

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
«ДНІПРОВСЬКА ПОЛІТЕХНІКА»



НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ

Кафедра екології та технологій захисту навколишнього середовища

Ю.С. Воронкова, А.І. Вінніков, О.С. Воронкова

## **МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**  
до виконання практичної роботи

**«МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ»**

для студентів освітньо-професійної програми «Біологія»  
першого (бакалаврського) рівня вищої освіти  
спеціальності 091 Біологія та біохімія

Дніпро  
НТУ «ДП»  
2023

**Воронкова Ю.С.**

Молекулярна біологія. Методичні рекомендації до виконання практичної роботи «Методи молекулярно-генетичних досліджень» для студентів освітньо-професійної програми «Біологія» першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 091 Біологія та біохімія / Ю.С. Воронкова, А.І. Вінніков, О.С. Воронкова ; М-во освіти і науки України, Нац. техн. ун-т «Дніпровська політехніка». – Дніпро : НТУ «ДП», 2023. – 22 с.

## Укладачі:

Ю.С. Воронкова, канд. біол. наук, доц.

А.І. Вінніков, д-р біол. наук, проф.

О.С. Воронкова, д-р біол. наук, проф.

Затверджено науково-методичною комісією спеціальності 091 Біологія та біохімія (протокол № 7 від 17.11.2023) за поданням кафедри екології та технологій захисту навколишнього середовища (протокол № 4 від 17.11.2023).

Подано методичні рекомендації до виконання практичної роботи для студентів освітньо-професійної програми «Біологія» першого (бакалаврського) рівня вищої освіти. Орієнтовано на активізацію навчальної діяльності бакалаврів спеціальності 091 Біологія та біохімія та закріплення практичних знань з даної дисципліни.

Відповідальна за випуск – завідувачка кафедри екології та технологій захисту навколишнього середовища О.О. Борисовська, канд. техн. наук, доц.

## **ЗМІСТ**

<b>ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ</b>	<b>4</b>
<b>1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА</b>	<b>5</b>
1.1.1 Компоненти та етапи ПЛР	7
1.1.2 Ампліфікатори та ПЛР-системи	8
1.1.3 Різноводи ПЛР	10
<b>1.2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА</b>	<b>12</b>
1.2.1 Добір праймерів	12
1.2.2 Проведення ампліфікації	13
<b>1.3 САМОСТІЙНА РОБОТА</b>	<b>14</b>
<b>КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ</b>	<b>19</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ТА РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</b>	<b>20</b>

## ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Дисципліна «Молекулярна біологія» є фаховим освітнім компонентом за спеціальністю для здобувачів освітньо-професійної програми «Біологія» першого (бакалаврського) рівня вищої освіти. Молекулярна біологія є одним з одним з найбільш перспективних напрямків наукових та прикладних досліджень. Наукові досягнення та відкриття молекулярної біології визначили виникнення та подальше становлення генетичної інженерії, молекулярної медицини, біотехнології. Одним із розділів сучасної молекулярної біології є використання молекулярно-генетичних методів дослідження; одним із яких є полімеразна ланцюгова реакція, яка використовується у біологічній та медичній практиці.

Методичні рекомендації призначені для закріплення теоретичних знань, набутих здобувачами в лекційному курсі за темою методи молекулярно-генетичних досліджень, а також знайомлять з різними моделями полімеразної ланцюгової реакції та сферою їх застосування.

Методичні рекомендації включають подання теоретичних положень за темою, практичну частину, текст якої викладено за типовою структурною схемою: тема, мета роботи, алгоритм виконання практичної роботи, а також завдання для самостійного виконання та питання для самоконтролю.

***В результаті виконання практичної роботи студенти повинні засвоїти:***

- ❖ основні методи молекулярно-генетичних досліджень, сферу їх застосування;
- ❖ особливості проведення ПЛР, основні етапи та вимоги до цих етапів;
- ❖ сферу застосування ПЛР, особливості використання у біологічних та медичних дослідженнях;
- ❖ вимоги до оснащення ПЛР-діагностичної лабораторії;
- ❖ відмінності різних типів ПЛР та специфічність їх використання.

## ПРАКТИЧНА РОБОТА

### МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ

**Мета роботи:** засвоїти основні методи молекулярно-генетичних досліджень, сферу їх застосування; опанувати методику виконання полімеразної ланцюгової реакції.

**Матеріали та обладнання:** ПЛР-ампліфікатор, ДНК відповідного гену (40 нг/мкл), праймери (10 пМ/мкл), суміш нуклеотидів dNTP-mix (2 мМ), розчин хлориду магнію (25 мМ), Таq-полімераза (5 од/мкл), ПЛР-буфер, реакційна суміш (кінцевий об'єм 20 мкл): ПЛР-буфер (200 мМ Tris-HCl, pH 8,4; 500 мМ KCl; 0,01% Твін-20) – 2 мкл; 2 мМ dNTP-mix (суміш з усіх 4-х дезоксирибонуклеозидтрифосфатів з концентрацією по 2 мМ кожного) – 2 мкл; 25 мМ розчин MgCl<sub>2</sub> – 2 мкл; праймери прямий та зворотній – по 2 мкл; ДНК-мішень – 3 мкл; вода деіонізована – 6,8 мкл; Таq-полімераза – 0,2 мкл.

