

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

БІОІНЖЕНЕРІЯ

ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

Навчальний посібник

Рекомендовано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
як навчальний посібник для здобувачів ступеня бакалавра
за освітньою програмою «Біотехнології»
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

Електронне мережеве навчальне видання

Київ
КПІ ім. Ігоря Сікорського
2024

УДК 577.27(076.5); 577.21

Б93

Укладачі: *Маринченко Лоліта Вікторівна*, канд. техн. наук, с.н.с.
Колтишева Діна Сергіївна
Прохоренко Дмитро Костянтинович
Левтун Ігор Ігорович, канд. техн. наук

Рецензент *Луценко Т.М.*, канд. техн. наук, доцент,
доцент кафедри трансляційної медичної біоінженерії ФБМІ
КПІ ім. Ігоря Сікорського

Відповідальний
редактор *Дем'яненко І.В.*, канд. техн. наук

*Гриф надано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
(протокол № 8 від 20.06.2024 р.)
за поданням вченої ради факультету біотехнології і біотехніки
(протокол № 10 від 27.05.2024 р.)*

Б93 Біоінженерія. Лабораторний практикум [Електронний ресурс] : навч. посіб. для здобувачів ступеня бакалавра за освіт. програмою «Біотехнології» спец. 162 Біотехнології та біоінженерія / КПІ ім. Ігоря Сікорського ; уклад.: Л. В. Маринченко, Д. С. Колтишева, Д. К. Прохоренко та І. І. Левтун – Електрон. текст. дані (1 файл). – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2024. – 66 с.

Навчальне видання призначене для виконання лабораторних робіт з дисципліни «Біоінженерія» з метою практичного засвоєння методів молекулярно-біологічного дослідження: приділено увагу методам виділення загальної ДНК трьома різними способами, проведення полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу для ампліфікації цільової послідовності, електрофоретичного дослідження ДНК та продуктів ПЛР на референтний ген, визначення концентрації ДНК спектрофотометричним аналізом препаратів нуклеїнових кислот і флуоресцентною спектрофотометрією.

Лабораторний практикум призначений для здобувачів ступеня бакалавра за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» та буде також корисним для фахівців, які працюють в галузі генетичної інженерії.

УДК 577.27(076.5); 577.21

Реєстр. № НП 23/24-641. Обсяг 3,0 авт. арк.

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
проспект Берестейський, 37, м. Київ, 03056
<https://kpi.ua>

Свідectво про внесення до Державного реєстру видавців, виготовлювачів
і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 5354 від 25.05.2017 р.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	ПОМИЛКА! ЗАКЛАДКУ НЕ ВИЗНАЧЕНО.
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 1. ОЗНАЙОМЛЕННЯ З ПРАВИЛАМИ РОБОТИ В ЛАБОРАТОРІЇ, ПРАВИЛАМИ ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ТА ОХОРОНИ ПРАЦІ, ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ.....	5
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2-4. ВИДІЛЕННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ З ДОСЛІДЖУВАНОВОГО МАТЕРІАЛУ.....	ПОМИЛКА! ЗАКЛАДКУ НЕ ВИЗНАЧЕНО.
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 5. ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ В РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ ДЛЯ АМПЛІФІКАЦІЇ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ НУКЛЕОТИДІВ	ПОМИЛКА! ЗАКЛАДКУ НЕ ВИЗНАЧЕНО. 22
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 6. АНАЛІЗ АМПЛІКОНІВ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ В АГАРОЗНОМУ ГЕЛІ.....	ПОМИЛКА! ЗАКЛАДКУ НЕ ВИЗНАЧЕНО. 6
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 7. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗРАЗКІВ ДНК.....	ПОМИЛКА! ЗАКЛАДКУ НЕ ВИЗНАЧЕНО. 6
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 8. ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ДНК ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЮ СПЕКТРОФОТОМЕТРІЄЮ.....	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	64
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....	ПОМИЛКА! ЗАКЛАДКУ НЕ ВИЗНАЧЕНО. 6

ВСТУП

Дисципліна «Біоінженерія» (далі – дисципліна) є необхідною складовою програми завершального етапу підготовки бакалаврів з біотехнології. Разом із мікробіологією, загальною біотехнологією, генетикою, біохімією ця дисципліна розширює у майбутніх фахівців з біотехнології **здатності** використовувати молекулярно-біологічні технології для створення та аналізу нових біологічних агентів, до узагальнення знань з принципів організації та функціонування ДНК, сучасні **знання** молекулярних механізмів збереження, відтворення, передачі та реалізації спадкової інформації для ефективного аналізу біологічних процесів з точки зору уявлень про будову та функціональну характеристику макромолекул нуклеїнових кислот.

Практичне застосування цих знань має бути відпрацьовано в лабораторії, що застосовує сучасні методи молекулярної біотехнології.

Дисципліна надає **компетенції** використовувати експериментальні методи біоінженерії для подальшого дослідження та маніпуляцій молекулярно-біологічними процесами. Лабораторна практика надає студентам навички роботи з реальними об'єктами генно-інженерних досліджень, експериментальних методів біоінженерії, практичного застосування вже існуючих досягнень біоінженерії для фармакології, сільського господарства, мікробіологічної промисловості, перспективних напрямків нових застосувань, наприклад, у галузі персоніфікованої медицини, способів попередження спадкових захворювань тощо.

Досвід роботи в молекулярно-біологічній лабораторії є однією з базових компетентностей спеціаліста-біотехнолога. Основні практичні навички роботи з ДНК представлено в лабораторних роботах даного практикуму.

Лабораторна робота 1. Ознайомлення з правилами роботи в лабораторії, правилами техніки безпеки та охорони праці, приготування розчинів

Мета: засвоїти правила техніки безпеки в лабораторіях з біоінженерних досліджень і маніпуляцій.

Теоретичні відомості

До виконання лабораторних робіт студенти допускаються тільки після проходження інструктажу, вивчення правил техніки безпеки та протипожежних правил, перевірки освоєння правил та відповідного оформлення допуску до роботи в спеціальному журналі [1].

Студенти несуть особисту відповідальність за недотримання вимог техніки безпеки. Далі перераховано основні з них.

1 При виконанні лабораторних робіт потрібно суворо дотримуватись методики та порядку проведення роботи. Відхилення від методики можливе тільки з дозволу та під керівництвом викладача.

2 В лабораторії необхідно дотримуватися та підтримувати чистоту. Не допускається обмежувати проходи, виходи з лабораторії, підходи до протипожежного інвентаря.

3 Заборонено класти на робочі столи одяг та їжу, а також захаращувати їх посудом, банками з реактивами, піпетками, витратним матеріалом. У разі розбиття посуду та пролиття його вмісту все має бути негайно прибрано.

4 Категорично заборонено вживати їжу в лабораторних приміщеннях.

5 До виконання лабораторних робіт студенти допускаються тільки за наявності захисного одягу – халату.

6 У разі робіт з подрібнення твердих речовин вручну необхідно здійснювати маніпуляції у захисних окулярах з оправою, що щільно прилягає до обличчя.

7 Для виконання робіт з генетичним матеріалом необхідно бути в одноразових рукавичках.

8 Всі роботи із застосуванням отруйних речовин слід проводити лише у витяжній шафі. Якщо раптово вентиляція припинила працювати, слід негайно припинити роботу. Не допускається засовувати голову всередину шафи з метою з'ясування причин неполадок або інших дій.

9 В лабораторії має бути аптечка та перев'язувальні матеріали.

10 Для роботи можна використовувати тільки реактиви, які знаходяться в хімічному посуді, на яких є етикетки з назвами реактивів. Під час виконання роботи маркувати спеціальним олівцем по склу лабораторний посуд з будь-якими реактивами або рідинами всередині.

11 Відбір реактиву дозволено лише автоматичною піпеткою або піпеткою з гумовою грушею.

12 Заборонено пробувати хімічні речовини на смак. Нюхати їх можна, тільки направляючи до себе пари або газу рухом руки, а не вдихаючи запах на повні легені. Не допустимо визначати хімічні речовини за смаком або запахом.

13 Залишки розчинника, концентрованих кислот та лугів, а також інших їдких рідин зливають в каналізацію тільки після нейтралізації та знешкодження.

14 Працюючи з хімічними реактивами, необхідно уникати попадання реактивів на руки, одяг, лабораторні столи та інші об'єкти в лабораторії. У разі потрапляння токсичних, агресивних або отруйних речовин на одяг, його необхідно терміново зняти і попарити, не виходячи з лабораторії.

15 Для попередження опіків хімічними речовинами необхідно працювати обережно, чітко й акуратно. Переливати такі речовини з великих ємкостей в малі треба за допомогою сифону, лійки, гумової груші.

16 Всі операції з їдкими, отруйними та токсичними речовинами мають проводитись лише під увімкненою витяжною шафою.

17 У разі опіків необхідно дотримуватися таких правил:

- у разі незначного опіку шкіри кислотою або лугом постраждале місце негайно промивають великою кількістю проточної водопровідної води протягом 10-30 хв;

- у разі хімічного опіку кислотою обпечене місце після обробки водою промивають 5%-м розчином питної соди; у разі опіку лугом обпечене місце після обробки водою промивають 5%-м розчином оцтової кислоти;

- у разі термічного опіку обробить водою обпечене місце.

18 У випадку порізу рану треба обробити розчином йоду чи перексиду водню.

19 У разі отруєння парами або газами, необхідно винести постраждалого на свіже повітря, якщо воно відбулося в результаті попадання отрути всередину – викликати блювання та дати протиотруту, за необхідності зробити штучне дихання. Штучне дихання протипоказано у разі отруєння хлором.

20 Під час роботи з електроприладами суворо дотримуватись інструкції до приладу. Всі кабелі і проводи мають бути ізольовані. Перед увімкненням приладу слід перевірити його технічний стан, у разі виявлення дефектів, спочатку необхідно їх усунути. Переносити чи ремонтувати обладнання, яке знаходиться під напругою, заборонено. Заборонено працювати з електроприладами зі знятими передньою або задньою кришкою.

21 В приміщеннях лабораторії слід суворо дотримуватись правил протипожежної безпеки. Категорично заборонено залишати ввімкнені прилади без нагляду.

22 Заборонено працювати з легкозаймистими речовинами, які знаходяться близько до відкритих електронагрівальних пристроїв.

23 По закінченні роботи всі електроприлади мають бути вимкнено, використаний посуд ретельно вимито, робоче місце прибрано, вимито руки з милом та закрито водопровідні крани.

Лабораторна робота 2–4. Виділення нуклеїнових кислот з досліджуваного матеріалу

Мета – розглянути методи виділення нуклеїнових кислот зі зразків епітелію людини або бактеріальних клітин.

Теоретичні відомості

Отримання високоочищених нуклеїнових кислот є першим необхідним етапом у більшості молекулярно-біологічних дослідженнях. У зв'язку з тим, що існують різноманітні методи виділення та очищення нуклеїнових кислот, вибір найбільш підходящої методики базується на таких передумовах [1]:

- цільова нуклеїнова кислота;
- джерело нуклеїнових кислот і первинний матеріал – організм (рослинні та тваринні тканини, мікроорганізми), листя, насіння, продукти переробки, фізіологічні рідини і т.ін.);
- очікувані результати (вихід, чистота, час, ступінь очищення та ін.);
- мета подальшого використання нуклеїнових кислот (ПЛР, клонування, введення мітки, блот-гібридизація, ПЛР у реальному часі, синтез кДНК і т.ін.).

