,0) - 20 мкл, вода бідистільована або milliQ - до 100 мл;
- 4) екстрагують буфер: тріс-НСІ (рН 7,5) - 200 мМ, NaCl - 250 мМ, ЕДТА - 25 мМ, лаурилсульфат або додецилсульфат натрію (SDS) - 0,5%.

Хід роботи:

1. 30-40 мг рослинної тканини гомогенізувати. Для цього рослинну тканину заморозити рідким азотом і розтерти в ступці з екстрагуючим буфером, а надалі помістити в центрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл, залити 500 мкл екстрагуючого буферу. Пробірки помістити до термостату на 10 хв при T = 65 °C.
2. Дати пробіркам охолонути і центрифугувати 5 хв при 10 тис. об/хв.
3. Відібрати супернатант (рідина) і помістити в іншу пробірку на 1,5 мл, додати 250 мкл фенолу, забуферованого 1 М трісом. Струснути, центрифугувати 5 хв при 15 тис. об/хв.
4. Відібрати супернатант в іншу пробірку, не зачіпаючи інтерфазу, додати рівний об'єм хлороформу, струснути, центрифугувати 2-3 хв при 15 тис. об/хв.
5. Відібрати супернатант у чисту пробірку, додати 500 мкл ізопропанолу, ретельно перемішати, поставити в морозильник на 20 хв. Центрифугувати 10 хв при 15 тис. об/хв, злити супернатант.
6. До осаду додати 1 мл 70% етанолу, струснути, центрифугувати 5 хв при 15 тис. об/хв, злити спирт, повторити операцію.
7. Підсушити осад у пробірках з відкритими кришками. Розчинити ДНК у 200 мкл буфера TE. Зберігати в холодильнику.

Протокол досліджу:

Завдання 2. *Виконайте екстракцію сумарної ДНК з рослин за Devey et al. з невеликими модифікаціями [Semerikov, Lascoux, p. 1114]*

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: рослинна тканина, заморожена скрапленням азотом, свіжа або висušена в гербарії або селікагелі, ступки з товчачиками, центрифуга, мікроцентрифужні пробірки, витяжна шафа, твердотільний термостат («Терміт»).

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини:

- 1) екстрагують буфер: тріс-НСІ 1 М (рН 8,0) - 10 мл, ЕДТА 0,5 М (рН 8,0) - 1 мл, поліетиленгліколь - 10 г, сорбітол - 6,8 г, лаурілсаркозін - 1 г, альбумін бичачий сироватковий - 100 мг, аскорбінова кислота - 100 мг, Tween-80 - 1 мл, вода - до 100 мл, 2-меркаптоетанол - 0,1%, додається безпосередньо перед використанням;
- 2) 5 М NaCl: NaCl - 29 г, H₂O - до 100 мл;
- 3) 10% СТАВ: СТАВ - 10 г, вода - до 100 мл. Розмішати в холодній воді, а надалі злегка підігріти суспензію в мікрохвильовій печі або на водяній бані для розчинення СТАВ.

Хід роботи:

1. 40-50 мг сухої або 150 мг свіжої тканини розтерти в ступці. Якщо тканина була заморожена, розтирати слід в рідкому азоті. Додати 800 мкл екстрагуючого буфера або, використовуючи товчач, зробити гомогенізацію безпосередньо в буфері. Гомогенат ретельно перемішати.
2. У суміш додати 390 мкл 5 М NaCl і 290 мкл попередньо розігрітого 10% СТАВ і інкубувати 30 хв при T = 65 °C у твердотільному термостаті, періодично перемішуючи.
3. Пробірку охолодити до кімнатної температури і додати 300-500 мкл суміші хлороформу й ізоамілового спирту (24:1), ретельно перемішати і центрифугувати 20 хв при 13 тис. об/хв. (T = 18-20 °C). Процедуру повторювати до отримання прозорої водної фази.
4. За допомогою дозатора відібрати 500-1000 мкл прозорої фази в нові пробірки і додати до неї 600 мкл ізопропанолу. У подальшому обережно перемішувати протягом 2 хв. Помістити в холодильник не менше ніж на 30 хв, після чого центрифугувати при 13 тис. об/хв протягом 10 хв.
5. Ізопропанол злити і додати 500 мкл 70% етанолу, перемішати і центрифугувати 1-2 хв, після чого етанол злити і підсушувати при відкритих кришках пробірок до повного випаровування спирту.
6. Розчинити в 200 (100) мкл буфера TE. Отриману ДНК зберігати при температурі -20 °C при довгостроковому зберіганні і від 0 до +3 °C - при тимчасовому.

Протокол досліді:

Завдання 3. Виконайте екстракцію _____ геномної ДНК
(із сечовиною)

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: рослинна тканина, заморожена скрапленням азотом, свіжа або висушена в гербарії або селікагелі, ступки з товчачиками, центрифуга, мікроцентрифужні пробірки, витяжна шафа, твердотільний термостат («Терміт»), вортекс, автоматичні піпетки, наконечники для піпеток у штативі.

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини: екстрагують буфер (зберігати при кімнатній температурі): SDS - 2% (w/v), EDTA - 10 мМ, NaCl - 0,35 М, тріс-НCl (рН 8,0) - 0,1 М, сечовина - 7 М.