В результаті виконання практичної роботи будуть сформовані наступні **результати навчання:** розуміти структурну організацію біологічних систем на молекулярному рівні.

#### 1.1 ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Виникнення генної інженерії стало можливим завдяки синтезу ідей і методів молекулярної біології, генетики, біохімії і мікробіології. Основні принципи генної інженерії були розроблені у 60-70-х роках ХХ сторіччя. Вони включали три основних етапи:

- 1 - отримання генетичного матеріалу (штучний синтез або виділення природних генів);
- 2 - включення цих генів у генетичну структуру, яка реплікується автономно (векторну молекулу ДНК), тобто створення рекомбінантної молекули ДНК;
- 3 - введення векторної молекули (з включеним у неї геном) у клітину-реципієнта, де вона вмонтовується в хромосомний апарат.

Для реалізації будь-якої з цих стадій використовують методи розщеплення ДНК на фрагменти, встановлення послідовності цих фрагментів, їх модифікації і реконструкції у нові молекули.

Сьогодні ці методи є одними з найбільш застосовуваних для отримання різних продуктів, що знайшли широке застосування у агропромисловому комплексі та медицині. Ці методи дозволяють досліджувати генетичний матеріал та виконувати з ним різні маніпуляції, що відкриває нові можливості для сучасного виробництва.

До найважливіших методів молекулярної генетики, що лежать в основі геномних технологій і ДНК-діагностики, належать: секвенування генів, полімеразна ланцюгова реакція, застосування генетичних маркерів та ін.

Принцип методу полімеразної ланцюгової реакції був розроблений

американським біохіміком Кері Мюлліс у 1983 році. Саме в цей період розглядався проект «Геном людини», а наприкінці того ж десятиліття розпочалася його реалізація. З того часу полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) стала дійсно фундаментальною для багатьох біологічних та біомедичних досліджень. Перша публікація про метод ПЛР з'явилася в листопаді 1985 року в журналі Science (Saiki RK, Scharf S., Faloona F., Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Science 1985 Dec 20; 230 (4732): 1350-4; Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia). У 1993 р. К. Мюлліс отримав Нобелівську премію у галузі хімії за своє відкриття. ПЛР стала також можливою завдяки відкриттю ферменту *Taq*-ДНК-полімерази, який володіє винятковою термостійкістю.

В перших методах ПЛР використовували фрагмент Кленова ДНК-полімерази *E. coli*. Цей фермент, однак, денатурується за більш низької температури, ніж це потрібно для більшості матричних дуплексів.

Таким чином, в ранніх експериментах свіжий фермент слід було додавати в реакцію після кожного циклу. На додаток, зразки слід було переміщати з однієї термальної лазні в іншу, щоб забезпечити здійснення окремих етапів – денатурації, відпалу і полімеризації.

Використання термостабільної ДНК-полімерази полегшило процес, оскільки додавання ферменту після кожного етапу денатурації більше не було необхідним. Зазвичай, ДНК-полімерази здатні приєднувати нуклеотиди тільки з 3'-кінця полінуклеотиду. Першою використаною термостабільною ДНК полімеразою була *Taq*-ДНК-полімераза, виділена з термофільних екстремальних бактерій *Thermus aquaticus*.

Широке впровадження новітніх досягнень молекулярної біології, серед яких аналіз генома людини, генетична інженерія та генна терапія, дозволяють розкрити молекулярні та генетичні механізми функціонування живих організмів, опанувати новітні методи та методики, засвоїти принципи діагностики та моніторингу цілої низки захворювань та патологічних станів, прослідкувати еволюційний шлях розвитку та вдосконалити існуючі протоколи діагностики та лікування. Результати, що було отримано завдяки кропіткій роботі вчених та їх досліджень у сфері молекулярної біології лягли в основу створення принципово нових підходів в діагностиці і лікуванні багатьох соціально значущих захворювань.

**Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)** – молекулярно-біологічний метод, що дозволяє збільшити (до  $10^{12}$  разів) кількість копій певного фрагмента ДНК *in vitro*, має високу аналітичну чутливість та специфічність. Також перевагою є швидкість виконання досліджень.

Метод заснований на багаторазовому вибірковому копіюванні певного фрагменту ДНК за допомогою ферментів у штучних умовах. При цьому відбувається копіювання тільки того фрагменту ДНК, який задовольняє заданим умовам, і тільки у тому випадку, якщо він присутній у досліджуваному зразку. На відміну від

реплікації ДНК у клітинах живих організмів, за допомогою ПЛР ампліфікують порівняно короткі ділянки ДНК (зазвичай, не більше 3 000 пар нуклеотидів, проте є методи дозволяють «піднімати» до 20 000 пар нуклеотидів – це так звана Long Range ПЛР).

### 1.1.1 Компоненти та етапи ПЛР

Фактично, ПЛР є штучною багаторазовою реплікацією фрагмента ДНК за рахунок роботи ДНК-полімерази за наявності матриці, праймера і мономерів. Праймер – це короткий одноланцюговий фрагмент нуклеїнової кислоти, комплементарний ДНК-матриці. У ПЛР в якості праймерів використовують штучно синтезовані молекули ДНК, які обмежують ампліфіковану ділянку по обидва боки.