Етапи виділення:

1. Підготовка матеріалу до виділення;
2. Лізис клітин;
3. Ферментативне руйнування білків протеїназами та/або депротеїнізація клітинного лізата за допомогою органічних речовин;
4. Очистка від низько- та високомолекулярних домішок;
5. Преципітація, промивання.

Основними принципами виділення нуклеїнових кислот з первинного матеріалу є:

- руйнування клітинних оболонок;
- інгібування клітинних нуклеаз;
- відокремлення нуклеїнових кислот від залишків матеріалів клітин.

Перш за все, потрібно відокремити ДНК від білків, що входять до складу нуклеопротейдних комплексів хроматину. Часто ідеальна методика лізису є поєднанням декількох процедур; причому вона має бути досить жорсткою, щоб дезінтегрувати структури міцного вихідного матеріалу (наприклад, рослинних тканин), і водночас досить делікатною, щоб залишити в нативному вигляді цільові нуклеїнові кислоти, оскільки довгі лінійні молекули ДНК під час їх виділення з клітини фрагментуються [1].

Зазвичай процедура лізису включає:

- механічне руйнування (наприклад, подрібнення, осмотичний шок);
- хімічну обробку (наприклад, за допомогою детергентів (натрію додецилсульфат (SDS)) та хаотропних агентів (гуанідінізотіоціанат));
- ферментативний протеоліз білків (протеїнази).

Методики очищення нуклеїнових кислот, як правило, є комбінацією не менш, ніж двох таких методів:

- виділення/осадження;
- хроматографія;
- центрифугування;
- афінне розділення і т.ін.

Ряд сучасних методів передбачає сорбцію ДНК на гранулах силікагелю у присутності хаотропних речовин, центрифугування і подальше елюювання ДНК з гранул в розчин. Існують методики виділення ДНК з використанням магнітних частинок з нашарованим кремнеземом. Деякі комерційні набори передбачають сорбцію ДНК на мембранах або іонообмінних сорбентах. Фенол-хлороформний метод екстракції ДНК вважається стандартним.

Методика з використанням ЦТАБ (бромистого цетилтриметиламонію), вперше була розроблена Мюрреєм і Томпсоном в 1980 році. Цей метод добре підходить для виділення і очищення ДНК з рослин і харчових продуктів рослинного походження; і особливо зручний для видалення полісахаридів і поліфенолів, які мають негативний вплив на чистоту ДНК, а відтак – на її якість.

Лізис клітинної мембрани. Першим етапом виділення ДНК є руйнування клітинних і ядерних стінок. Для цього гомогенізований зразок обробляють спочатку буфером для лізису [1].

Всі біологічні мембрани мають в цілому однакову структуру, що включає ліпідні і білкові молекули, які взаємодіють між собою за рахунок нековалентних зв'язків.

Ліпідні молекули формують подвійний шар, в якому локалізовані білкові молекули. Ліпідні молекули складаються з гідрофільного кінця («голова») і гідрофобного кінця («хвіст»).

Лізис мембран здійснюється детергентом, що міститься в буфері для лізису. У зв'язку з тим, що хімічний склад ліпідів і детергенту подібний, компоненти детергенту в буфері для лізису можуть здійснювати «захоплення» ліпідів, що утворюють мембрани клітин і ядер. Механізм сольобілізації ліпідів зображений на рисунку 1.

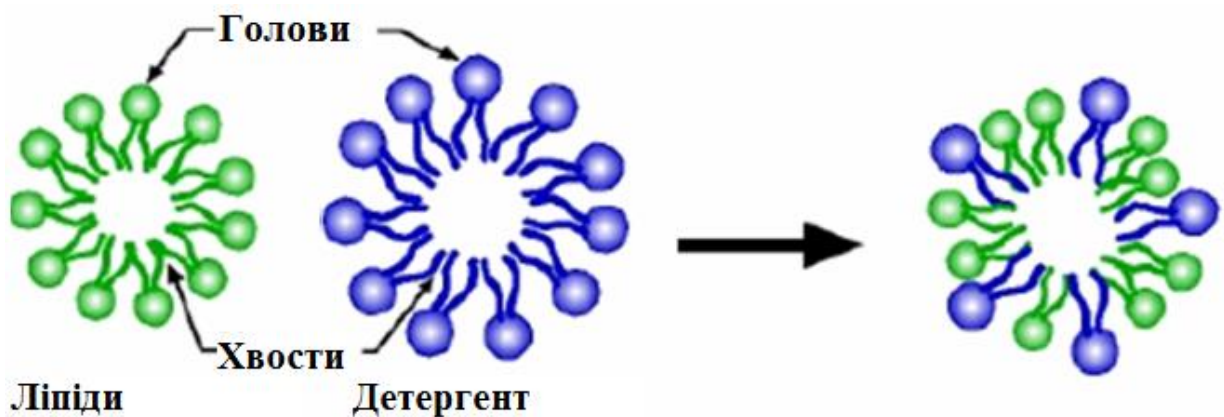


Рисунок 1 – Сольобілізація ліпідів [1]

На рисунку 2 проілюстровано, яким чином під час взаємодії клітинних мембран з буфером для лізису детергент захоплює ліпіди і білки, вивільняючи геномну ДНК.

Для вивільнення ДНК з клітинних структур додають денатуруючі, поверхнево-активні та хаотропні агенти. Для руйнування білків (особливо це стосується клітинних нуклеаз) додають протеази за сприятливих для їх дії умов.

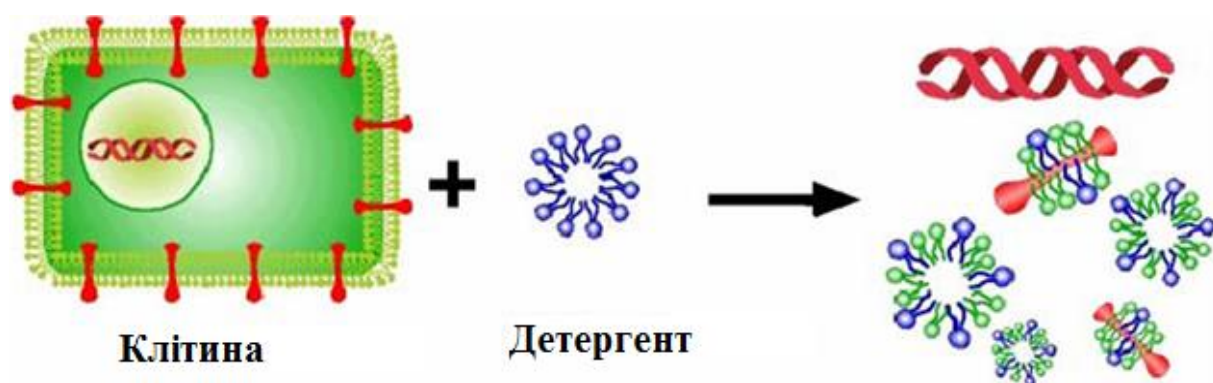


Рисунок 2 – Руйнування клітинної мембрани і виділення геномної ДНК [1]

Виділення. Деякі методи передбачають цю стадію для очищення ДНК від інших компонентів. Наприклад, у методі із застосуванням ЦТАБ на цьому етапі необхідно відділити з водного розчину, в якому знаходиться ЦТАБ-комплекс з нуклеїновими кислотами, полісахариди, білки, фенольні сполуки та інші складові клітинного лізату.

За високої концентрації солі ДНК утворює зі ЦТАБ стабільні та розчинні комплекси. Домішки з комплексу нуклеїнових кислот не осідають і можуть бути видалені з водного розчину екстракцією хлороформом, який денатурує білки і полегшує розділення водної та органічної фаз. Якщо необхідно, для того, щоб повністю видалити домішки з водного шару, екстракцію хлороформом повторюють два або три рази. Щоб досягти кращого виходу нуклеїнових кислот, органічну фазу доцільно повторно екстрагувати водним розчином, а потім додати його до першого екстракту.

Фенол-хлороформна екстракція передбачає використання додецилсульфат натрію (SDS) і протеїнази К для ферментативного розщеплення білків і ненуклеїнових кислот клітинних компонентів. Потім додають суміш фенол:хлороформ:ізоаміловий спирт у співвідношенні 25:24:1, перемішати на вортексі, щоб сприяти розподілу ліпідів і клітинних залишків в органічну фазу, залишаючи ізольовану ДНК у водній фазі (рис.3).

Після центрифугування водну фазу, що містить очищену ДНК, можна перенести в чисту пробірку для аналізу. ДНК також можна відновити та сконцентрувати з водної фази шляхом осадження етанолом [1].

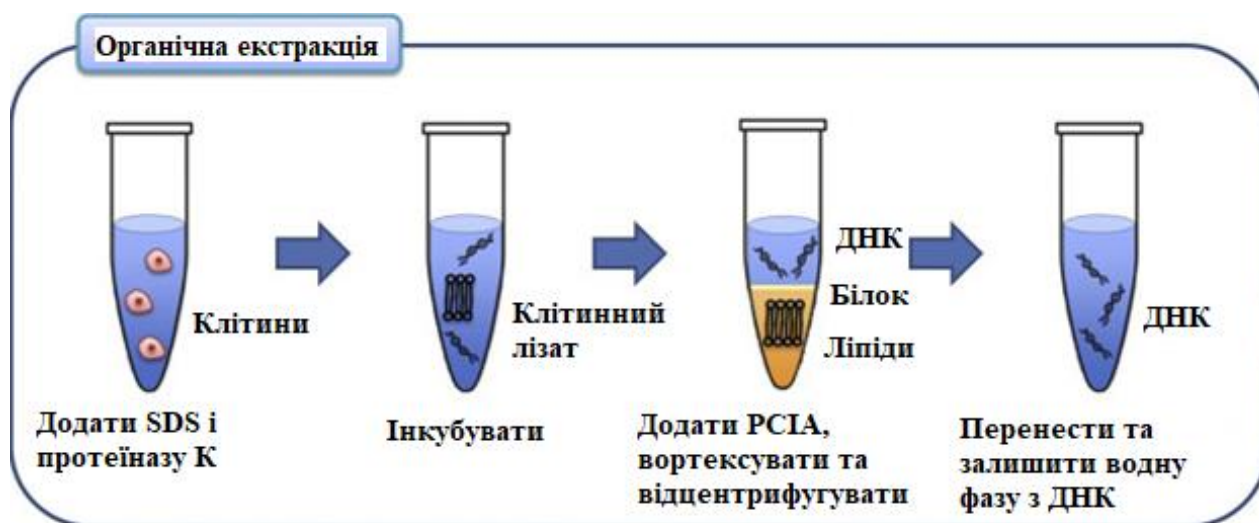


Рисунок 3 – Схема фенол-хлороформної екстракції. На схемі зображено, що ДНК розподіляються у водній фазі, тоді як ліпіди та білки – в органічній фазі або/та на межі двох фаз: SDS – додецилсульфат натрію; PClA – фенол:хлороформ:ізоаміловий спирт [2]

Осадження. За зниження концентрації солі ($<0,4$ M NaCl) комплекси ДНК-ЦТАБ випадають в осад, тоді як більша частина полісахаридів залишається в розчині. Після цього осад розчиняють у розчині NaCl (>1 M) та осаджують спиртом (етиловий або ізопропіловий) [1].