Хід роботи:

1. Ретельно гомогенізувати зразок у 100 мкл екстрагуючого буфера в пробірці «Еппендорф» за допомогою товчачика.
2. Довести обсяг буфером до 300 мкл.
3. Додати 300 мкл суміші фенол-хлороформ (1:1), струснути на вортексі.
4. Центрифугувати 5 хв при 10 тис. об/хв.
5. Відібрати верхню водну фракцію в нову пробірку, не зачіпаючи інтерфазу.
6. Додати рівний обсяг хлороформу, струсити на вортексі.
7. Відцентрифугувати, відібрати верхню фазу в нову пробірку.
8. Додати подвійний обсяг холодного етанолу або рівний обсяг ізопропанолу і поставити в холодильник на 30 хв.
9. Відокремити утворений осад центрифугуванням на максимальних швидкості 10-15 хв.
10. Обережно злити супернатант і підсушити осад повітрям.
11. Розчинити осад в 250 мкл ТЕ-буфера, додати 1/10 обсягу ацетату натрію (рН 5,2), додати 2 обсягу етанолу, інкубувати в холодильнику 20 хв. При цьому домішки залишаються в розчині, а в осад знову випадає ДНК.
12. Відокремити осад центрифугуванням впродовж 10-15 хв., злити супернатант.
13. Осад промити 70% етанолом, відокремити центрифугуванням, злити спирт.
14. Осушити осад 96% етанолом, відокремити центрифугуванням ДНК.
15. Розчинити ДНК в 100 мкл води або в ТЕ буфера.

Протокол досліджу:

Завдання 4. Виконайте швидкий метод екстракції ДНК з рослинних Тканин [Веліков, с. 11]

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: органи рослин (або заморожені тканини), мікроцентрифуга, морозильник, ступки з товкачиками, оксид алюмінію, пісок.

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини розчини:

- 1) буфер для екстракції: тріс-НCl (рН 8,0) - 100 мМ, ЕДТА - 50 мМ, NaCl - 500 мМ, SDS - 1,25%, NaOH - 8,3 мМ, Na₂S₂O₃ - 0,83%;
- 2) 3 М ацетат калію, рН 5,0. На 100 мл: 5 М ацетат калію - 60 мл; CH₃COOH крижана - 11,5 мл; H₂O - 28,5 мл;
- 3) суміш фенол-хлороформ (1:1);
- 4) суміш хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1).

Хід роботи:

1. Взяти 200 мг листя рослин, заморожених заздалегідь при -20 °С в морозильнику, або швидко заморозити навішення в скрапленому азоті.
2. Зразки розтерти в попередньо охолодженій фарфоровій ступці до гомогенного стану. Якщо немає рідкого азоту, то при розтиранні до заморожених листів необхідно додати 0,1 г оксиду алюмінію або прокаленого білого річкового піску як абразив. У ступку при цьому потрібно додати трохи буферу для екстракції ДНК (300 мкл).
3. Додати в ступку 700 мкл буфера для екстракції, знову перемішати.
4. Перенести розтерту масу в мікропробірку «Еппендорф» так, щоб обсяг становив приблизно 700 мкл (на пробірці є мітка 0,75 мл).
5. Перемішати і інкубувати гомогенат при 65 °С впродовж 10 хв.
6. Додати 220 мкл ацетату калію і помістити пробірку на кригу на 20 хв.
7. Центрифугувати пробу впродовж 3 хв при швидкості 10 тис. об/хв. Перенести супернатант (супернатант) до чистої пробірки.
8. До супернатанту додати рівний об'єм ізопропанолу, перемішати і центрифугувати 10 хв при 10 тис. об/хв для осадження ДНК.
9. Осад ДНК промити 70% етанолом, розчинити в 200 мкл буфера TE.
10. Провести процедуру фенольної депротейнізації зразка. Для цього внести в пробірку з розчином ДНК рівний обсяг фенол-хлороформної суміші, добре перемішати струшуванням і центрифугувати. Відібрати водну фазу (верхній шар) у чисту пробірку, не захоплюючи інтерфазу. Повторити ту ж процедуру з сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт. Відібрати водну фазу з ДНК у чисту пробірку.
11. Осадити ДНК 2,5 обсягами холодного 96% етанолу, попередньо прилив до зразка 1/10 обсягу 3 М ацетату К (рН 5,0) або Na (рН 5,2).
12. Пробу центрифугувати впродовж 10 хв на максимальній швидкості. Супернатант злити. Осад промити 70% спиртом.
13. Висушити осад ДНК на повітрі і розчинити в 50 мкл буфера TE.

Протокол дослідю:

Завдання 5. *Виконайте екстракцію ДНК рослин з використанням СТАВ*

Детергент СТАВ (цетилтриетіламмоній бромід, англ. Cetyl triethylammonium bromide) добре розчиняє мембрани клітин. Крім того, його застосування дозволяє розділяти ДНК і полісахариди, оскільки вони відрізняються за розчинністю в присутності СТАВ. За високих концентрацій солей (0,7 М NaCl) нуклеїнові кислоти утворюють стабільні, але разом з тим розчинні комплекси зі СТАВ. У випадку зниження концентрації солі нижче 0,4 М NaCl відбувається випадання в осад комплексів СТАВ/нуклеїнова кислота, проте як більша частина полісахаридів залишається в розчині.

Методики із застосуванням СТАВ дозволяють отримувати препарати рослинної ДНК, придатні для рестрикційного і гібридаційного аналізів, для Real-time PCR і ряду інших ферментативних реакцій.

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: рослинна тканина, заморожена скрапленням азотом, свіжа або висušена в гербарії або селікагелі, ступки з товчачиками, центрифуга, мікроцентрифужні пробірки, витяжна шафа, твердотільний термостат («Терміт»).

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини розчини:

- 1) лізуючий буфер: СТАВ - 2%, тріс-НCl (рН 8,0) - 100 мМ, ЕДТА - 20 мМ, NaCl - 1,4 М;
- 2) буфер для осадження: СТАВ - 1%, тріс-НCl (рН 8,0) - 50 мМ, ЕДТА - 10 мМ;
- 3) високосольовий ТЕ: тріс-НCl (рН 8,0) - 10 мМ, ЕДТА - 1 мМ, NaCl - 1,2 М;
- 4) ізопропанол;
- 5) 70% етиловий спирт;
- 6) ТЕ: тріс-НCl (рН 8,0) - 10 мМ, ЕДТА - 1 мМ.