У реакційній суміші для ПЛР повинні міститися: ДНК-матриця, праймери, ДНК-полімераза, вільні нуклеозиди, а також інші речовини, що активують роботу полімерази (їх додають у спеціальні буфери, що використовуються в реакції).

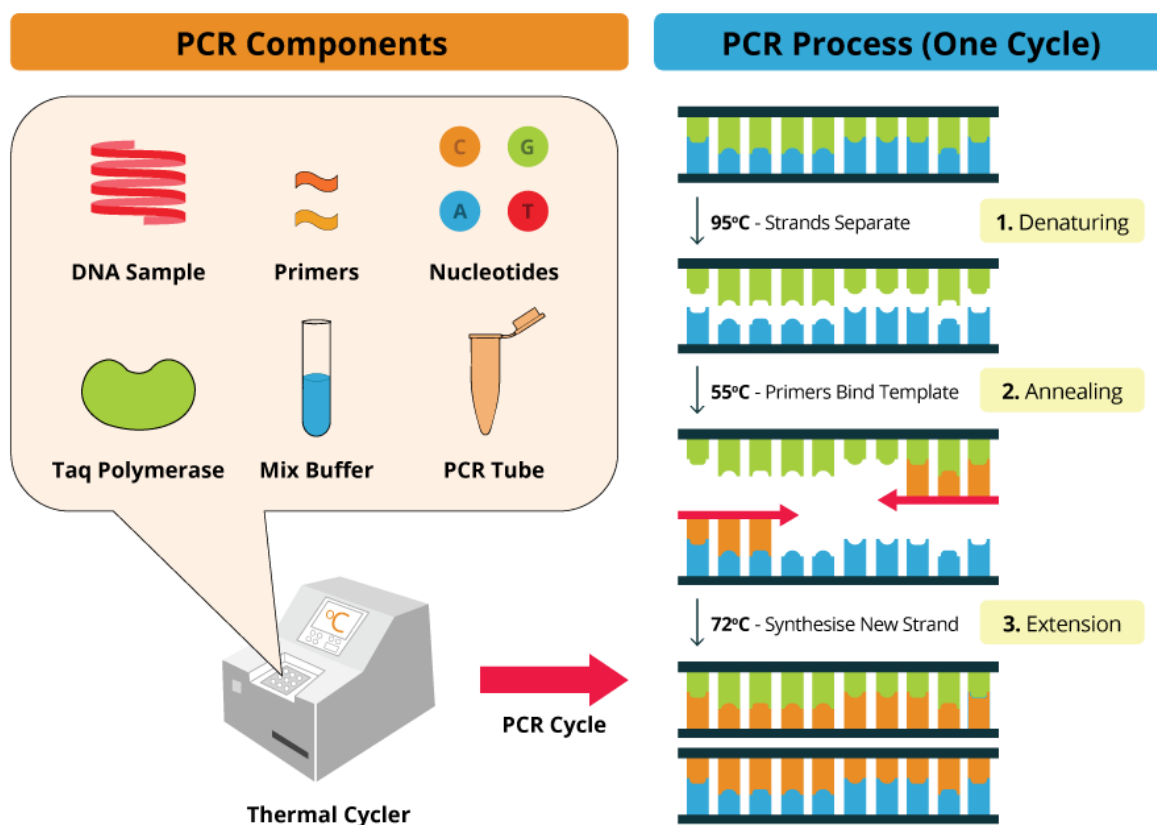
ПЛР включає три циклічно повторювані стадії (рис.1):

1) денатурацію ДНК – розплетання подвійної спіралі ДНК і відокремлення полінуклеотидних ланцюгів;

2) відпал праймерів – гібридизація праймерів і одноланцюгової ДНК-мішені з утворенням дволанцюгових комплексів «праймер-матриця», необхідних для ініціації синтезу ДНК з мономерів – дезоксирибонуклеозидтрифосфатів;

3) полімеризацію – добудову (подовження, елонгацію) комплементарних ланцюгів ДНК ферментом ДНК-полімеразою у напрямку 5'→3', починаючи від 3'-ОН-кінця приєднаних праймерів, тобто матричний синтез ДНК.

Перебіг ПЛР, тобто перехід від стадії до стадії і від циклу до циклу, регулюється зміною температури. Стадія денатурації відбувається при температурі 95 °С, а відпал – при 50-65 °С. Елонгація матеріалу відбувається за оптимальної для активності ДНК-полімерази *Taq* з термофільної бактерії *Thermus aquaticus* за температури 72 °С. Кожен з етапів циклу має продовжність від десятків секунд до 1-3 хв, в результаті повний цикл триває від одної до декількох хвилин. За 30-40 циклів у розчині накопичується близько  $10^8$  молекул, що достатньо для візуальної детекції цього фрагмента за допомогою методу електрофорезу в агарозному гелі. Для ефективного проведення ПЛР необхідно забезпечити багатостадійний циклічний режим зміни температури.



**Рис.1. Необхідні компоненти для проведення полімеразної ланцюгової реакції та механізм ампліфікації**

Кожна стадія циклу (денатурація, відпал, елонгація) повинна відбуватися при певних температурах та впродовж відповідного часу. В іншому випадку необхідних перетворень молекул ДНК може не відбутися. Для забезпечення таких умов додатково використовують математичне моделювання і відповідні розрахунки, які полягають в оцінюванні мінімально необхідного часу реалізації кожної стадії циклу, що в загальному випадку забезпечить досягнення мінімального часу проведення ПЛР.