Щоб осадити нуклеїнові кислоти, виділені будь-яким методом, до рідкої фази додають буфер для преципітації (амоній ацетат, ізопропіловий та етиловий спирт). Для покращення взаємодії буфера з нуклеїновими кислотами суміш перемішують на вортексі. Для осадження нуклеїнових кислот суміш центрифугують. Оскільки отриманий осад містить домішки, його необхідно промити, для чого слугує буфер для промивання, що містить 70% етанол. Домішки переходять у буфер, який підлягає видаленню. Осад висушують в термостаті, після чого здійснюють елюювання за допомогою буфера для елюювання TE (Tris+EDTA).

Трис бере на себе роль підтримки буферної ємності (ДНК відносно стабільні за рН 8), тоді як EDTA (хелатоутворювач) зв'язує іони Mg^{2+} і робить їх недоступними як кофакторів для ферментів (ДНКаз), які можуть руйнувати ДНК в процесі зберігання.

Кількісна і якісна оцінка зразка отриманої ДНК здійснюється за стандартною процедурою електрофорезу ДНК в агарозному гелі шляхом візуального порівняння із зразками відомої концентрації. Спектрофотометричне або флуориметричне визначення дає більш точну характеристику препарату ДНК.

В твердофазних методах виділення ДНК використовують такі процеси та принципи [1]:

- водневі зв'язки з немодифікованою гідрофільною матрицею, зазвичай кварцем, в хаотропних умовах;
- іонообмін у водному розчині, зазвичай з використанням аніонообмінників;
- афінність;
- механізми виключення за розмірами.

Для виділення нуклеїнових кислот у твердофазних системах застосовують хроматографічні сепараційні колонки, носіями в яких є частинки на основі кварцу або скляних волокон, частинки з аніонообмінними властивостями, які адсорбують нуклеїнові кислоти.

Ці носії застосовуються для виділення або очищення нуклеїнових кислот з висококонцентрованими розчинами хаотропних солей (йодид натрію, перхлорат натрію, гуанідин тіоціанату).

До твердофазних методів виділення ДНК належать, зокрема, й методи:

- виділення на склі або твердих частинках;
- методи на основі магнітного сепарування.

Методи виділення НК на склі або твердих частинках розглянемо на прикладі методу, запропонованого Boom.

Цей метод включає в себе стадію лізису клітин сильним хаотропним агентом, який руйнує клітинні мембрани та інактивує внутрішньоклітинні нуклеази, і подальшу сорбцію нуклеїнової кислоти на носії. Нуклеїнова кислота оборотно зв'язується зі склом у присутності високої концентрації хаотропних солей (наприклад, гуанідин хлориду, гуанідин тіоціанату). У таких умовах зв'язування білків з матрицею не відбувається [1].

Хаотропні сполуки являють собою речовини, що порушують впорядковану структуру води і тим самим призводять мембрани в стан хаосу (наприклад, сечовина, йодид натрію). Таким чином, крім зв'язування, хаотропні агенти забезпечують руйнування клітинних мембран і лізис клітин з подальшим вивільненням нуклеїнової кислоти. Домішки відмиваються хаотропною сіллю, а хаотропна сіль – 80% етанолом. Очищена нуклеїнова кислота знімається зі скла буфером з низькою іонною силою.

На цей час багато комерційних фірм пропонують для виділення нуклеїнових кислот свої набори.

Використання магнітних твердих носіїв у біохімічних та молекулярно біологічних процесах має багато переваг порівняно з немагнітними сепараційними методами. Для зв'язування цільової речовини (у даному разі – ДНК) використовують магнітні носії з іммобілізованими афінними лігандами або лігандами з біополімерів, які збільшують афінність до потрібної нуклеїнової кислоти.

Магнітні носії з іммобілізованими афінними лігандами взаємодіють з молекулами ДНК, утворюючи осад. Зазвичай магніт прикладають до стінки посудини, яка містить зразок, щоб частинки зі вже зв'язаною цільовою речовиною агрегувалися біля стінки посудини або ж використовують стержні, які занурюються в розчин. Тоді незв'язані компоненти зразку, наприклад поліцукри, фенольні компоненти, які інгібують ДНК-полімеразу та ПЛР-реакцію, можна потім вилучити. Таким способом можна відокремлювати компоненти клітинного лізата.

Після промивання видаляється супернатант, що містить залишки після лізису клітин без ДНК. Після повторного промивання додають розчин для елюювання, який дає змогу відокремити молекули ДНК від магнітних носіїв та перенести їх у розчин [1].

Матеріалом для магнітних частинок можуть бути як синтетичні полімери або біополімери, так і неорганічні речовини на основі пористого скла та оксиду заліза з модифікованою поверхнею. Найкраще застосовувати для виділення суперпарамагнітні частинки, які не взаємодіють одна з одною за відсутності магнітного поля. Для автоматичного виділення нуклеїнових кислот використовуються магнітні частинки зі скляним покриттям. Нуклеїнова кислота зв'язується зі скляною поверхнею, потім, вже зв'язана з частинками, вона проходить ті самі стадії екстракційного процесу, що і в методиці на склі.

Загальні ДНК і РНК не розділяються методом твердофазної сепарації за допомогою магнітних частинок, тому для виділення ДНК необхідно зруйнувати РНК ще на стадії сепарації ДНК. Для цього застосовують РНКазу або луг. Натомість, для виділення РНК доцільно використовувати дезоксирибонуклеазу (ДНКазу).

1) Виділення ДНК з власного букального епітелію порожнини рота

Обладнання та матеріали: стерильні одноразові зонди, стерильні одноразові мікропробірки Eppendorf з ковпачком (рис.4)



Рисунок 4 – Одноразові зонди та стерильні одноразові мікропробірки Eppendorf з ковпачком

Реактиви: стерильне транспортне середовище, що містить натрію азид та натрію хлорид.

Хід роботи

1. Підготувати робоче місце. Промаркувати одноразові пробірки (1,5 мл) залежно від кількості досліджуваного матеріалу.

2 Взяти сухим стерильним одноразовим зондом (обертальними рухами з невеликим натиском протягом 6 секунд) зішкріб з внутрішньої поверхні щоки.

3 Відразу після отримання проби робочу частину зонда з пензликом помістити в стерильну одноразову пробірку зі спеціальним транспортним середовищем.

4 Пластиковий стрижень відламати на відстані не більше 0,5 см від робочої частини (багаторазові ножиці не використовувати для запобігання контамінації). Мікропробірки Eppendorf щільно закрити ковпачком.

5 Отриманий зразок використовувати для подальшого виділення ДНК методами преципітації, кремній оксиду та магнітних частинок.

2) Метод виділення нуклеїнових кислот методом преципітації

Обладнання та матеріали: одноразові рукавички, одноразові пробірки (1,5 мл), вортекс, термостат, дозатори, набір одноразових наконечників, центрифуга (10 000 об/хв).



Рисунок 5 – Вортексування (перемішування) зразку

Реактиви: зразки для аналізу ДНК, розчин для лізису (гуанідин тіоціанат, ізопропіловий спирт, лаурил саркозинат, полісорбат-20, кальцій хлорид,, компонент для лізису (протеїназа К), буфер для преципітації (амоній ацетат, ізопропанол, етанол 96%), буфер для промивання №1 (етанол 70%), буфер для елюювання (TE буфер = Tris+EDTA).

Хід роботи

1. Підготувати робоче місце. Промаркувати одноразові пробірки (1,5 мл) залежно від кількості досліджуваного матеріалу.
2. В приготовані та промарковані одноразові пробірки внести по 300 мкл буфера для лізису та по 5 мкл компонента для лізису.
3. У відповідні пробірки внести по 100 мкл зразків для аналізу.
4. Щільно закрити кришки пробірок, перемішати на вортексі.
5. Перенести пробірки в термостат (65 °C) та інкубувати протягом 5 хв.
6. Додати в пробірки по 400 мкл буфера для преципітації, закрити кришки пробірок, перемішати на вортексі.
7. Центрифугувати за 10 000 об/хв протягом 5 хв.
8. Обережно дістати пробірки з центрифуги та відібрати всю надосадову рідину не зачіпаючи осаду.
9. Додати у пробірки по 700 мкл буфера для промивання №1, закрити та перемішати на вортексі.
10. Центрифугувати за 10000 об/хв протягом 30 с.
11. Обережно відібрати всю надосадову рідину, не зачіпаючи осаду.
12. Штатив з відкритими пробірками інкубувати 2-3 хвилини у термостаті (65 °C) для видалення залишкової вологи.
13. Додати до пробірок з осадом по 50 мкл буфера для елюювання. Закрити кришки та інкубувати 5 хвилин у термостаті (65 °C). Зразок використовувати для подальших досліджень (лабораторна робота 4).

3) Метод виділення нуклеїнових кислот із застосуванням кремній оксиду

Обладнання та матеріали: одноразові рукавички, одноразові пробірки (1,5 мл), вортекс, термостат, центрифуга (10 000 об/хв), дозатор або вакуумний відсмоктувач, набір одноразових наконечників без фільтра.

Реактиви: зразки для аналізу ДНК, розчин для лізису (гуанідин тіоціанат, ізопропіловий спирт, лаурил саркозинат, полісорбат-20, калій хлорид), розчин з

частинками кремній оксиду, буфер для промивання №1 (спирт етиловий, спирт ізопропіловий, етилацетат, полісорбат-20, вода), буфер для промивання №2 (спирт етиловий, етилацетат, вода), буфер для елюювання (TE буфер = Tris+EDTA).

Хід роботи

1. Підготувати робоче місце. Промаркувати одноразові пробірки (1,5 мл) залежно від кількості досліджуваного матеріалу.

2. Приготувати суміш, що містить буфер для лізису та розчин з магнітними частинками. Для виділення одного зразка суміш містить 400 мкл буфера для лізису та 20 мкл розчину з частинками кремній оксиду.

3. В приготовані та промарковані одноразові пробірки внести по 400 мкл приготованої суміші і по 100 мкл зразків для аналізу ДНК.

4. Щільно закрити кришки пробірок, перемішати на вортексі.

5. Перенести пробірки в термостат та інкубувати за 60 °C протягом 10 хв.

6. Після інкубації осадити частинки у пробірках за допомогою центрифугування за 10 000 об/хв протягом 30 с.

7. Коли магнітні частинки сформують осад (приблизно 60 с), повністю видалити супернатант, використовуючи дозатор або вакуумний відсмоктувач з окремим наконечником без фільтра для кожної проби.

8. Додати у пробірки з частинками по 700 мкл буфера для промивання №1 та провортексувати.

9. Після центрифугування за 10 000 об/хв протягом 2 хвилин, коли частинки кремній оксиду сформують осад, повністю видалити супернатант.

10. Перенести пробірки у штатив та повторити процедуру з буфером для промивання №2.

11. Після видалення супернатанту штатив з відкритими пробірками залишити на 2-10 хвилин за температури 60 °C з метою видалення залишкової вологи.

12. Після завершення даного процесу у пробірки додати по 100 мкл буфера для елюювання.

13. Перемішати на вортексі та інкубувати 5 хвилин за температури 60 °C.

14. Після інкубації зразок осадити на центрифугу та відібрати супернатант. Відбір супернатанта здійснювати окремими наконечниками. Зразок використовувати для подальших досліджень (лабораторна робота 4).

4) Метод виділення нуклеїнових кислот із застосуванням модифікованих оксидом кремнію магнітних частинок

Обладнання та матеріали: одноразові рукавички, одноразові пробірки (1,5 мл), вортекс, термостат, магнітний штатив (рис.6), центрифуга (10 000 об/хв), дозатор або вакуумний відсмоктувач, набір одноразових наконечників без фільтра.