Хід роботи:

1. 50-100 мг тканини заморозити в рідкому азоті і розтерти в ступці з рідким азотом до стану пудри світло-зеленого кольору. Перенести охолодженим шпателем до пробірки «Еппендорф» об'ємом 1,5 мл. Додати 100-200 мкл ТЕ і 400 мкл лізуючого буфера. Інкубувати 10-30 хв при 65 °С (можна 1-3 год).
2. Охолодити до кімнатної температури, додати 400 мкл хлороформу, змішувати 30 с, центрифугувати 2-5 хв при 12 тис. об/хв.
3. Відібрати піпеткою верхню водну фазу, що містить ДНК, до чистої пробірки.
4. Додати подвійний обсяг буфера для осадження, перемішати і залишити на столі на 10-60 хв (або ніч).
5. Відокремити ДНК в настільній центрифугі 5-10 хв при 12 тис. об/хв, обережно вилити супернатант.
6. Осад ДНК розчинити в 100 мкл високосольового буфера ТЕ. (Якщо необхідно очистити від РНК, то додати рибонуклеазу А до концентрації 0,2 мг/мл й інкубувати при 37 °С тривалістю 10-30 хв, надалі провести очистку хлороформом: додати 200 мкл хлороформу, змішувати 30 с, центрифугувати тривалістю 10 хв при 12 тис. об/хв і відібрати водну фазу в чисту пробірку.)
7. Осадити ДНК 0,8-1,0 об'ємом ізопропанолу (або 2,5-3,0 обсягами етилового спирту); центрифугувати тривалістю 10 хв при 12 тис. об/хв.
8. Осад ДНК промити 2-3 рази 75% спиртом, висušити і розчинити в 50 мкл води або ТІ.

Протокол досліду:

Завдання 6. Виконайте додаткове очищення ДНК

Додаткове очищення ДНК застосовують при незадовільних результатах першого очищення (отримання сірого або жовтого осаду в пробірці замість білого після промивання етанолом, наявність домішки РНК і білків).

Хід роботи:

1. Додати 1 мкл РНКазу. Струснути пробірки.
2. Помістити в термостат на 30 хв при 37 °С.
3. Додати 20 мкл 3 М розчину ацетату натрію і 100 мкл хлороформу.
4. Перемішати і центрифугувати 10 хв при 13 тис. об/хв.
5. Водну фазу помістити до чистої пробірки і додати 200 мкл ізопропанолу.
6. Помістити в холодильник на термін від 40 хв до декількох годин.
7. Центрифугувати 10 хв при 13 тис. об/хв.
8. Злити ізопропанол і додати 200 мкл 70% етанолу, після чого струсити, центрифугувати 1-2 хв при 13 тис. об/хв. і злити етанол.
9. Підсушити і розчинити в 200 мкл буфера TE .

Протокол досліджу:

ВИСНОВКИ:.....
.....
.....
.....
.....

Дата _____

Тема ЛЗ 6. **Спектрофотометрія препаратів ДНК та РНК**

Мета заняття: Ознайомитись із процедурою спектрофотометрії препаратів ДНК та РНК. Оволодіти методиками спектрофотометрії препаратів ДНК та РНК

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

Завдання 1. *Виконайте спектрофотометричне визначення концентрації ДНК*

Нижня межа концентрації ДНК, яку можна визначити спектрофотометрично, становить 0,1 мкг/мл. На визначення (дослідження) зазвичай беруть аліквоту досліджуваного розчину ДНК, до приміру, 1 мкл, і розбавляють в 100 і більше разів. У подальшому перераховують отримане значення концентрації розчину. Важливо, щоб у розведеному зразку було більше 10 нг ДНК. Для порівняння, при гель-електрофорезі також можна візуалізувати смугу, яка містить від 10 нг ДНК. У зразку ДНК не повинно бути РНК.

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: спектрофотометр, кварцова кювета, зразок ДНК.

Хід роботи:

1. Взяти мікропіпеткою 1 мкл зразка отриманої ДНК і розчинити препарат, додавши 130 мкл буфера TE, що містить 100 мМ NaCl (див. зраз. 1). Обсяг зразка виготовляють рівним 130 мкл, щоб кривизна поверхні рідини не впливала на вимірювання.
2. Помістити зразок розведеної ДНК у кварцову кювету.
3. Виміряти поглинання A260. Значення повинно лежати в межах 0,005-2,5 (див. зраз. 2). В іншому випадку необхідно розчиняти або концентрувати ДНК (див. зраз. 3).
4. Розрахувати концентрацію ДНК, використовуючи коефіцієнт перерахунку з таблиці, за формулою: $c, \text{ мкг/мл} = A_{260} \cdot K$.
5. Виміряти поглинання A280 і A235, щоб оцінити ступінь очищення ДНК від домішок білків і полісахаридів. Відношення 260/280, так само як і 260/235, має бути більше, ніж 1,8. Для чистої ДНК характерні значення $A_{260}/A_{280} = 1,8-1,9$ і $A_{260}/A_{235} = 2,2-2,5$, для чистої РНК - значення $A_{260}/A_{280} = 1,9-2,0$ (див. зраз. 4).
6. Відкрийте головну сторінку сайту MOLBIOL.RU [[http:// www.molbiol.ru](http://www.molbiol.ru)], знайдіть розділ «Розрахунки», виберіть пункт «Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК (РНК)» та розрахуйте концентрацію вашого зразка за допомогою спеціальної форми.