### 1.1.2 Ампліфікатори та ПЛР-системи

Для проведення ПЛР використовують ДНК-ампліфікатори, або термоциклери (рис.2), що забезпечують можливість програмування та підтримки оптимальної температури, необхідної для проходження процесів реакції (денатурація молекули ДНК, відпалювання з праймерами і синтез фрагмента ДНК). Є можливість програмувати гарячий старт.





А



Б



В



Г

**Рис.2. ПЛР-Ампліфікатори: А – система ПЛР в реальному часі Gentier 48E, Б - ампліфікатор Real-Time CFX96 Touch, В – система ПЛР в реальному часі QuantStudio™ 5, Г – ПЛР-ампліфікатор в реальному часі Gentier 96E.**

Ампліфікатор ПЛР – спеціалізоване обладнання, за допомогою якого медицина вийшла на новий рівень. Він дозволяє визначати широкий спектр захворювань, що викликаються різними факторами. Активно використовується в медицині, криміналістиці, наукових дослідженнях, розкопках тощо.

#### *Принцип роботи ПЛР-системи*

Апарат для ПЛР дозволяє провести аналіз будь-якого біоматеріалу (матеріал від живого, так і мертвого організму). Це може бути волосся, різноманітні рідини, що виділяються організмом, кров, шкіра, гній тощо. За допомогою ПЛР-системи можна провести складний високотехнологічний процес з багаторазовою ампліфікацією (подвоєнням) досліджуваної ділянки ДНК з використанням певних ферментів. Головна особливість методики – можливість використання мінімальної кількості біоматеріалу. Крім того, спосіб допомагає виявити шкідливі мікроорганізми, які неможливо виростити при бакпосіві.

Тест-системи для ПЛР-діагностики мають низку переваг:

- специфіка дослідження;
- прямий метод діагностики;
- висока точність.

Комерційні набори для ПЛР містять всі необхідні компоненти за винятком

праймера, який обирається індивідуально, залежно від послідовності, яку намагаються виявити.

ПЛР дозволяє проводити безліч маніпуляцій з генетичним матеріалом і широко використовується у біологічній та медичній практиці, наприклад для клонування генів, введення мутацій, виділення нових генів, секвенування, для створення і визначення генетично модифікованих організмів, діагностики захворювань (спадкових, інфекційних), ідентифікації малих кількостей ДНК, встановлення батьківства тощо.

### 1.1.3 Різновиди ПЛР

На сьогодні існує декілька модифікацій ПЛР, розробляються нові ампліфікаційні технології, які основані на клонуванні як ДНК, так і РНК-фрагментів. На клінічному матеріалі можна використовувати лігазну ланцюгову реакцію (ЛЛР, LCR), NASBA (Nucleic Acids Sequence-Based Amplification), метод з використанням QВ-реплікази.

*Різновиди ПЛР:*

*Мультиплексна або мультипраймерна ПЛР (multiplex PCR)* заснована на одночасній ампліфікації в одній реакції декількох екзонів досліджуваного гена, з використанням декількох праймерів, що дозволяє проводити економний експрес-скринінг найбільш частих мутацій в гені. Мультиплексні ПЛР використовують для визначення делецій у гені дистрофіну, на частку яких припадає 60 % усіх мутацій, які спричиняють дистрофію Дюшена. Якщо делеції відсутні, фрагменти ДНК зафарбовуються рівномірно, якщо ж у досліджуваній ДНК деякі екзони делетовані, то на електрофореграмі будуть відсутні фрагменти відповідних екзонів. Недоліком методу є те, що він не виявляє делеції, що перебувають в гетерозиготному стані або локалізовані в аутосомних генах.

*RT-PCR (Reverse Transcription PCR)* – ПЛР з використанням зворотної транскрипції). Вихідним продуктом є РНК, на якій за допомогою ферменту зворотної транскриптази отримують ДНК, з якою вже і проводять ПЛР. Це зручно, наприклад, для того, щоб виявити, які саме гени в даній клітині експресуються.

Одноланцюгову молекулу РНК перетворюють в реакції зворотної транскрипції в кДНК і далі ампліфікують вже одноланцюгову молекулу ДНК, використовуючи традиційну ПЛР. Для перетворення послідовності РНК в кДНК використовують зворотну транскриптазу або ревертазу. RT-ПЛР проводиться в послідовності: 1 - реакція першого ланцюжка: кДНК утворюється на матриці мРНК з дНТФ ферментом ревертазою. Компоненти реакції змішуються з ДНК-праймером і буфером із ревертазою на 1 год. при 37°C; 2 - реакція другого ланцюжка: після того як зворотна транскрипція закінчена і утворена кДНК на матриці мРНК, наступні цикли проводяться за стандартною методикою ПЛР. Після 30 циклів ампліфікації утворюються мільйони копій потрібної послідовності.

RT-PCR не слід плутати з ПЛР в реальному часі, яку також іноді скорочують як RT-PCR.