Рисунок 6 – Зразок в магнітному штативі

Реактиви: зразки для аналізу ДНК, розчин для лізису (гуанідин тіоціанат, ізопропіловий спирт, лаурил саркозинат, полісорбат-20, калій хлорид), розчин з магнітними частинками, буфер для промивання №1 (спирт етиловий, спирт ізопропіловий, етилацетат, полісорбат-20, вода), буфер для промивання №2 (спирт етиловий, етилацетат, вода), буфер для елюювання (TE буфер = Tris+EDTA).

Хід роботи

1. Підготувати робоче місце. Промаркувати одноразові пробірки (1,5 мл) залежно від кількості досліджуваного матеріалу.

2. Приготувати в мікропробірці суміш, що містить буфер для лізису та розчин з магнітними частинками. Для виділення одного зразка суміш містить 400 мкл буфера для лізису та 10 мкл розчину з магнітними частинками.

3. В приготовані та промарковані одноразові пробірки внести по 400 мкл приготованої суміші і по 100 мкл зразків для аналізу ДНК.

4. Щільно закрити кришки пробірок, перемішати на вортексі.

5. Перенести пробірки в термостат та інкубувати за 60 °C протягом 10 хв.

6. Після інкубації осадити краплі на вортексі і помістити пробірки в магнітний штатив або альтернативно осадити частинки у пробірках за допомогою центрифугування за 10 000 об/хв протягом 30 с.

7. Коли магнітні частинки сформують осад (приблизно 60 с), повністю видалити супернатант, використовуючи дозатор або вакуумний відсмоктувач з окремим наконечником без фільтра для кожної проби.

8. Додати у пробірки з магнітними частинками по 700 мкл буфера для промивання №1 та провортексувати.

9. Коли магнітні частинки сформують осад (приблизно 60 с), повністю видалити супернатант.

10. Перенести пробірки у звичайний штатив та повторити процедуру з буфером для промивання №2.

11. Після видалення супернатанту, штатив з відкритими пробірками залишити на 2-10 хвилин за температури 60 °C з метою видалення залишкової вологи.

12. Після завершення даного процесу у пробірки додати по 100 мкл буфера для елюювання.

13. Перемішати на вортексі та інкубувати 5 хвилин за температури 60 °C.

14. Після інкубації осадити краплі і помістити пробірки у магнітний штатив.

15. Коли магнітні частинки сформують осад (приблизно 60 с), відібрати супернатант. Відбір супернатанта здійснюється окремими наконечниками. Відбір супернатанта здійснювати окремими наконечниками. Зразок використовувати для подальших досліджень (лабораторна робота 4).

Оформлення результатів

- 1 Опишіть процедури виділення ДНК з точки зору процесів, які відбуваються за кожної дії.
- 2 Проілюструйте виконані роботи власними фото (рис.7).
- 3 Зробіть висновки. У висновках проаналізуйте ці методи, їх принципи, переваги та недоліки, порівняйте.



Рисунок 7 – Ілюстративні фото ходу виконання лабораторних робіт

Контрольні запитання

1. Які основні етапи виділення нуклеїнових кислот з досліджуваного матеріалу?
2. Які функції кожного з агентів (реактивів та обладнання), які використовують під час виділення ДНК, принцип їх дії?
3. Основні твердофазні методи виділення загальної ДНК.
4. Принципи основних етапів виділення ДНК методом *Silica*.
5. В чому полягає модифікація методу із застосуванням магнітних частинок?
6. Переваги і недоліки твердофазних методів виділення ДНК.

Лабораторна робота 5. Полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу для ампліфікації послідовностей нуклеотидів

Мета – освоїти основні принципи, які лежать в основі специфічної ампліфікації генів, та навчитися проводити ПЛР.

Теоретичні відомості

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це метод *in vitro*, що використовується для ферментативного помноження (ампліфікації) певної специфічної ділянки ДНК. Специфічність такого багатократного подвоєння забезпечена двома короткими ділянками ДНК з відомою послідовністю по обидва сторони цільової послідовності, з якими зв'язуються праймери [1].

Метод ПЛР повторює природний механізм реплікації ДНК: для синтезу комплементарних ланцюгів дволанцюгова ДНК (dsДНК) спочатку розкручується до одноланцюгових ДНК (ssДНК), за допомогою ДНК-полімерази відбувається дуплікація, а потім материнський і дочірній ланцюги знову закручуються. Отже, методика складається з таких етапів:

- денатурація ДНК за підвищеної температури – розходження ланцюгів;
- відпал (гібридизація) доданих праймерів з відомими послідовностями матриці по обидві сторони цільової ділянки ДНК;
- синтез дочірнього ланцюга ДНК за допомоги ДНК-полімерази як каталізатора і за присутності іонів Mg^{2+} , подовжуючи праймери, шляхом додавання нуклеотидів, які знаходяться у реакційній суміші.

Такі операції складають один цикл, повторення якого відбувається, зазвичай від 20 до 35 разів. Після кожного циклу новосинтезований ланцюг ДНК буде комплементарний цільовій послідовності і може слугувати матрицею у наступному циклі.

Отже, продукт полімеразної реакції – це послідовність dsДНК, кінці якої визначено 5'-кінцями олігонуклеотидних коротких праймерів, а довжина послідовності – відстанню між цими праймерами.

Після першого етапу довжини продуктів ампліфікації є гетерогенними за розміром, їх довжина може перевищувати відстань між сайтами зв'язування двох праймерів (це обумовлено точністю приєднання праймерів).

Починаючи з другого етапу, цільові ланцюги ДНК певної довжини накопичуватимуться експоненційно, і такі продукти реакції переважатимуть у реакційній суміші. Ефективність кожної ПЛР буде різнитись залежно від матриці і відповідно до ступеня оптимізації, яка була проведена [1].

Денатурація матриці

Під час денатурації подвійний ланцюг плавиться, відкриваючи одноланцюгову ДНК і зупиняючи всі ферментативні реакції (у тому числі, подовження ланцюга попереднього циклу).

Два комплементарні ланцюга розділяються шляхом підвищення температури. Цей процес відомий як денатурація. Для того, щоб домогтися денатурації ДНК, температуру зазвичай підвищують до ~93-96 °C. За цієї температури сильні водневі зв'язки розриваються і збільшується число неспарених основ.

Реакція завершена, коли всі дволанцюгові ДНК (dsДНК) стають одноланцюговими (ssДНК). Температура, за якої половина dsДНК стають одноланцюговими, відома як температура плавлення, T_m .

Тип розчину, концентрація солі і рН впливають на процес денатурації. Наприклад, за низької концентрації солі, високого рН і за присутності органічних розчинників, таких як формальдегід, температура плавлення, T_m , знижується. Кількість G/C і T/A також впливають на величину T_m . Температура плавлення ДНК зі структурою, яка містить підвищену кількість G/C вище порівняно з ДНК, збагаченому T/A.

Відпал праймерів

Відпал праймерів, або гібридизація ланцюгів ДНК з праймерами відбувається за більш низької температури (зазвичай 55-65 °C).

Після зниження температури дві ssДНК, які розійшлись в процесі денатурації, починають відтворювати dsДНК молекулу.

Комплементарні ділянкам на флангах праймери, які знаходяться у реакційному середовищі, можуть утворювати між одноланцюговим праймером і одноланцюговою матрицею водневі зв'язки, які, однак, і руйнуються. Якщо праймери точно комплементарні матричній ДНК, то водневі зв'язки будуть стабільнішими та існуватимуть трохи довше. Тоді до цього маленького відрізка дволанцюгової ДНК, де зв'язались матриця і праймер, може приєднатись і почати рух матрицею наявна в середовищі полімераза [1].

Подовження праймера

Пересуваючись, ДНК-полімераза каталізує приєднання нових нуклеотидів, комплементарних матриці. Після приєднання декількох основ взаємодія між матрицею і праймером посилюється, що унеможливорює розірвання утворених зв'язків. ДНК-полімераза, яка застосовується у ПЛР *in vitro*, була виділена із екстремофільних бактерій *Thermus aquaticus*, тому вона витримує високі температури, не руйнуючись. Це, так звані ТаqДНК-полімерази, вони термостабільні, і їхньою ідеальною робочою температурою є 72 °С. Для подовження нуклеотидного ланцюга необхідна наявність дНТФ, тому що для приєднання використовується енергія фосфатного зв'язку. Коли праймери подовжуються на кілька основ, збільшуються їхні зв'язки з матрицею, що знижує ймовірність зворотного процесу. Якщо ж праймери не є строго комплементарними, їхні зв'язки з матрицею недостатньо міцні, тому внаслідок високої температури вони знову від'єднуються, тому подовження ланцюга на таких помилково приєднаних праймерах не відбувається. Подовження ланцюга здійснюється з 3'-кінця праймера, тобто матриця прочитується від 3' до 5' кінця. Тривалість процесу елонгації залежить від довжини цільової послідовності і для довгих послідовностей може бути збільшена до 15 хв.

Цільова ДНК

Теоретично ампліфікація може бути здійснена, якщо є одна інтактна копія цільового гена. Більше число копій цільової послідовності підвищує ймовірність успішної ампліфікації ДНК. Будь-яке пошкодження, таке як насічка («надкус») в цільовій ДНК, блокуватиме ПЛР ампліфікацію.

Розмір цільової послідовності може бути такого порядку: від $<0,1$ до декількох тисяч основ.

Сумарна кількість ДНК, що зазвичай використовується для ПЛР, – від 0,05 до 1,0 мкг; це дає змогу виявляти одиничні копії цільової послідовності [1].

Праймери

Для ефективного проведення полімеразної ланцюгової реакції та ампліфікації цільової нуклеотидної послідовності до праймерів також висувається ряд вимог:

- довжина праймерів зазвичай знаходиться у проміжку від 16 до 30 нуклеотидів, що обумовлюється необхідністю застосування досить високої температури відпалу (за високої температури неточна гібридизація швидко розпадеться);
- не слід використовувати довгі ділянки послідовності з однієї основи (наприклад, poly-dT) або повторюваних мотивів для уникнення неправильної гібридизації з матрицею;
- бажано уникати інвертованих повторів, які можуть спричинити утворення вторинних структур в праймері, що також заважатиме гібридизації;
- у разі мультиплексної реакції послідовності, комплементарні іншим праймерам, можуть спричинити гібридизацію між праймерами або утворення димерів, що особливо небезпечно для 3'-кінця праймера;
- натомість бажана наявність G і C нуклеотидів на 3'-кінці, на якому відбувається подовження ланцюга – для підвищення ефективності відпалу;
- для підвищення ефективності рекомендовано, щоб відстань між праймерами не була більше 10 тисяч основ, оскільки вже за віддалення праймерів один від одного більш ніж на 3 тисячі основ ефективність знижується;
- концентрація олігонуклеотів для 30 циклів ампліфікації має бути 1 мкМ: збільшення концентрації може призвести до синтезу нецільових фрагментів, зменшення – до недостатньої ефективності синтезу цільового фрагменту.

ДНК-полімераза

В перших методах ПЛР використовували фрагмент Кленова ДНК полімерази I *E.coli*. Цей фермент, однак, денатурується за більш низької температури, ніж це потрібно для більшості матричних дуплексів [1].

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*.

Реакційні буфери і $MgCl_2$ в реакціях ПЛР

Метод ПЛР вимагає відповідного реакційного буферу. Склад буферу залежить від типу і характеристики ферменту, який передбачається використовувати, і більшість постачальників зазвичай надають 10× (десятикратний) буфер для використання з відповідним ферментом.