Примітки:

1. Для розчинення ДНК (РНК) можна використовувати інші низько сольові буфери, але тільки не воду. Наприклад, розчини 100 мМ NaCl, 20 мМ Na₃PO₄, 10-100 мМ трис-HCl (pH 7,5-9,0) або 100 мМ K₂HPO₄ (pH 8,2) дають подібні результати. Вимірювання в воді призводять до суттєвих відхилень. Помилка вимірювання може становити до 14%, і відношення A260/A280 виявляється заниженим.
2. Точність вимірювання падає при занадто великих і дуже малих значеннях A260 через порушення закону світлопоглинання. Помилка при значенні 0,05 становить $\cdot 18\%$, при значенні 0,1-1,0 $\cdot 1\%$. Вимірювання при значеннях понад 2,5 недостовірні.
3. Концентрують ДНК шляхом її переосадження спиртом.
4. Для олігонуклеотидів, поглинання яких відчутно залежить від їх складу, існують спеціальні розрахунки.
5. Ці значення достовірні, якщо вимір виконується в буферному розчині (наприклад, ТІ) при нейтральному значенні pH.

Коефіцієнти для розрахунку концентрації ДНК

Кислота	Коефіцієнт для дослідного нерозчиненого зразка, мкг/мл	Коефіцієнт (1/130) для розчиненого зразка, мкг/мл
ДНК (двуланцюгова)	50	6,5
ДНК (одноланцюгова)	37	4,81
РНК	40	5,2

Протокол досліджу:

Завдання 2. *Виконайте визначення концентрації нуклеїнових кислот мікрометодом*

У практичній діяльності буває необхідно здійснювати визначення концентрації і якості виділення нуклеїнових кислот відразу у великій кількості зразків за короткий проміжок часу. За допомогою описаної вище методики макроаналізу одночасно можна аналізувати не більше 3-4 зразків, при цьому значний час витрачається на приготування розведень НК, що є джерелом додаткових похибок. Для подолання виниклих труднощів застосовують мікропланшетні спектрофотометри. Нижче наведено приклад роботи на планшетному спектрофотометрі-рідері Infinit M200 pro (Tecan) з використанням спеціального мікропланшета Nano Quant plate. Даний прилад дозволяє проводити одночасний аналіз 16 зразків, використовуючи лише 2 мкл нерозчиненого розчину нуклеїнових кислот.

Для проведення роботи буде необхідне таке обладнання: планшетний спектрофотометр Infinit M200 pro (Tecan), підключений до комп'ютера, планшет Nano Quant, вата, автоматична піпетка (сAMPLер) змінного обсягу на 1-10 мкл, жовті наконечнику в штативі.

Для проведення роботи будуть необхідні такі розчини розчини: буфер TE, етанол, дистильована вода.

Хід роботи:

1. Увімкніть персональний комп'ютер і спектрофотометр. Кнопка включення приладу знаходиться на задній стінці. Коли прилад включений, на його верхній панелі в правому нижньому кутку горить зеленим кольором сигнал.
2. Запустіть програму «I-control 1-10». Коли програма завантажиться, зайдіть на панелі управління на вкладку «Instrument», натисніть кнопку «Connect» і виберіть у вікні установлення моделі приладу. Натисніть «OK». Тепер прилад готовий до роботи.
3. У діалоговому вікні, в нижньому лівому кутку виберіть закладку «Applications». У вас автоматично обрана програма для визначення якості і кількості нуклеїнових кислот з використанням планшета Nano Quant.
4. У випадаючому меню «Type» виберете тип зразка, який ви аналізуєте: деспіралізована геномна ДНК (dsDNA), РНК (RNA), суперспіралізована плазмідна ДНК (ssDNA).
5. Проведіть калібрування приладу. Для цього візьміть планшет, зніміть кришку. Нанесіть на кожну з лунок по 2 мкл буфера TE і накрийте планшет кришкою. Поставте планшет в прилад, натиснувши на зелену кнопку на верхній поверхні спектрофотометра. Коли планшет встановлений в прилад, у діалоговому вікні натисніть кнопку «Start Blanking». Після завершення калібрування у верхній частині діалогового вікна кнопка «Start» почне підсвічувати зеленим кольором.
6. Підготуйте планшет до вимірювання. Для цього відкрийте його, зітріть сухим ватним тампоном калібрувальний буфер, видаліть залишки буфера, протерши планшет зсередини тампоном, змоченим у воді, а після - тампоном, змоченим в етанолі. Дайте випаруватися етанолу.
7. Нанесіть зразки для аналізу. Вносьте по 2 мкл до лунки, використовуючи новий наконечник для кожного зразка. Після внесення зразків помістіть планшет в прилад, натисніть у діалоговому вікні кнопку «Start». Через кілька хвилин вимір буде завершено, після чого автоматично відкриється електронна таблиця, в якій будуть вказані: номер лунки, концентрація нуклеїнових кислот в даній лунці (в нГн/мкл, що відповідає мкг/мл), співвідношення оптичної щільності при довжині хвилі 260 нм і 280 нм. Це показник якості і чистоти виділення ДНК. Він повинен бути більше, ніж 1,8.
8. Очистіть планшет від зразків ДНК за допомогою ватного тампону, води і етанолу, як зазначено в пункті 6, і приберіть його в футляр.
9. Збережіть результати на флеш-карті, закрийте програму, вимкніть прилад і комп'ютер.

Протокол досліду:

ВИСНОВКИ:.....
.....
.....
.....
.....