*ПЛР довгих фрагментів (Long-range PCR)* використовується для ампліфікації довгих ділянок ДНК (10 тис. і більше). Використовують дві полімерази, одна з яких – Taq-полімераза з високою процесивністю (тобто полімераза, яка здатна за один прохід синтезувати довгий ланцюг ДНК), а друга — ДНК полімераза з 3'-5'-ендонуклеазною активністю, зазвичай це Pfu-полімераза. Друга полімераза необхідна для того, щоб коригувати помилки, внесені першою, так як Taq-полімераза зупиняє синтез ДНК якщо додано некомплементарний нуклеотид. Цей некомплементарний нуклеотид видаляє Pfu- полімераза. Суміш полімераз береться у пропорції 50:1 або навіть менше 100:1, де Taq-полімераза береться в 25-100 разів більше по відношенню до Pfu-полімерази..

*Метил-специфічна ПЛР – МС-ПЛР (methyl-specific PCR – MS-PCR)*. Суть цієї реакції полягає в наступному. ДНК обробляють бісульфітом натрію, в результаті чого всі неметиловані залишки цитозину конвертуються в урацил, а метиловані не змінюються. Після цього проводять ПЛР з праймерами, відповідними метилованій і неметилованій послідовностям. По тому, з якою парою праймерів відбувається ампліфікація, можна судити про метилювання. З недоліків даного методу, можна відзначити складність в підборі праймерів, неповну конверсію, можливість оцінки тільки одиничних CpG-динуклеотидів. Однак метод відносно дешевий, специфічний і простий, що дозволяє його широко використовувати в діагностиці злоякісних новоутворень та хвороб імпринтингу.

*Ступінчаста ПЛР (touchdown ПЛР)* – за допомогою цього підходу зменшують вплив неспецифічного зв'язування праймерів. Перші цикли проводять при температурі вище оптимальної температури відпалу, потім кожні декілька циклів температуру відпалу поступово знижують до оптимальної. Це робиться для того, щоб праймер гібридувався з комплементарним ланцюгом всією своєю довжиною, тоді як при оптимальній температурі відпалу, праймер частково гібридується з комплементарним ланцюгом. Часткова гібридизація праймера на геномній ДНК призводить до неспецифічної ампліфікації, якщо ділянок зв'язування для праймера достатньо багато. У більшості випадків, перші десять ПЛР- циклів, можна проводити при температурі відпалу в 72-75 °С, а потім відразу знизити до оптимальної температури, наприклад до 60-65 °С.

*ПЛР з використанням гарячого старту (hot-start PCR)* – модифікація ПЛР з використанням ДНК-полімерази, в якій полімеразна активність блокується при кімнатній температурі антитілами або імітують антитіла невеликими молекулами типу Affibody, тобто в момент постановки реакції до першої денатурації в ПЛР. Зазвичай, перша денатурація проводиться при 95°С протягом 10 хв.

*ПЛР в реальному часі (real-time PCR – RT-PCR) або кількісна ПЛР (quantitative PCR – qPCR)* – один з різновидів ПЛР, який використовується для одночасної

ампліфікації та вимірювання кількості даної молекули ДНК. Метод ПЛР в режимі реального часу включає в себе одночасно детекцію та кількісне визначення (вимірювання безпосередньо кількості копій, або вимір копій щодо внесеної ДНК або додаткових калібрувальних генів) специфічної послідовності ДНК у зразку. Метод використовує загальні принципи ПЛР, основна відмінність полягає в тому, що вимірюється кількість ампліфікованої ДНК в реальному часі після кожного циклу ампліфікації.

Для кількісного визначення використовують два методи:

А) флюоресцентні барвники, інтеркалюючі в дволанцюгові молекули ДНК;

Б) модифіковані дезоксинуклеотиди (ДНК-специфічні для послідовності ДНК-зонди, що складаються з олігонуклеотидів, позначених флюорисцентним репортером), які флюорисцюють після гібридизації з комплементарними ділянками ДНК.

Останньою розробкою у методі кількісної ПЛР є *цифрова ПЛР (digital PCR – dPCR, dePCR)*, яка є абсолютним методом вимірювання. Цифрова ПЛР проводиться в тому разі, коли є необхідність у вкрай високій чутливості і точності у кількісній оцінці нуклеїнових кислот. Для проведення кількісної ПЛР застосовують нанофлуїдні чіпи, які проходять етап завантаження. Після завершення завантаження чіпу, проводять процедуру ампліфікації. Концентрація ДНК-мішені визначається в початковому зразку у вигляді числа копій в мікролітр з чутливістю до 1 молекули. Реакційна суміш з досліджуваним матеріалом розділяється на безліч мікрореакторів, в кожному з яких проходить індивідуальна ПЛР. Розподіл молекул ДНК по краплях (або лунках мікрочіпа) відбувається випадковим чином. Певна лунка може містити або не містити молекулу ДНК. Після ампліфікації оцінюється кількість позитивних (містять молекулу нуклеїнової кислоти) і негативних (що не містять молекул нуклеїнової кислоти) реакцій. Оцінка кількості молекул нуклеїнових кислот в початковому зразку проводиться на підставі розподілу Пуассона. Число позитивних крапель безпосередньо залежить від вихідної концентрації мішені в зразку.