Присутність дивалентних катіонів є критичним для ПЛР. Концентрація $MgCl_2$ в кінцевій реакційній суміші зазвичай знаходиться в межах від 0,5 до 5,0 mM, і оптимальна концентрація визначається емпірично.

Mg^{2+} іони:

- утворюють розчинний комплекс з дНТФ, який необхідний для приєднання нуклеотидів,
- стимулюють полімеразну активність,
- збільшують T_m взаємодії праймер/матриця (і, отже, стабілізують взаємодію дуплексу).

Дезоксирибонуклеозидтрифосфати

Для синтезу ДНК необхідні вільні дезоксирибонуклеозидтрифосфати (дНТФ). Концентрація дНТФ для ПЛР повинна бути від 20 до 200 мкМ для кожного дНТФ, причому всі чотири дНТФ повинні використовуватися в еквівалентних концентраціях для мінімізації помилок приєднання [1].

Високоочищені дНТФ можуть бути отримані від ряду виробників, як у вигляді індивідуальних дезоксирибонуклеозидтрифосфатів, так і у вигляді суміші всіх чотирьох дезоксирибонуклеозидтрифосфатів. Базові розчини дНТФ (зазвичай з концентрацією 100 мМ) повинні бути доведені до рН 7.0-7.5 за допомогою 1М NaOH, щоб забезпечити рН кінцевої реакції не нижче 7.1.

Кількість циклів і ефект плато

Число циклів ампліфікації, які необхідні для отримання видимої смуги продукту в гелі, значною мірою залежить від вихідної концентрації цільової ДНК. Для того, щоб ампліфікувати 50 цільових молекул, рекомендовано 40-45 циклів, водночас як для того, щоб ампліфікувати 3×10^5 молекул до такої самої концентрації, достатньо 25-30 циклів. Така непропорційність відбувається через так званий ефект плато, який є згасанням експоненційної швидкості накопичення продукту на пізніх стадіях ПЛР, коли продукт досягає концентрації 0,3-1,0 нМ.

Причиною цього може бути деградація реактантів (дНТФ, ферментів), виснаження реактантів (праймерів, дНТФ: у першому випадку виникне проблема накопичення коротких продуктів реакції, у другому випадку – проблема накопичення довгих продуктів), а також інгібування кінцевим продуктом (утворення пірофосфату), конкуренція з неспецифічними продуктами за реактанти, конкуренція за зв'язування праймера шляхом ре-відпалу концентрованого (10 нМ) продукту.

Якщо бажаний продукт не отриманий за 30 циклів, слід відібрати невелику пробу (1 мкл) ампліфікованого продукту, перемішати і ре-ампліфікувати протягом 20-30 циклів в новому реакційному середовищі, а не продовжувати наступні цикли першої реакції.

ПЛР є потужним аналітичним і препаративним методом. Однак, внаслідок природи цієї процедури, слідові кількості домішок ДНК можуть бути матрицями, приводячи до ампліфікації помилково-цільової нуклеїнової кислоти (хибно-позитивний результат). Таким чином, критичним моментом у ампліфікації є її проведення у вільному від ДНК середовищі [1].

Забезпечення фізичної ізоляції робочої зони за допомогою спеціального обладнання знижує ризик забруднення. Суворе дотримання вимог знезараження (очищення від домішок нуклеїнових кислот, запобігання потрапляння аерозолів і т.ін.) – є найважливішим етапом зведення до мінімуму помилково-позитивних результатів.

Попадання домішок в середовище ПЛР може відбуватися за рахунок таких джерел:

- лабораторні столи, обладнання та прилади для піпетування, які можуть бути забруднені попередніми препаратами ДНК або очищеними рестрикційними фрагментами;
- перехресне забруднення, що відбувається між зразками;
- продукти попередньої ампліфікації.

Способи уникнення контамінації:

Для того, щоб уникнути контамінації та забруднення, необхідно створити фізичну ізоляцію робочої зони відповідно до таких вимог.

1. Зона приготування зразків.

Це приміщення складається із зони, де здійснюються всі етапи, які передують ампліфікації матричної ДНК (тобто, виділення та очистка ДНК).

2. Приміщення для постановки ПЛР. Це «чисте» приміщення призначене для процедур, пов'язаних з підготовкою реакції ПЛР (у тому числі, приготування основного розчину, розведення праймерів і т.ін.).

3. Пост-ПЛР зона. Ця зона призначена для ампліфікації цільової послідовності ДНК, а також для детекції та аналізу ПЛР продуктів.

Слід дотримуватися таких загальних правил [1]:

- всі приміщення повинні містити призначене для них обладнання та витратні матеріали (халати, рукавички, реагенти і пластик);
- реагенти повинні бути марковані, із зазначенням складу і дати приготування;
- використовувати тільки односпрямовану систему переміщення інгредієнтів, тобто ніколи не переносити матеріали, зразки або обладнання з пост-ПЛР зони в приміщення, де йде підготовка до ПЛР;
- використовувати одноразові реакційні пробірки для ПЛР, вільні від ДНКаз і РНКаз;
- використовувати спеціальні, стійкі до аерозолів наконечники піпеток та спеціально призначений (використовуваний тільки для ПЛР) набір піпеток;
- якщо можливо, проводити ПЛР реакції під витяжкою, обладнаної УФ лампою. Під витяжкою слід зберігати і мікроцентрифугу, і одноразові рукавички, які використовуються тільки для ПЛР;
- періодично мити столи і полиці 10% хлорним вапном, а потім 70% етанолом;
- використовувати стерильну техніку і завжди надягати свіжі рукавички, коли працюєте в зонах, описаних вище. Частіше міняти рукавички, особливо, якщо ви підозрюєте, що вони могли бути забруднені розчинами, що містять матричну ДНК;
- завжди використовувати новий та/або стерильний посуд, вироби з пластика і піпетки для приготування реагентів для ПЛР і матричної ДНК;
- автоклавувати всі реагенти і розчини, які можна автоклавувати, не порушуючи їх активність. Праймери, дНТФ і Таq ДНК-полімераза не можна автоклавувати.

Багато використовувати власний набір ПЛР реагентів і розчинів, які використовуються тільки для ПЛР, і зберігати ці реагенти невеликими порціями. Під час піпетування ДНК треба уникати утворення аерозолів, які можуть призводити до забруднення.

Завжди потрібно включати в план експерименту контрольні реакції, наприклад, негативний («без ДНК») контроль, який містить всі реакційні компоненти, за винятком матричної ДНК, а також позитивний контроль, який був успішно використаний в попередніх ПЛР [1].

Приготування реакційної суміші для ПЛР

Необхідними реакційними компонентами для ПЛР є вода, реакційний буфер, термостабільна ДНК полімераза, олігонуклеотидні праймери, дезоксирибонуклеотиди, матрична (цільова) ДНК, а також іони магнію (Mg^{2+}). Загалом, всі ці реагенти (за винятком матричної ДНК), змішуються в одній пробірці в достатньому обсязі, відповідно до числа реакцій, які передбачається поставити (основна суміш). Потім з основної суміші відбирають аліквоти в окремі пробірки і додають матричну ДНК.

Контролі

Для того, щоб отримати надійні результати, завжди слід використовувати як позитивні, так і негативні контролі під час проведення ПЛР.

Потенційним джерелом забруднення реакції можуть бути зразки, співробітники лабораторії, система кондиціонування повітря, обладнання та реагенти.

Серед забруднювальних факторів можна відзначити:

- 1) перенесення домішок ампліфікованої цільової ДНК з попередніх серій ПЛР;
- 2) перехресне забруднення між зразками, що призводить до перенесення цільової ДНК від одного зразка до іншого;
- 3) геномна ДНК з колишніх зразків;
- 4) продукти деградації з реакції деконтамінації.

У той час як перші три форми контамінації дають помилково-позитивні результати, останній тип призводить до отримання хибно-негативного сигналу. Ця форма контамінації вперше спостерігалася Нідерхаузером і співробітниками у 1994 р, і вона призводить до інгібування реакції ПЛР.

Кількісна ПЛР (qPCR)

qПЛР (*англ.* quantitative - кількісний) або ПЛР у реальному часі – метод, який дозволяє паралельно з ампліфікацією проводити визначення концентрації ДНК. Для детектування використовують флуоресцентні барвники і зонди, наприклад SYBR Green і TaqMan (рис.8).

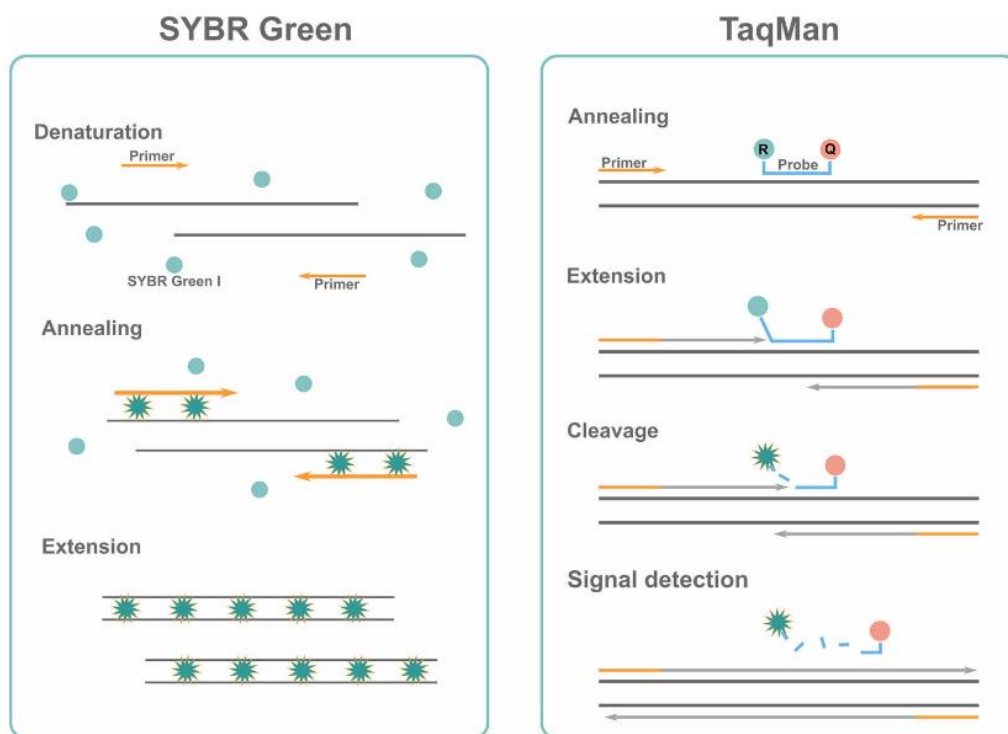


Рисунок 8 – Принцип дії флуоресцентних барвників SYBR Green та TaqMan [3]

Принцип SYBR Green qПЛР. Флуоресцентний барвник SYBR Green «вставляється» в дволанцюгові послідовності ДНК під час фази синтезу дочірнього ланцюга ДНК, внаслідок чого зростає флуоресцентний сигнал зразку. Недоліком цього методу є низька специфічність, тому що SYBR Green зв'язується з будь-якою дволанцюговою послідовністю ДНК, тобто також неспецифічні продукти qPCR, наприклад, в димери праймерів. Цього недоліку немає TaqMan.

Принцип TaqMan qПЛР. Зонди TaqMan мають на 5'-кінці флуоресцентним барвник та і 3'-кінці речовину, яка гасить барвник. TaqMan зонди є мішень-специфічними та зв'язуються лише з цільовою послідовністю ДНК з праймером під час відпалу.