Дата _____

Тема ЛЗ 7. ***Полімеразна ланцюгова реакція***

Мета заняття: Ознайомитись із процедурою ампліфікації ДНК і способами подальшого її аналізу. Оволодіти методиками аналізу і порівняння «генетичних відбитків пальців»

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

Завдання 1. *Опишіть основні стадії полімеразної ланцюгової реакції.
Замалюйте принципову її схему*

Завдання 2. Наведена електрофореграма продуктів ПЛР-ампліфікації трьох тетрануклеотидних мікросателітних локусів (CSF1PO, TPOX, THO1), які використані для ідентифікації особистості у зразках ДНК матері (М), дитини (Д) і трьох передбачуваних батьків (Б₁, Б₂, Б₃). L – калібровочний маркер, який відображає визначену кількість повторів відповідних локусів. Встановити, який з передбачуваних батьків є дійсним для дитини.

L	CSF1PO					L	TPOX					L	THO1					L
	М	Д	Б ₁	Б ₂	Б ₃		М	Д	Б ₁	Б ₂	Б ₃		М	Д	Б ₁	Б ₂	Б ₃	
-						-						-					-	
-				-		-						-		-			-	
-	-	-		-		-		-	-			-					-	
-			-			-	-			-		-	-				-	
-					-	-	-	-		-	-	-	-	-			-	
-		-	-		-	-	-			-			-	-			-	
-						-		-		-				-			-	
-						-				-							-	
-						-				-							-	

Наведена електрофореграма продуктів ПЛР-ампліфікації трьох тетрануклеотидних мікросателітних локусів (D16S539, D7S820, D13S317), які використані для ідентифікації особистості у зразках ДНК матері (М), батька (Б) і трьох дітей (Д₁, Д₂, Д₃). L – калібровочний маркер, який відображає визначену кількість повторів відповідних локусів. Встановити, хто з дітей не є рідними.

L	D16S539					L	D7S820					L	D13S317					L
	М	Д ₁	Д ₂	Д ₃	Б		М	Д ₁	Д ₂	Д ₃	Б ₃		М	Д ₁	Д ₂	Д ₃	Б ₃	
-						-						-					-	
-						-				-		-					-	
-	-		-			-		-			-	-		-			-	
-	-	-		-		-	-	-	-		-	-	-		-		-	
-		-	-		-	-					-	-		-			-	
-				-		-					-						-	
-						-					-						-	
-						-					-						-	

Завдання 3. У таблиці наведено результати індивідуального аналізу 9 мікросателітних локусів Y-хромосоми в групі з 10 чоловіків. Цифри свідчать про кількість мікросателітних повторів у певному локусі. Визначить двох ймовірних близьких родичів з чоловічої лінії. Вкажіть, які номери можуть їм відповідати (близькі родичі повинні мати однаковий набір алелей досліджених мікросателітних локусів Y-хромосоми)

Номер зразка	Локус								
	DYS 391	DYS 91	DYS 49a	DYS 390	DYS 392	DYS 331	DYS 31	DYS 397	DYS 367
1	23	11	18	14	14	11	11	13	17
2	23	11	18	13	14	12	11	13	17
3	25	10	18	14	14	11	11	13	17
4	26	11	16	13	12	13	11	12	16
5	25	10	18	14	14	11	11	13	16
6	23	11	17	13	14	12	11	13	17
7	26	11	17	13	12	13	11	12	16
8	25	10	18	14	14	11	11	13	17
9	26	9	17	13	14	13	11	12	16
10	24	10	18	13	14	11	11	13	17

Номер зразка	Локус								
	DYS 391	DYS 91	DYS 49a	DYS 390	DYS 392	DYS 331	DYS 31	DYS 397	DYS 367
1	25	10	17	13	14	11	10	13	16
2	26	10	18	14	13	11	11	13	18
3	27	10	17	12	14	11	10	12	16
4	23	10	17	13	14	11	10	13	16
5	26	11	18	14	14	10	11	13	16
6	24	10	17	14	14	11	11	13	16
7	27	9	17	13	14	11	10	13	16
8	26	10	18	14	14	11	11	13	16
9	25	12	17	13	14	11	10	13	17
10	26	11	18	14	14	10	11	13	16

Завдання 4. *Зазначте напрямки використання ПЛР*

ВИСНОВКИ:.....
.....
.....
.....
.....

Дата _____

Тема ЛЗ 8. **Секвенування**

Мета заняття: Ознайомитись із традиційними методами секвенування ДНК, а також методами нового покоління. Навчитись визначати нуклеотидну послідовність за допомогою зображення радіографа

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

Завдання 1. Охарактеризуйте процедуру хімічного секвенування та

замалюйте схематично цей процес

секвенування та замалюйте схематично цей процес

Завдання 3. *За допомогою зображення авторадіографа визначте нуклеотидну послідовність фрагменту ДНК*

ddA	ddT	ddG	ddC	3'
—				
	—			
—				
		—		
		—		
	—			
		—		
			—	
	—			
			—	
—				
	—			
			—	
		—		
—				
			—	
				5'

ddA	ddT	ddG	ddC	3'
		—		
		—		
—				
	—			
	—		—	
—				
		—		
—				
			—	
—				
		—		
	—			
		—		
			—	
	—			
				5'

Завдання 4. Визначити довжину і порядок добудованої за допомогою праймера послідовності:

A)

ddA	Праймер + 4	ddG	Праймер +2
	Праймер + 5		Праймер +3
	Праймер + 8		Праймер +10
ddT	Праймер +1	ddC	Праймер +6
	Праймер +11		Праймер +7
	Праймер + 12		Праймер +9

Праймер: _____

Б)

ddA	Праймер + 5	ddG	Праймер +1
	Праймер + 9		Праймер +8
	Праймер + 11		Праймер +12
ddT	Праймер +3	ddC	Праймер +2
	Праймер +4		Праймер +6
	Праймер + 10		Праймер +7

Праймер: _____

В)

ddA	Праймер + 2	ddG	Праймер +5
	Праймер + 9		Праймер +7
	Праймер + 12		Праймер +11
ddT	Праймер +1	ddC	Праймер +4
	Праймер +3		Праймер +8
	Праймер + 6		Праймер +10

Праймер: _____

В)

ddA	Праймер + 2	ddG	Праймер +1
	Праймер + 4		Праймер +7
	Праймер + 9		Праймер +10
ddT	Праймер +3	ddC	Праймер +6
	Праймер +5		Праймер +8
	Праймер + 12		Праймер +11

Праймер: _____

ВИСНОВКИ:.....
.....
.....
.....
.....