## 1.2 ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

### 1.2.1 Добір праймерів

Добір праймерів здійснюється з використанням онлайн програм та баз даних у мережі Інтернет. Найбільшим ресурсом є сайт NCBI (National Center for Biotechnology Information), з яким асоційовані інші інформаційні бази даних. Зокрема, безкоштовний доступ до програми створення праймерів є з ресурсу <http://www.pubmed.com> у вкладці GenBank:

1. Для створення праймера слід зайти у базу GenBank на сайті <http://www.pubmed.com>.

2. Далі ввести латиною назву організму та назву потрібного гена.

3. Обрати вкладку «Nucleotide» та натиснути «Enter».

4. Скопіювати інформацію у файл. Виводиться порядок нуклеотидів у гені на одному з ланцюгів. Використовуючи дану послідовність проводять добір прямого та зворотного праймерів.

Прямий праймер визначається як відрізок на 5'-кінці гену і становить 20 (16-25) комплементарних вихідним нуклеотидів. Для зворотного праймеру визначають послідовність комплементарного ланцюга ДНК і обирають 20 комплементарних нуклеотидів для 5'-кінця отриманої послідовності.

Праймери повинні відповідати ряду вимог:

- вони мають бути самокомплементарні;
- містити понад 60% гуаніну та цитозину для утворення ГЦ-пар;
- температура відпалу прямого та зворотного праймерів не повинна розрізнятися більше ніж на 6 °С;
- початкові послідовності праймерів мають бути абсолютно комплементарними матриці.

5. Програма дозволяє також розрахувати температуру відпала праймерів та скласти режим виконання ПЛР. Спрощені формули для розрахунку температури відпалу виглядають так:

$$T_a = [(A+T)2 \text{ }^\circ\text{C}] + [(G+C) 4 \text{ }^\circ\text{C}] \text{ (якщо довжина } \leq 20 \text{ основ);}$$

$$T_a = 22 + 1,46 ([2 (G+C)] + (A+T)) \text{ (якщо довжина } 20\text{--}30 \text{ основ),}$$

де А – аденін, Т – тимін, Г – гуанін, Ц – цитозин.

### 1.2.2 Проведення ампліфікації

#### а) підготовка суміші для ампліфікації

ПЛР проводять у об'ємі 10-50 мкл. Робоча концентрація праймерів у реакційній суміші становить 0,2-1 пМ/мкл. Кількість матричної ДНК, що додають у реакцію, – 10-1000 нг. Робоча концентрація Taq-полімерази становить 0,01–0,05 од/мкл. Кількість циклів – 30.

#### б) програмування ампліфікатора

Стандартний режим циклу ампліфікації:

1. Температура денатурації (Td) – +95 °С, час – від 1 хв – попередня денатурація матриці, один етап.

2. 25-30 циклів ПЛР:

- денатурація – Td = +95 °С, час – від 10 с;
- відпал праймерів Ta = +50–65 °С, час – від 30 с;
- елонгація, полімеризація Te = +72 °С, час – від 1 хв.

3. Добудова незавершених ланцюгів: T = +72 °С, час – від 1 хв, один етап.

4. Режим зберігання: T = +4 °С.

Для кожної ампліфікації залежно від характеру генетичного матеріалу розраховується свій унікальний цикл роботи і ампліфікатор програмується відповідним чином.

в) здійснення ПЛР

1. У стерильній пластиковій тонкостінній пробірці на 0,5 (0,2) мл змішують компоненти, доводять об'єм деіонізованою водою до 20 мкл. Фермент додають останнім і відразу вносять на -20 °С.

2. Центрифугувати 15 с.

3. Запустити обраний режим ПЛР.

4. Провести електрофорез ДНК у порівнянні з контрольним маркером.

5. Встановити наявність або відсутність шуканого фрагмента ДНК.

### **1.3 САМОСТІЙНА РОБОТА**

**Завдання 1.** Дати визначення поняттям і термінам:

Ампліфікатор –

Праймер –

Ампліфікація –

Відпал –

Денатурація –

Елонгація –

**Завдання 2.** Наведіть особливості використання полімеразної ланцюгової реакції в діагностиці, загально медичній практиці та в інших сферах біологічних досліджень:

А) Діагностика інфекційних захворювань

Б) Наукові дослідження

В) Онкозахворювання

Г) Судово-медична експертиза

Д) Біологічні дослідження

**Завдання 3.** Доповніть речення та наведіть розгорнуті відповіді:  
Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це ...

Завдання ПЛР:

Основні етапи ПЛР та їх стисла характеристика:

Наведіть, яку особливість (властивість) ДНК використовують при проведенні ПЛР:

**Завдання 4.** Навести у вигляді таблиці різновиди ПЛР та вказати їх риси подібності та відмінності:

Тип ПЛР	Принцип методу	Особливості
<i>Метил-специфічна ПЛР</i>		
<i>Ступінчаста ПЛР</i>		
<i>Мультиплексна ПЛР</i>		

**Завдання 5.** Надати відповіді на тестові питання:

5.1 Як вплине на ПЛР-реакцію будь-яка з наступних обставин: 1) в реакції відсутні праймери, 2) в реакції відсутні dNTP, 3) в реакції відсутня *Taq*-полімераза?