Під час синтезу дочірньої ДНК Taq-полімераза сприяє вивільненню барвника TaqMan від речовини, яка його гасить, через що зростає вимірний флуоресцентний сигнал наприкінці кожного циклу qПЛР. Цей метод є дорожчим, але є більш специфічним, оскільки дає змогу виявляти цільові послідовності [4].

Концентрацію ДНК визначають за графіком. Зазвичай графік будує прилад, базуючись на детектуванні флуоресцентного сигналу. При цьому на осі x- кількість циклів, на осі y – виявлений флуоресцентний сигнал. З рисунку 9 видно, що для негативного контролю значення флуоресценції не зростає, в той час як для проб зростання суттєве.

Як видно, флуоресценція залишається на фоновому рівні протягом перших теплових циклів. Згодом флуоресцентний сигнал досягає порогу флуоресценції, де його можна виявити на фоні флуоресценції (на графіку – пряма лінія $y=1 \cdot 10^3$ RFU), номер циклу, за якого це відбувається, називається пороговим циклом (Ct).

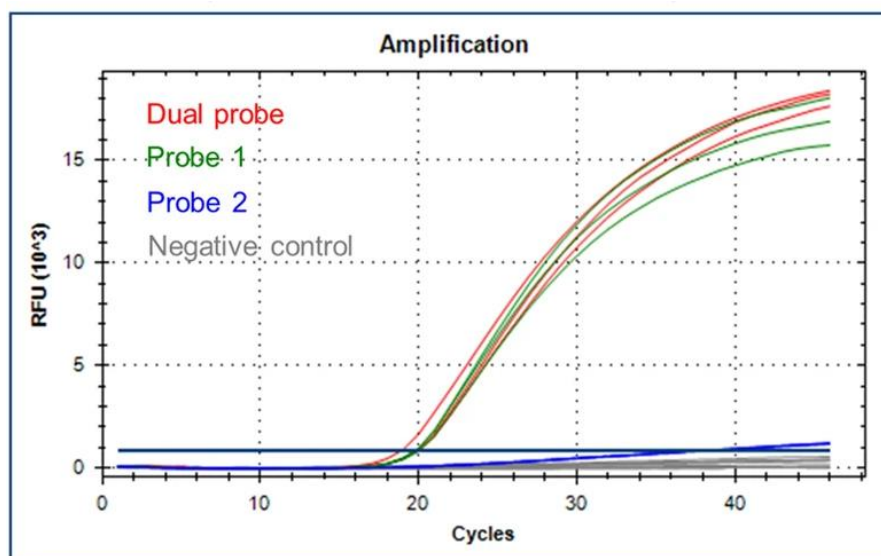


Рисунок 9 – Приклад кривих ампліфікації qПЛР [4]

Обладнання та матеріали: одноразові рукавички, вортекс, мікроцентрифуга на 12 000 об/хв; термошейкер; штативи для пробірок; автоматичні дозатори з носиками на 1000, 200 та 10 мкл, мікропробірки Eppendorf на 1,7 мл та 0,2 мл, ампліфікатор, ємність для льоду.

Реактиви: деіонізована вода, 10×реакційний буфер В, 2 мМ дНТФ, специфічні олігонуклеотиди 10 мкМ, буфер для завантажування (60 % сахароза, 0,4 мг/мл крезол червоний), 5 од/мкл Таq ДНК-полімераза, ТЕ буфер, зразки загальної ДНК 30 нг/мкл.

Хід роботи

1. В даній лабораторній роботі використовувати зразки ДНК, отримані в лабораторних роботах 1-3.

2. ПЛР-буфер перед проведенням дослідження необхідно довести до кімнатної температури (+18...+25°C), ретельно перемішати і осадити краплі зі стінок мікропробірки за допомогою вортекса.

3. Розчин полімерази дістати із морозильної камери безпосередньо перед використанням, ретельно перемішати і осадити краплі за допомогою вортекса.

4. Приготувати реакційну суміш. Провести активацію необхідної кількості буфера шляхом додавання полімерази з розрахунку на 1 реакцію: 15 μ l (мкл) буфера + 1 μ l (мкл) полімерази.

Кількість реакцій розрахувати за формулою: $n+3$, де n -кількість зразків для аналізу, 3- кількість додаткових пробірок з готовою сумішшю. Додаткові пробірки необхідні для позитивного та негативного контрольних зразків (ПКЗ та НКЗ) і мінімального запасу на похибку піпетування (1 зразок).

(Готова суміш не зберігається. Рекомендовано готувати реакційну суміш безпосередньо перед проведенням дослідження)

5. Поставити у штатив необхідну кількість пробірок або стріпів для ампліфікації ДНК досліджуваних і контрольних проб.

6. Внести по 15 μ l (мкл) реакційної суміші у кожну пробірку.

7. Додати по 10 μ l (мкл) досліджуваних зразків.

8. В окремому ПЛР-боксі для внесення позитивних контрольних зразків додати в окрему пробірку 10 μ l (мкл) ПКЗ, закрити кришку.

9. Встановити всі пробірки (стріпи) в блок ампліфікатора.

10. Запрограмувати ампліфікатор (рис. 10).

Програма ампліфікації для приладів планшетного типу (ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96 (ДНК-Технологія), CFX-96 (Bio-Rad))

№ блоку	Температура, °C	Час, хв	Час, сек	Кількість циклів	Детекція	Тип блоку
1	95	5	00	1		цикл
2	94	0	10	5		цикл
	58	0	20			
	72	0	20			
3	94	0	10	40		цикл
	58	0	35		v	

Рисунок 10 – Приклад програми ампліфікації [5]

Встановити значення для каналу HEX – 3000;

Детектування флуоресценції – HEX/Yellow другого блоку циклювання.

11 Після закінчення виконання програми приступити до аналізу та інтерпретації результатів.

Результати інтерпретують на основі наявності (чи відсутності) перетину S-подібної (сигмоподібної) кривої флуоресценції зі встановленою на відповідному рівні пороговою лінією (Baseline Threshold), що визначає наявність чи відсутність значення порогового циклу Ct у відповідній графі таблиці результатів, що виводиться на екран після закінчення роботи програми ампліфікації. Для врахування результатів необхідно, щоб графік флуоресценції для позитивного контрольного зразка показував характерне експоненційне зростання флуоресцентного сигналу.

В оцінці форми кривої флуоресценції досліджуваного зразка для кожного каналу еталоном вважається форма кривої флуоресценції ПКЗ. У разі отримання значень порогового циклу НКЗ результати всієї постановочної серії вважають недостовірними. Необхідне повторне проведення дослідження, починаючи з етапу екстракції ДНК.

Оформлення результатів

1. Опишіть ген, який ампліфікували.
2. Проілюструйте виконану роботу власними фото та результатами роботи програми (рис.11).

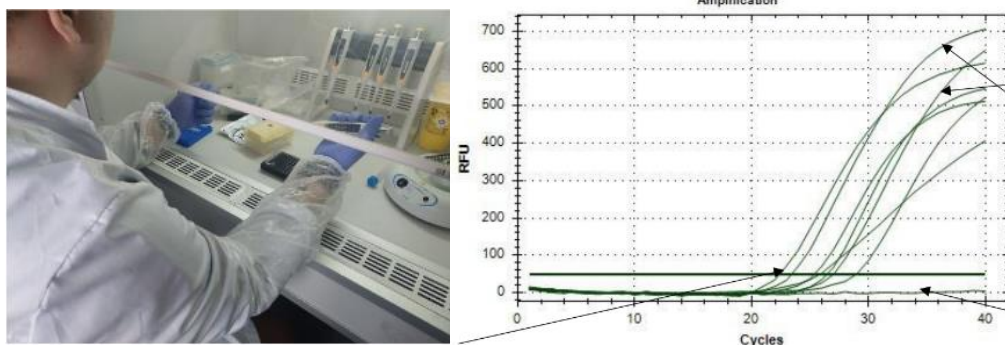


Рисунок 11 – Приклади фото ходу виконання роботи та отриманих результатів

3. Виділіть будь-яким способом (стрілочками, кольором тощо) отримані криві ампліфікації та опишіть їх. Проаналізуйте отриманні результати.

4. Зробіть висновки. У висновках проаналізуйте метод напрацювання цільової послідовності, його принцип, переваги та недоліки.

Опишіть принцип роботи ПЛР в реальному часі, який використовували у дослідженні, в чому полягають його переваги та недоліки. Вкажіть для чого використовують ПЛР, зокрема qПЛР, а не, наприклад імуноферментний аналіз.

Контрольні запитання

1. Температура плавлення ПЛР: що вона означає, від чого вона залежить?
2. Основні принципи ПЛР. Основні стадії ПЛР. Ефект плато. Для чого використовують ПЛР, зокрема qПЛР?
3. Роль праймерів. Принципи підбору праймерів.
4. Компоненти (буфер, суміш нуклеотидів, солей, полімерази, праймери, матриця) та їх роль в ПЛР.
5. Види полімераз, які застосовують в ПЛР. Напрямок зчитування матричної ДНК.
6. Особливості умов проведення ПЛР. Види забруднень. Типи контролів.

Лабораторна робота 6. Аналіз ампліконів методом електрофорезу в агарозному гелі

Мета – засвоїти метод електрофорезу в агарозному гелі послідовностей ДНК.

Теоретичні відомості

Електрофорез в агарозному гелі – це метод, який слугує для розділення макромолекул на основі їх розміру, електричного заряду й інших фізичних властивостей. Рушійною силою електрофорезу є напруга між електродами, розташованими на початку та кінці гелевої пластини, в товщі якої під впливом електричного поля мігрують заряджені частинки. Властивості цих частинок або молекул (розмір, заряд та ін.) визначають, наскільки швидко електричне поле може переміщати їх через драглеподібне середовище [1].

Метод електрофорезу в агарозному гелі широко використовується для розділення, ідентифікації за розміром та очищення фрагментів ДНК. Ця методика проста, швидка, і дає змогу розділяти фрагменти ДНК, які не можуть бути ефективно розділені за допомогою інших процедур. Локалізацію ДНК в гелі після розділення можна визначити шляхом мічення її бромистим етидієм – флуоресцентним інтеркалярним барвником – за низьких концентрацій.

Фізичні принципи електрофорезу в агарозному гелі засновані на таких основних властивостях макромолекул як заряд і маса. Фрагменти ДНК в буферному розчині, що розділяють, наносять на гель, в якому вони рухаються.

Під дією електричного поля заряджені частинки (молекули) відштовхуються від одного електрода, натомість притягуючись іншим, з протилежним знаком. Водночас, маючи різний розмір і форму, частинки рухаються з різною швидкістю, оскільки гель діє як "молекулярне сито", розділяючи молекули [1].

Отже, в процесі електрофорезу швидкість переміщення макромолекул через пори гелю в електричному полі залежить від таких параметрів, як:

- сила електричного поля;

- розмір і форма молекул;
- відносна гідрофобність зразків;
- іонна сила і температура буфера, у якому рухаються молекули.

Коли до електродів прикладається напруга, створюється градієнт потенціалу E , який може бути виражений рівнянням:

$$E = V/d \quad (1)$$

де V – напруга, що вимірюється у вольтах,

і d – відстань між електродами в сантиметрах.

Коли створюється градієнт потенціалу E , на зарядженій молекулі утворюється сила F , що виражається рівнянням:

$$F = Eq \quad (2)$$

де q – заряд на поверхні молекули в кулонах. Ця сила, яка вимірюється в Н, переміщує заряджену молекулу до електрода.