Дата _____

Тема ЛЗ 9. ***RAPD-аналіз***

Мета заняття: Ознайомитись із методиками RAPD-аналізу та навчитися його виконувати

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

Дата _____

Тема ЛЗ 10. ***ISSR-маркування. SSR-маркери***

Мета заняття: Ознайомитись із методиками ISSR-маркування та навчитися його виконувати. Вивчити SSR-маркери

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

Дата_____

Тема ЛЗ 11. ***AFLP-метод. SNP***

Мета заняття: Ознайомитись із методиками AFLP-методу та навчитися його виконувати. Вивчити SNP

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

Дата _____

Тема ПЗ 2. **Електрофорез білків та нуклеїнових кислот**

Мета заняття: Засвоїти методики електрофорезу білків та нуклеїнових кислот та навчитися їх виконувати

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

Дата _____

Тема ПЗ 3. ***Полімеразна ланцюгова реакція. Секвенування***

Мета заняття: Засвоїти методики ПЛР та секвенування нуклеїнових кислот та навчитися їх виконувати

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

Модуль 3:

Особливості молекулярно-генетичної діагностики

Дата _____

Тема ПЗ 4. ***Особливості діагностики геномів флори та фауни***

Мета заняття: Засвоїти традиційні методики діагностики геномів флори та фауни та навчитися їх виконувати

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

Дата _____

Тема ПЗ 5. **Особливості діагностики геномів *Homo sapiens***

Мета заняття: Засвоїти традиційні методики діагностики геномів *Homo sapiens* та навчитися їх виконувати

Матеріали та обладнання:

Методичні вказівки:

ЛІТЕРАТУРА

1. Молекулярна генетика та технології дослідження генома / [М. І. Гиль, О. Ю. Сметана, О. І. Юлевич та ін.] ; за ред. професора М. І. Гиль. – Миколаїв : МНАУ, 2014. – 280 с.
2. Давыдова О.К. Методы генетических исследований микроорганизмов: учебное пособие. – Оренбург: ОГУ, 2013. – 132 с. (Електронний ресурс. – Режим доступу: http://biblioclub.ru/index.php?page=book_view_red&book_id=25916 1)
3. Применение молекулярных методов исследования в генетике: Учебное пособие / Нефедова Л.Н. – М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. – 104 с.: 60x90 1/16. – (Высшее образование: Бакалавриат) (Обложка) ISBN 978-5-16-009872/2 <http://znanuim.com/catalog/product/558481>
4. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений: учеб.-метод. пособие / Н.А. Кутлунина, А.А., Ермошин; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2017, - 142 с. ISBN 978-5-7996-2142-1
5. Цитогенетические, молекулярные и клинические основы генетически обусловленных болезней: учебное пособие / И.Ю. Юров, С.Г. Ворсанова, В.Ю. Воинова, М.И. Чупсунов, Ю.Б. Юров. – м.: Издательский дом Академии Естествознания, 2019, - 164 с. ISBN 978-5-91327-581-3 DOI 10.17513/np.351
6. Корнева О.С., Калаев В.Н., Нечаева М.С., Гойкалова О.Ю. Молекулярная биология. Лабораторный практикум: учеб. Пособие. – Воронеж: ВГУИТ, 2015. – 52 с. (Електронний ресурс. – Режим доступу: http://biblioclub.ru/index.php?page=book_view_red&book_id=33601 8)
7. Загальна і молекулярна генетика: Практикум / С.В. Демідов, В.Ф. Безруков, А.В. Сиволоб і ін. – К.: Фітосоціоцентр, 2005. – 239 с.
1. Генетика / Б. Гутман, Э. Гриффитс, Д. Сузуки, О. Куллист; Пер. с англ. О. Перфилова. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 2004. – 448 с.
2. Общая и молекулярная генетика: Учебное пособие / И.Ф. Жимулев. – Новосибирск, 203. – 479 с.
3. Генетична інженерія / В.І. Ніколайчук, І.Ю. Горбатенко. – Ужгород, 1999. – 189 с.
4. Структура и экспрессия гена / Дж. Хоукинс. – К.: Наукова думка, 1991. – 168 с.
5. Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии / Дж.У. Снедекор. – М.: Издательство с.-х. литературы, журналов и плакатов, 1961. – 503 с.
6. Аналіз структури популяцій / В.С. Шибанін, С.І. Мельник, С.С. Крамаренко та ін. – Миколаїв: МДАУ, 2008. – 226 с.

7. Методи непараметричної статистики: практикум з біометрії / О.В. Шибаніна, С.С. Крамаренко, В.М. Ганганов. – Миколаїв: МДАУ, 2008. – 166 с.
8. Молекулярная эволюция и филогенетика / М. Ней, С. Кумар. – К.: КВЦ, 2004. – 404 с.
9. Генетика з біометрією : практикум / [М.Г. Повод, Т.І. Нежлукченко, Н.С. Папакіна, Д.І. Барановський, М.І. Гиль, В.І. Халак, О.В. Черемисова, Н.В. Нежлукченко] За ред. Професора Т.І. Нежлукченко – Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2015. – 380 с.
10. Генетика з біометрією / З.Є. Щербатий, М.І. Гиль, В.Ф. Кос та ін. – Львів, ЛКТ ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького, 2009. – 286 с.