- а) ПЛР буде проходити нормально
- б) Відбудеться неспецифічна ПЛР випадкових шаблонів
- в) Реакція припиниться через кілька циклів
- г) Реакція ПЛР не розпочнеться

5.2 Яким буде очікуваний вплив на реакцію ПЛР, якщо збільшити температуру фази відпалу і тривалість фази елонгації?

- а) Точність і вихід знизяться
- б) Точність знизиться, але вихід збільшиться
- в) Точність збільшиться, але вихід зменшиться
- г) Точність і вихід збільшаться

5.3 Який результат є найменш очікуваним, якщо не розділити пре-ПЛР і пост-ПЛР?

- а) Хибнопозитивні реакції
- б) Хибнонегативні реакції
- в) Змішані або неспецифічні ПЛР-продукти
- г) Підвищення надійності результатів ПЛР

5.4 Якого результату найменше можна очікувати, якщо кількість шаблону в мультиплексній ПЛР впаде значно нижче оптимальної?

- а) Довші мішені ампліфікуються погано або не ампліфікуються
- б) Випадання алелів
- в) Збільшення виходу
- г) Дисбаланс гетерозигот

5.5 Яким буде очікуваний вплив на ПЛР-реакцію, якщо використані праймери будуть дещо коротшими і варіабельнішими, ніж передбачувані олігонуклеотидні послідовності?

- а) Реакція ПЛР не розпочнеться
- б) Реакція ПЛР завершиться після одного циклу
- в) Реакція призведе до утворення одного короткого ПЛР-продукту
- г) Реакція дасть суміш неспецифічних продуктів

5.6 Продукт полімеразної ланцюгової реакції:

- а) Амплікон
- б) Олігонуклеотид
- в) Подовження праймера
- г) Шаблони ДНК
- д) Термоциклери

5.7 Синтез копії нуклеїнової кислоти з праймера – це

- а) Подовження праймера
- б) Амплікон
- в) Олігонуклеотид
- г) Шаблони ДНК
- д) Термоциклери

5.8 Чому денатурація є першим етапом полімеразної ланцюгової реакції?

- а) Вона активує механізм реплікації ДНК у клітині
- б) Вона денатурує ферменти, які могли б перешкоджати реакції
- в) Перетворює дволанцюгову ДНК на одностанцюгову
- г) Дозволяє праймерам зв'язуватися один з одним

5.9 Оригінальний фермент(и), який(і) використовується(ються) в ПЛР реакції, відомий(і) як:

- а) ДНК-полімераза *E. coli*
- б) РНК-полімераза *E. coli*
- в) *Taq*-полімераза
- г) Усі перераховані вище

5.10 Кому з науковців належить принцип розробки методу ПЛР?

- а) Колер
- б) Альтман
- в) Мільштейн



г) Кері Мюлліс

5.11 Який з наведених нижче ферментів не є термостабільною полімеразою?

а) *Pfu*-полімераза

б) *Taq*-полімераза

в) *Vent*-полімераза

г) ДНК-полімераза III

5.12 Система нагрівання / охолодження для ПЛР, що дозволяє програмувати і автоматизувати цикли денатурації, зв'язування праймерів і пролонгації – це

а) Подовження праймерів

б) Амплікон

в) Олігонуклеотид

г) Шаблони ДНК

д) Термоциклери

**Завдання 6.** Серед запропонованих тверджень обрати вірну відповідь – так чи ні, проставивши відмітку «+» у відповідний стовпчик:

Твердження	Так	Ні
Термостабільні ДНК-полімерази, такі як <i>Taq</i> -полімераза, дозволили автоматизувати процес ПЛР без необхідності додавання свіжої полімерази після етапу денатурації кожного циклу		
Ключовими вимогами для ПЛР є шаблон ДНК, пара відповідних олігонуклеотидних праймерів та ДНК-полімераза		
Довжина цільової послідовності визначається 5'-кінцями праймерів		
Праймери повинні фланкувати цільову послідовність		
У ПЛР ДНК-полімеразу очищають від термофільної бактерії <i>Thermus aquaticus</i> , яка мешкає в гарячих джерелах		
Вкладена ПЛР (NESTED PCR) передбачає використання двох наборів праймерів		
Після завершення процесу ПЛР фрагменти ДНК, які були ампліфіковані, можна проаналізувати за допомогою електрофорезу в агарозному гелі		
ПЛР можна використовувати для клонування певних (специфічних) послідовностей		
ПЛР можна використовувати для клонування генів з одного організму за допомогою праймерних послідовностей з іншого, якщо для гена доступні деякі дані про послідовність		

Одним із застосувань RT-PCR є визначення кількості мРНК у зразку		
Типовий температурний профіль етапів ПЛР: денатурація при 95°C, відпал праймеру при 55°C та елонгація <i>Taq</i> -полімеразою при 72°C		
Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це метод неселективної ампліфікації послідовностей ДНК		

**Завдання 7.** Серед запропонованих варіантів відповідей оберіть таку, що максимально відповідає питанню / твердженню:

7.1 Денатурація в ПЛР - це процес \_\_\_\_\_.

- а) Нагрівання в діапазоні 72°C
- б) Нагрівання від 40 до 60°C
- в) Нагрівання від 90 до 98°C
- г) Жоден з перерахованих вище способів

7.2 Полімераза, що використовується для ПЛР, взята з сайту \_\_\_\_\_.