Існує, також, опір тертя, який уповільнює рух заряджених молекул. Сила тертя є функцією від таких параметрів:

- гідродинамічний розмір молекули;
- форма молекули;
- розмір пор середовища, в якому відбувається електрофорез;
- в'язкість буфера.

Електрофоретична рухливість – це швидкість руху частинки (зазвичай виражається в см/с) за напруженості електричного поля в 1 В/см. Ця величина має розмірність $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{В}^{-1}$, а її знак збігається зі знаком сумарного заряду макромолекули [1].

Швидкість V зарядженої молекули в електричному полі є функцією градієнта потенціалу (E), заряду (q) і сили тертя молекули і може бути виражена рівнянням:

$$V = Eq/f \quad (3)$$

де f – це коефіцієнт тертя.

Електрофоретична швидкість M будь-якого іона може бути визначена швидкістю іона, розділеної на градієнт потенціалу:

$$M = V/E \quad (4)$$

Коли створюється різниця потенціалів, молекули з різним сумарним зарядом починають розділятися відповідно до різної електрофоретичної рухливості. Електрофоретична рухливість є дуже важливим параметром, який характеризує заряджену молекулу або частинку, цей параметр залежить від величини pK зарядженої групи і розміру молекули, або частинки. Навіть молекули з однаковим зарядом будуть розділятися, якщо в них різний розмір молекул, оскільки вони будуть відчувати вплив різної за величиною сили тертя.

Лінійна дволанцюгова ДНК рухається через матрикс гелю зі швидкістю, яка обернено пропорційна десятковому логарифму числа нуклеотидних пар. Молекули більшого розміру переміщуються повільніше, внаслідок більшого опору тертя і меншої ефективності проходження через пори гелю.

Струм в розчині між електродами створюється, в основному, за рахунок іонів буфера і, невеликою мірою, за рахунок іонів аналізованого зразка. Співвідношення між струмом I , напругою V і опором виражається, як в законі Ома:

$$R = V/I \quad (5)$$

Це рівняння демонструє, що за заданого опору можливо прискорити електрофоретичне розділення шляхом збільшення напруги V , яка подається, що приведе до відповідного збільшення струму I . Пройдена відстань буде пропорційною величині струму і часу [1].

Однак, підвищення напруги V і відповідне збільшення струму I може стати причиною однієї із серйозних проблем для різних видів електрофорезу, а саме – утворення тепла.

Це може бути проілюстровано рівнянням, в якому потужність W (вимірювана у Вт), що генерується в процесі електрофорезу, дорівнює добутку опору і квадрату сили струму:

$$W = I^2 \cdot R \quad (6)$$

Оскільки основна частина потужності, вироблена в процесі електрофорезу, витрачається у вигляді тепла, можуть виникати такі небажані ефекти:

- зростає швидкість дифузії іонів досліджуваного зразка і буфера, що призводить до розширення зони розділення зразка;
- утворення конвекційних струмів, що призводить до перемішування розділених зразків;
- термічна нестабільність зразків, які більш чутливі до нагрівання;
- зменшення в'язкості буфера, що призводить до зниження опору середовища.

ДНК – слабка кислота, тому вона рухається до аноду («+») за рахунок негативно заряджених фосфатних груп.

За рухом ДНК (РНК) в пластині гелю можна стежити за смугами барвників, що входять до складу буферу для завантаження. Швидкість руху ДНК (РНК) через пори агарозного гелю під час електрофорезу визначається розміром молекул і їх конформацією. Молекули лінійної дволанцюгової ДНК переміщуються в товщі гелю зі швидкостями, обернено пропорційними десятковому логарифму їх молекулярних мас. Швидше мігрують низькомолекулярні фрагменти, великі молекули рухаються повільніше через більший опір. З нативних молекул НК найшвидше рухається тРНК розміром 70-90 нуклеотидів і 5S рРНК розміром 120 нуклеотидів.

Найбільш великі фрагменти геномної (хромосомної, ядерної) ДНК можуть досягати розмірів 100000 п.н. Для визначення розміру фрагментів використовують маркери молекулярної маси (DNA Ladder), які наносять у сусідні лунки гелю [1].

Для фарбування отриманих смужок ДНК застосовують *барвник* 3,8-діаміно-5-етил-6-феніл-фенантрідіум бромід (бромистий етидій EtBr ($\lambda_{\text{max}} = 590$ нм)). Молекули EtBr інтеркалюють у молекули ДНК, тобто вбудовуються між сусідніми парами нуклеотидів. Інтенсивність флуоресценції зв'язаного EtBr в 20 разів вище, ніж вільного. Таке забарвлення забезпечує високу чутливість: від 10 нг ДНК можна побачити у вигляді смужки помаранчевого кольору. Застосовують і інші барвники, зокрема SYBR Green ($\lambda_{\text{max}} = 497$ нм). Довжина хвилі приладу для візуалізації ДНК УФ-трансілюмінатора – 305-320 нм.

Агароза – це лінійний полімер (середня молекулярна маса ~ 12000 кДа) полісахаридної природи, елементарною ланкою якого є дисахарид агаробіоза, яка, в свою чергу, складається з галактози і незвичайного цукру – 3,6-ангідрогалактози, завдяки якому агароза стійкіша проти мікроорганізмів. Водночас, агароза дуже крихка, і легко руйнується під час маніпулювання. *Агарозний гель* має «пори» великого розміру, внаслідок чого розділення відбувається швидко. Завдяки цьому ж роздільна здатність такого гелю тяж обмежена. Крім того смуги, що утворюються в агарозних гелях, мають тенденцію розмиватися/дифундувати/розповсюджуватись в сторони.

Оскільки агар отримують з морських водоростей, його склад може варіювати і містити шкідливі домішки, що впливають на процес розділення. Агароза може бути легкоплавкою (з температурою плавлення близько 65°C), яку застосовують для розділення термолабільних зразків, а також з нормальною та підвищеною температурою плавлення. Для розділення ДНК використовують агарозу з температурою плавлення $\approx 90^{\circ}\text{C}$, тому готують гель, розчиняючи сухий порошок у водному буфері, та кип'ятять суміш у мікрохвильовій печі або на водяній бані до плавлення та утворення прозорого розчину.

Після цього розчин наливають на підкладку і дають застигнути для формування міцного гелю. Легкоплавка агароза застигає за температури 30 °С, гель для розділення ДНК формує матрикс за температури близько 40 °С. Його щільність визначається концентрацією [1].

Буфер для електрофорезу необхідний як для стабілізації рН, так і для електрофоретичної рухливості ДНК завдяки електропровідності гелю. Електропровідність, в свою чергу, виникає за рахунок іонів, отже на неї впливає склад і іонна сила буфера для електрофорезу.

За відсутності іонів електропровідність мінімальна, тому переміщення ДНК відбувається повільно. У буфері з високою іонною силою електропровідність висока, але утворюється велика кількість тепла. В такому разі гель може розплавитись, а ДНК – денатурувати.

Існує кілька буферів для електрофорезу нативної дволанцюгової ДНК. Вони містять ЕДТА (рН 8,0) і Tris-ацетат (ТАЕ), Tris-борат (ТВЕ), або Tris-фосфат (ТРЕ) концентрацією приблизно 50 мМ (рН 7,5 – 7,8). Буфери для електрофорезу, як правило, готують концентрованими і зберігають за кімнатної температури.

Розчин ДНК в лунки гелю вносять в буфері (*буфер для завантаження, loading buffer, LB*), що містить гліцерин або сахарозу, щоб ДНК відразу опустилася на дно лунки, а не розчинилася в електрофорезному буфері ще до включення струму і входження в гель.

Концентрація агарози. Фрагменти ДНК певних розмірів рухаються в гелі з різними швидкостями, тому опиняються на різних відстанях залежно від концентрації агарози. Підбираючи концентрацію агарози (табл.1) і/або буфера, можливо розділити фрагменти ДНК, що містять від 20 до 50 000 п.н. Для горизонтального електрофорезу ДНК використовують концентрацію агарози від 0,7% до 3%.

Таблиця 1 – Рекомендовані концентрації агарози для розділення лінійних молекул ДНК [1]

Концентрація агарози, %	Діапазон розмірів ДНК (п.н.)
0,75	10 000 – 15 000
1,00	500 – 10 000
1,25	300 – 5000
1,50	200 – 4000
2,00	100 – 2500
2,50	50 – 1000

Рухливість різних форм ДНК. Дволанцюгові молекули ДНК, що мають однакову молекулярну масу, але різні конформації, будуть рухатися з різною швидкістю. Так, кільцева суперспіралізована форма плазмід, кільцева з одноланцюговим розривом і лінійна форма плазмід рухаються в агарозному гелі з різними швидкостями [1].

У 1% агарозному гелі одноланцюгова ДНК (і РНК) рухається приблизно на 10% швидше, ніж дволанцюгова ДНК того самого розміру. Ця ДНК (РНК) забарвлюється бромистим етидієм приблизно в 4-5 разів слабкіше, що необхідно враховувати у разі візуальної оцінки результатів електрофорезу.

Обладнання та матеріали: мікроцентрифуга на 12 000 об/хв, камера для електрофорезу з блоком живлення, штативи для пробірок, плашка для електрофорезу, гребінки, плашка для змішування, вортекс, водяна баня або мікрохвильова піч, автоматичні дозатори з наконечниками на 1000, 200 та 10 мкл, гель-документуючий пристрій, одноразові та захисні рукавички.

Реактиви: 1×SB буфер, агароза, бромистий етидій 10 мг/мл, LB-буфер, маркер молекулярної маси, дистильована вода, препарати ампліфікованої ДНК.

Хід роботи

1. Підготувати обладнання. Закрити гелеву плашку з обох боків гумовими спейсерами.

2. Приготувати 1,6 % агарозу. Для цього зважити 1,6 г агарози, перенести її до чистої банки та додати 100 мл 1×SB буферу.
3. Розчинити агарозу у мікрохвильовій пічці або на водяній бані, перемішуючи, до прозорості розчину. Брати колбу лише в захисних рукавичках!
4. Охолодити розчин агарози приблизно до 40 °C під струменем холодної води.
5. Додати до розчину агарози 5 мкл бромистого етидію.
6. Залити розчин агарози в плашку, так щоб утворився шар гелю ≈ 5 мм.
7. Вставити у гель гребінку для формування лунок.
8. Залишити гель для застигання на 20-30 хв.
9. Скинути розпорошені по краях краплі зразків вниз на вортексі. Змішати зразки ДНК з буфером для завантаження (6×LB). Для цього нанести на отвори плашки по 1 мкл LB та додати по 5 мкл зразку ДНК. Перемішати.
10. Обережно витягти гребінку та зняти гумові спейсери.
11. Розморозити, перемішати та скинути на вортексі маркер молекулярних мас.
12. Перенести плашку з гелем у електрофорезну камеру. Додати буфер. Буфер має повністю покрити гель.
13. Обережно внести по 6 мкл зразків ДНК в окремі лунки гелю, що утворились від вставленої гребінки (рис.12) .
14. Обережно внести у окрему лунку 6 мкл маркеру молекулярної маси.
15. Закрити камеру, включити блок живлення та встановити напругу 100 В. Проводити електрофорез протягом 30-45 хв.
16. Сфотографувати гель, використовуючи гель-документуючий пристрій (рис.13).