Додаток А

Словник генетичного коду для амінокислот

Перший нуклеотид (на 5'-кінці кодону)	Другий нуклеотид	Третій нуклеотид (на 3'-кінці кодону)			
		У	Ц	А	Г
У	У	Фенілаланін	Фенілаланін	Лейцин	Лейцин
	Ц	Серин	Серин	Серин	Серин
	А	Тирозин	Тирозин	Термінатор	Термінатор
	Г	Цистеїн	Цистеїн	Термінатор	Триптофан
Ц	У	Лейцин	Лейцин	Лейцин	Лейцин
	Ц	Пролін	Пролін	Пролін	Пролін
	А	Гістидин	Гістидин	Глутамін	Глутамін
	Г	Аргінін	Аргінін	Аргінін	Аргінін
А	У	Ізолейцин	Ізолейцин	Ізолейцин	Метіонін
	Ц	Треонін	Треонін	Треонін	Треонін
	А	Аспарагін	Аспарагін	Лізін	Лізін
	Г	Серин	Серин	Аргінін	Аргінін
Г	У	Валін	Валін	Валін	Валін
	Ц	Аланін	Аланін	Аланін	Аланін
	А	Аспарагінова кислота	Аспарагінова кислота	Глутамінова кислота	Глутамінова кислота
	Г	Гліцин	Гліцин	Гліцин	Гліцин

Додаток Б

Стандартні значення критерію Ст'юдента (t)

<i>df</i>	Рівень вірогідності (α)			<i>df</i>	Рівень вірогідності (α)		
	0,05	0,01	0,001		0,05	0,01	0,001
1	12,706	63,657	636,619	31	2,040	2,744	3,633
2	4,303	9,925	31,599	32	2,037	2,738	3,622
3	3,182	5,841	12,924	33	2,035	2,733	3,611
4	2,776	4,604	8,610	34	2,032	2,728	3,601
5	2,571	4,032	6,869	35	2,030	2,724	3,591
6	2,447	3,707	5,959	36	2,028	2,719	3,582
7	2,365	3,499	5,408	37	2,026	2,715	3,574
8	2,306	3,355	5,041	38	2,024	2,712	3,566
9	2,262	3,250	4,781	39	2,023	2,708	3,558
10	2,228	3,169	4,587	40	2,021	2,704	3,551
11	2,201	3,106	4,437	41	2,020	2,701	3,544
12	2,179	3,055	4,318	42	2,018	2,698	3,538
13	2,160	3,012	4,221	43	2,017	2,695	3,532
14	2,145	2,977	4,140	44	2,015	2,692	3,526
15	2,131	2,947	4,073	45	2,014	2,690	3,520
16	2,120	2,921	4,015	46	2,013	2,687	3,515
17	2,110	2,898	3,965	47	2,012	2,685	3,510
18	2,101	2,878	3,922	48	2,011	2,682	3,505
19	2,093	2,861	3,883	49	2,010	2,680	3,500
20	2,086	2,845	3,850	50	2,009	2,678	3,496
21	2,080	2,831	3,819	60	2,000	2,660	3,460
22	2,074	2,819	3,792	70	1,994	2,648	3,435
23	2,069	2,807	3,768	80	1,990	2,639	3,416
24	2,064	2,797	3,745	90	1,987	2,632	3,402
25	2,060	2,787	3,725	100	1,984	2,626	3,390
26	2,056	2,779	3,707	200	1,972	2,601	3,340
27	2,052	2,771	3,690	300	1,968	2,592	3,323
28	2,048	2,763	3,674	400	1,966	2,588	3,315
29	2,045	2,756	3,659	500	1,965	2,586	3,310
30	2,042	2,750	3,646	1000	1,962	2,581	3,300

Додаток Д

Стандартні значення критерію Пірсона (χ^2)

<i>df</i>	Рівень вірогідності (α)			<i>df</i>	Рівень вірогідності (α)		
	0,05	0,01	0,001		0,05	0,01	0,001
1	3,841	6,635	10,828	31	44,985	52,191	61,098
2	5,991	9,210	13,816	32	46,194	53,486	62,487
3	7,815	11,345	16,266	33	47,400	54,776	63,870
4	9,488	13,277	18,467	34	48,602	56,061	65,247
5	11,070	15,086	20,515	35	49,802	57,342	66,619
6	12,592	16,812	22,458	36	50,998	58,619	67,985
7	14,067	18,475	24,322	37	52,192	59,893	69,346
8	15,507	20,090	26,124	38	53,384	61,162	70,703
9	16,919	21,666	27,877	39	54,572	62,428	72,055
10	18,307	23,209	29,588	40	55,758	63,691	73,402
11	19,675	24,725	31,264	41	56,942	64,950	74,745
12	21,026	26,217	32,909	42	58,124	66,206	76,084
13	22,362	27,688	34,528	43	59,304	67,459	77,419
14	23,685	29,141	36,123	44	60,481	68,710	78,750
15	24,996	30,578	37,697	45	61,656	69,957	80,077
16	26,296	32,000	39,252	46	62,830	71,201	81,400
17	27,587	33,409	40,790	47	64,001	72,443	82,720
18	28,869	34,805	42,312	48	65,171	73,683	84,037
19	30,144	36,191	43,820	49	66,339	74,919	85,351
20	31,410	37,566	45,315	50	67,505	76,154	86,661
21	32,671	38,932	46,797	51	68,669	77,386	87,968
22	33,924	40,289	48,268	52	69,832	78,616	89,272
23	35,172	41,638	49,728	53	70,993	79,843	90,573
24	36,415	42,980	51,179	54	72,153	81,069	91,872
25	37,652	44,314	52,620	55	73,311	82,292	93,168
26	38,885	45,642	54,052	56	74,468	83,513	94,461
27	40,113	46,963	55,476	57	75,624	84,733	95,751
28	41,337	48,278	56,892	58	76,778	85,950	97,039
29	42,557	49,588	58,301	59	77,931	87,166	98,324
30	43,773	50,892	59,703	60	79,082	88,379	99,607