- а) *Homo sapiens*
- б) *Thermus aquaticus*
- в) *Escherichia coli*
- г) *Saccharomyces cerevisiae*

7.3 Праймери, що використовуються в процесі ПЛР: \_\_\_\_\_.

- а) Одноланцюговий олігонуклеотид РНК
- б) Одноланцюговий олігонуклеотид ДНК
- в) Дволанцюговий олігонуклеотид РНК
- г) Одноланцюговий олігонуклеотид ДНК

7.3 У ПЛР зі зворотною транскрипцією використовується \_\_\_\_\_.

- а) РНК як шаблон для утворення ДНК
- б) мРНК як шаблон для утворення кДНК
- в) ДНК як шаблон для утворення ssDNA
- г) Все перераховане вище

7.4 Полімеразна ланцюгова реакція використовується для \_\_\_\_\_.

- а) Ампліфікації гена, що цікавить
- б) Побудови RAPD-карт
- в) Виявлення присутності трансгена в організмі
- г) Все перераховане вище

### Контрольні питання

1. Навести принцип ПЛР. Основні стадії ПЛР та їх особливості.
2. Компоненти реакційної суміші ПЛР. Вплив концентрації компонентів (буфер, суміш нуклеотидів, різних солей, полімерази, праймерів та матриці) на хід процесу ампліфікації.
3. Визначення понять «реплікація», «ампліфікація», «денатурація», «відпал», «праймер».
4. Підбір та моделювання специфічних олігонуклеотидів для ПЛР.
5. Різновиди ПЛР.
6. Підготовка проб для ПЛР.
7. Типи контролів в ПЛР.
8. Шляхи візуалізації результатів ПЛР.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ТА РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Молекулярна біологія клітини: навчальний посібник: / О. Б. Кучменко, А. І. Марченкова – Ніжин: НДУ ім. М. Гоголя, 2021. – 135 с.
2. Біохімія : підручник / за заг. ред. проф. А. Л. Загайка, проф. К. В. Александрової – Х. : Видво «Форт», 2014. – 728 с.
3. Воронкова О.С. Практикум з молекулярної біології : навчальний посібник / О. С. Воронкова, А. І. Вінніков. – Дніпро : ЛПА, 2017. – 88 с.
4. Столяр О.Б. Молекулярна біологія – Вид-во: Біологія та медицина, 2020. – 224 с.
5. Основи молекулярної біології та персональна геноміка фізичних і психічних здібностей людини : навчальний посібник / Гоженко А., Козирев А., Цебржинський О., Гоженко О., Жуков В. / RSW. Одеса. Бидгощ., 2017. – 340 с.
6. Огляд методів та моделей полімеразно-ланцюгової реакції / А.С. Сверстюк, Т.В. Бігуняк, Б.О. Перевізник // Медична інформатика та інженерія. – 2014. – №3. – с. 97-100.
7. ПЛР-діагностика: принципи, досягнення та перспективи / О.М. Олещук, А.Є. Мудра, Н.Б. Зозуля // Медична хімія. – 2014. – т.16, №3. – с. 97-103. <https://doi.org/10.11603/1681-2557.2014.v16.i3.3997>
8. Сучасні проблеми молекулярної біології: навчальний посібник / Г.О. Ушакова, І.Є. Соколова – Д., РВВ ДНУ, 2016. – 200 с.
9. Молекулярна генетика та технології досліджень генома: навчальний посібник / Н.І. Гіль, О.Ю. Сметана – Вид-во: Гельветика, 2019. – 320 с.
10. Işıl Aksan Kurnaz. Techniques in Genetic Engineering - CRC Press, Taylor & Francis Group, 2015. – P. 68-70, 261-264.
11. Forero D.A., Chand V. 2Methods in molecular biology and genetics: looking to the future // BMC Research Notes (2023) 16:26. <https://doi.org/10.1186/s13104-023-06298-y>

### Інформаційні ресурси

1. Національна бібліотека України ім. В.І. Вернадського - <http://www.nbuv.gov.ua/>
2. PubMed [Електронний ресурс] / US National Library of Medicine National Institutes of Health. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
3. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) – An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders <http://omim.org/>
4. База даних з пошуку статей в галузі генетики NCBI (The National Center for Biotechnology) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. Journal of molecular biology <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-molecular-biology>

6. Real-time PCR handbook  
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>
7. ScienceDirect. База журналів видавництва Elsevier  
<https://www.sciencedirect.com/science>
8. Метод полімеразної ланцюгової реакції – Заголовок з екрану -  
<http://surl.li/okqym>
9. Заголовок з екрану - <https://microbenotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-steps-applications/>

**ВОРОНКОВА** Юлія Сергіївна  
**ВІННИКОВ** Альберт Іванович  
**ВОРОНКОВА** Ольга Сергіївна

## **МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ**

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ  
до виконання практичної роботи  
**«МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ»**  
для студентів освітньо-професійної програми «Біологія»  
першого (бакалаврського) рівня вищої освіти  
спеціальності 091 Біологія та біохімія

В авторській редакції

Національний технічний університет «Дніпровська політехніка»  
49005, м. Дніпро, просп. Д. Яворницького, 19.