Додаток В

Стандартні значення критерію Фішера (F) для $\alpha = 0,05; 0,01; 0,001$

$df_1 \backslash df_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79
	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,35	27,23
	167,03	148,50	141,11	137,10	134,58	132,85	131,58	130,62	129,86	129,25
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96
	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66	14,55
	74,14	61,25	56,18	53,44	51,71	50,53	49,66	49,00	48,47	48,05
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74
	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,46	10,29	10,16	10,05
	47,18	37,12	33,20	31,09	29,75	28,83	28,16	27,65	27,24	26,92
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06
	13,75	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98	7,87
	35,51	27,00	23,70	21,92	20,80	20,03	19,46	19,03	18,69	18,41
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64
	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,99	6,84	6,72	6,62
	29,25	21,69	18,77	17,20	16,21	15,52	15,02	14,63	14,33	14,08
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35
	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,18	6,03	5,91	5,81
	25,41	18,49	15,83	14,39	13,48	12,86	12,40	12,05	11,77	11,54
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14
	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,61	5,47	5,35	5,26
	22,86	16,39	13,90	12,56	11,71	11,13	10,70	10,37	10,11	9,89
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98
	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,20	5,06	4,94	4,85
	21,04	14,91	12,55	11,28	10,48	9,93	9,52	9,20	8,96	8,75
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75
	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	4,39	4,30
	18,64	12,97	10,80	9,63	8,89	8,38	8,00	7,71	7,48	7,29
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67
	9,07	6,70	5,74	5,21	4,86	4,62	4,44	4,30	4,19	4,10
	17,82	12,31	10,21	9,07	8,35	7,86	7,49	7,21	6,98	6,80
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60
	8,86	6,51	5,56	5,04	4,69	4,46	4,28	4,14	4,03	3,94
	17,14	11,78	9,73	8,62	7,92	7,44	7,08	6,80	6,58	6,40
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54
	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,14	4,00	3,89	3,80
	16,59	11,34	9,34	8,25	7,57	7,09	6,74	6,47	6,26	6,08
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49
	8,53	6,23	5,29	4,77	4,44	4,20	4,03	3,89	3,78	3,69
	16,12	10,97	9,01	7,94	7,27	6,80	6,46	6,19	5,98	5,81

Продовження додатку В

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45
	8,40	6,11	5,18	4,67	4,34	4,10	3,93	3,79	3,68	3,59
	15,72	10,66	8,73	7,68	7,02	6,56	6,22	5,96	5,75	5,58
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41
	8,29	6,01	5,09	4,58	4,25	4,01	3,84	3,71	3,60	3,51
	15,38	10,39	8,49	7,46	6,81	6,35	6,02	5,76	5,56	5,39
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38
	8,18	5,93	5,01	4,50	4,17	3,94	3,77	3,63	3,52	3,43
	15,08	10,16	8,28	7,27	6,62	6,18	5,85	5,59	5,39	5,22
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35
	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,70	3,56	3,46	3,37
	14,82	9,95	8,10	7,10	6,46	6,02	5,69	5,44	5,24	5,08
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32
	8,02	5,78	4,87	4,37	4,04	3,81	3,64	3,51	3,40	3,31
	14,59	9,77	7,94	6,95	6,32	5,88	5,56	5,31	5,11	4,95
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30
	7,95	5,72	4,82	4,31	3,99	3,76	3,59	3,45	3,35	3,26
	14,38	9,61	7,80	6,81	6,19	5,76	5,44	5,19	4,99	4,83
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27
	7,88	5,66	4,76	4,26	3,94	3,71	3,54	3,41	3,30	3,21
	14,20	9,47	7,67	6,70	6,08	5,65	5,33	5,09	4,89	4,73
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25
	7,82	5,61	4,72	4,22	3,90	3,67	3,50	3,36	3,26	3,17
	14,03	9,34	7,55	6,59	5,98	5,55	5,23	4,99	4,80	4,64
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24
	7,77	5,57	4,68	4,18	3,85	3,63	3,46	3,32	3,22	3,13
	13,88	9,22	7,45	6,49	5,89	5,46	5,15	4,91	4,71	4,56
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22
	7,72	5,53	4,64	4,14	3,82	3,59	3,42	3,29	3,18	3,09
	13,74	9,12	7,36	6,41	5,80	5,38	5,07	4,83	4,64	4,48
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,20
	7,68	5,49	4,60	4,11	3,78	3,56	3,39	3,26	3,15	3,06
	13,61	9,02	7,27	6,33	5,73	5,31	5,00	4,76	4,57	4,41
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19
	7,64	5,45	4,57	4,07	3,75	3,53	3,36	3,23	3,12	3,03
	13,50	8,93	7,19	6,25	5,66	5,24	4,93	4,69	4,50	4,35
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18
	7,60	5,42	4,54	4,04	3,73	3,50	3,33	3,20	3,09	3,00
	13,39	8,85	7,12	6,19	5,59	5,18	4,87	4,64	4,45	4,29
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16
	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,30	3,17	3,07	2,98
	13,29	8,77	7,05	6,12	5,53	5,12	4,82	4,58	4,39	4,24
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08
	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	3,12	2,99	2,89	2,80
	12,61	8,25	6,59	5,70	5,13	4,73	4,44	4,21	4,02	3,87

Навчальне видання

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ

Робочий зошит

Укладач:
Гиль Михайло Іванович

Формат 64×84 1/8. Ум. друк. арк. 9,2
Тираж 20 прим. Зам. № _____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.