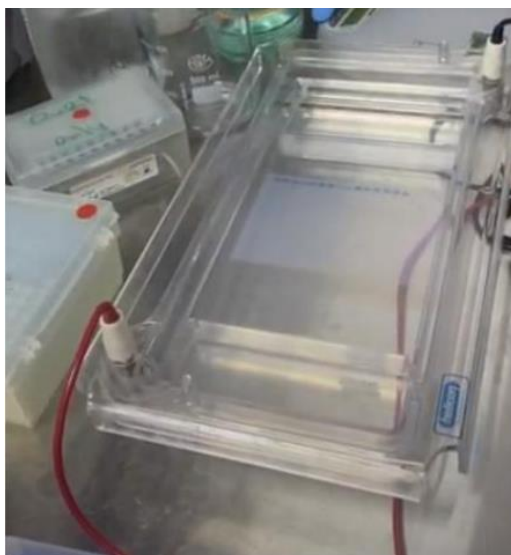


Рисунок 12 – Підготовлена до процедури камера для електрофорезу з внесеними в лунки гелю зразками і маркером молекулярних мас.

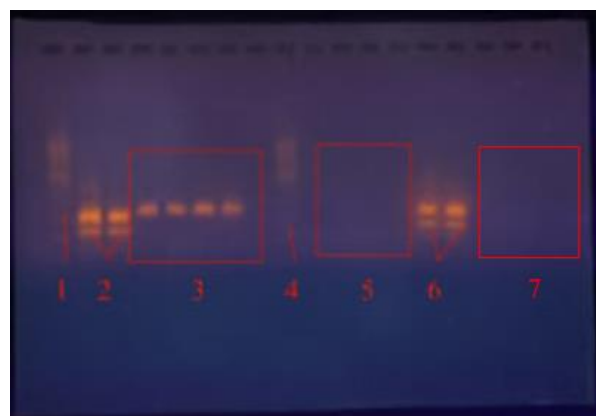


Рисунок 13 – Фото гелю за ультрафіолетового освітлення в транслюмінаторі після проведення електрофорезу.

Оформлення результатів

1. Проілюструйте виконану роботу власними фото. Промаркуйте й опишіть смужки, які отримали. Визначте молекулярну масу ампліфікованого зразку.

2. Зробіть висновки. У висновках проаналізуйте отримані результати, принцип електрофорезу, який використовували у дослідженні, в чому полягають його переваги та недоліки.

Контрольні запитання

1. Електрофорез. Фізичні принципи електрофорезу в агарозному гелі.
2. Параметри від яких залежить електрофорез.
3. Фізико-хімічні характеристики агарози. Вплив концентрації агарози на проведення електрофорезу.
4. Роль буферу у електрофорезі.
5. Вплив електричного поля та вмісту іонів на проведення електрофорезу.
6. Роль барвників при проведенні електрофорезу. Бромистий етидйї: потенційні небезпеки, основні правила техніки безпеки під час роботи з ним.
7. Вплив форми нуклеїнових кислот на рухливість.

Лабораторна робота 7. Спектрофотометричне дослідження зразків ДНК

Мета – засвоїти методи спектрофотометрії зразків ДНК.

Теоретичні відомості

Досить часто кількісну та якісну оцінку препарату виділеної ДНК в першому наближенні можна дати за результатами електрофорезу. Для цього візуально порівнюють на сусідніх доріжках гелю інтенсивність флуоресценції в ультрафіолеті отриманого зразка із зразком відомої концентрації [1].

Кількісний вміст ДНК, РНК, олігонуклеотидів і навіть мононуклеотидів може бути визначений безпосередньо у водному розчині або в буфері з низькою іонної силою (наприклад, ТЕ буфері) у розведеному або в нерозведеному вигляді шляхом вимірювання величини поглинання A в ультрафіолетовому світлі. Якщо зразок є досить очищеним (тобто, без значної кількості домішок, таких як білки, фенольні сполуки або агароза), то спектрофотометричне визначення кількості ультрафіолетового світла, що поглинається основами, є простим і точним.

Фізико-хімічний метод абсорбційної спектрофотометрії широко застосовують для дослідження розчинів і твердих речовин, в основі якого лежить здатність атомів, іонів і молекул поглинати в ультрафіолетовій (від 200 до 400 нм), видимій (від 400 до 760 нм) та інфрачервоній (понад 760 нм) областях спектра. Згідно із законом Бугера-Ламберта-Бера інтенсивність світла, що пройшло через середовище, зменшується залежно від концентрації розчину, яку таким способом можна визначити. Однак, молярний коефіцієнт поглинання залежить від довжини хвилі λ .

Нуклеїнові кислоти поглинають УФ випромінювання завдяки азотистим основам, які є хромофорами, причому піримідинові основи поглинають краще за пуринові і мають здатність поглинати в 10-20 разів інтенсивніше за хромофори білку – триптофан, тирозин і фенілаланін.

Область поглинання нуклеїнових кислот знаходиться на довжинах хвиль від 240 до 290 нм з максимумом 260 нм, перекриваючи спектр поглинання білків з максимумом 280 нм [1].

Для вимірювання спектрів використовують спектрофотометри, в яких вимірюють інтенсивність світла певної довжини хвилі, що пройшло через зразок, яка вимірюється фотоелементом. Довжину світла встановлюють за допомогою призми або дифракційної решітки та фільтрів, кювета для роботи в ближньому ультрафіолеті має бути кварцовою. Зазвичай спектрофотометри використовують для визначення концентрації розчиненої речовини, в хімії, молекулярній біології та біофізиці – для визначення спектрів поглинання.

Конструкція однопроменевого спектрофотометра включає джерело світла, призму, тримач зразка і фотоелемент. До кожного з елементів приладу приєднані відповідні електричні або механічні системи для контролю інтенсивності світла, довжини хвилі і для перетворення отриманої фотоелементом енергії в коливання напруги. Коливання напруги фіксуються на метричній шкалі, або записуються на приєднаний комп'ютер для подальших досліджень. Для двопроменевих спектрофотометрах світло розщеплюється на два променя, що проходять через зразок і розчинник одночасно.

Концентрація нуклеїнових кислот зазвичай визначається за довжини хвилі 260 нм порівняно зі стандартним розчином. Для встановлення «оптичного нуля» спектрофотометра використовують деіонізовану воду, A_{260} якої дорівнює нулю. Це важливо, оскільки наявність будь-якої мікрофлори та ферментів, які містять ДНКази або РНКази, може знизити точність результатів вимірювання, оскільки руйнують нуклеїнові кислоти.

Слід також уважно поставитись до розведення зразків, щоб оптична густина знаходилась в межах шкали оптичної щільності спектрофотометра, оскільки з цим пов'язана точність розрахунку концентрації нуклеїнових кислот.

Виміряну за A_{260} і розраховану концентрацію препарату нуклеїнових кислот можна вважати правильною у разі впевненості чистоти отриманого препарату.

Для цього вимірюють оптичну густину зразку ДНК, звільненого від РНК, за довжин хвиль 260, 280 і 230 нм, оскільки ці довжини хвиль відповідають максимумам поглинання нуклеїнових кислот, білків і полісахаридів, відповідно. Потім розраховують співвідношення A_{260}/A_{280} і A_{260}/A_{230} , які для чистої ДНК мають бути більше 1,8 і 2,2, відповідно. Для ДНК, виділеної з рослинної сировини, слід особливу увагу звернути на друге співвідношення, оскільки полісахариди рослинної сировини містять лігнін, що поглинає в УФ-ділянці спектру, тому що до його складу входять ароматичні кільця. У разі недостатнього очищення препарату від білків значення A_{260}/A_{280} буде значно менше, ніж 1,8, що також негативно вплине на точність визначення концентрації ДНК. Вимірювання поглинання за довжини хвилі 340 нм використовують для виявлення забрудненості кювети або присутності клітинного гомогенату [1].

Якщо вказані співвідношення витримані, то поглинання $A_{260}=1$ у разі кварцової кювети товщиною 10 мм відповідає, приблизно, 50 мкг/мл дволанцюгової ДНК, 37 мкг/мл – одноланцюгової ДНК, 40 мкг/мл – РНК та 30 мкг/мл – олігонуклеотидів.

Для оцінки вмісту домішок РНК в розчині ДНК метод спектрофотометрії не може бути застосований, оскільки РНК поглинає в тому самому діапазоні та приблизно з такою самою інтенсивністю.

Обладнання та матеріали: мікроцентрифуга на 12 000 об/хв; спектрофотометр UV-VIS PB 2201 Solar; автоматичні дозатори з наконечниками на 200 та 10 мкл, мікропробірки Eppendorf на 1,7 мл, кювета кварцова для ДНК; промивалка.

Реактиви: деіонізована вода, TE буфер, дистильована вода, препарати досліджуваної ДНК.

Хід роботи

1) Приготування зразків

1. Зразки ДНК перемішати на вортексі та осадити на центрифугу.

2. Підготувати мікропробірки на 1,7 мл. Підписати.
3. Змішати 995 мкл деіонізованої води + 5 мкл зразку ДНК (Sample).
4. Для контролю змішати 995 мкл деіонізованої води + 5 мкл ТЕ буфера pH 8,0 (Blank).
5. Зразки перемішати на вортексі та осадити на центрифугі.

2) Вимірювання:

1. Увімкнути спектрофотометр (рис.14).



Рисунок 14 – Загальний вигляд спектрофотометра моделі UV PB2201 Solar

2. Вибрати програму “Спектрофотометрія” та встановити довжину хвилі 260 нм та режим “D” (поглинання).
3. Промити кювету.
4. Перенести контроль до кювети.
5. Протерти серветкою ті стінки кювети, крізь які проходить світло.
6. Поставити кювету в отвір приладу, притиснути кювету до дна.
7. Натиснути “Blank” (повинні висвітлитися “0,000”). Натиснути ”Enter”.
8. Вийняти кювету. Залити в кювету воду, вилити вміст в ємність для зливу відходів. Промити кювету водою з промивалки декілька разів.
9. Декантувати залишки рідини.
10. Чистим носиком перенести перший зразок до кювети. Протерти за необхідності стінки кювети. Легенько постукати дном кювети по столу, щоб рідина добре її заповнила.
11. Поставити кювету в отвір приладу. Натиснути “Вимірювання”.
12. Переписати дані до таблиці в протоколі за різних довжин вимірювання.

13. Повторити пп. 11-15 для всіх зразків.
14. Після закінчення роботи вимкнути прилад. Закрити отвір.
15. Заповнити таблицю (підготувати залежно від кількості зразків):

Таблиця 2 – Результати спектрофотометрії

№	C, нг/мкл	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₄₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1							
...							
n							

16. Побудувати спектр поглинання розчинів ДНК.

3. Розведення зразків до концентрації 50 нг/мкл

1. Підготувати мікропробірки на 1,7 мл. Підписати.
2. Внести у пробірку кількості зразків, розраховані залежно від результатів спектрофотометрії (див. теоретичні дані).

Оформлення результатів

1. Заповніть таблицю, визначте чистоту отриманих і досліджених зразків, побудуйте спектр поглинання для вибраного зразку. Визначте концентрацію виділених зразків з урахуванням розведення. Проаналізуйте отриманні результати.

2. Проілюструйте виконану роботу власними фото (рис. 15).

3. У висновку опишіть принцип спектрофотометричного дослідження ДНК, в чому полягають його переваги та недоліки. Вкажіть для чого використовують спектрофотометричне дослідження ДНК.



Рисунок 15 – Визначення оптичної густини зразку за довжини хвилі 260 нм.

Контрольні запитання

1. Фізичні принципи методу абсорбційної спектрофотометрії
2. Область поглинання нуклеїнових кислот, білків, полісахаридів. Співвідношення A_{260}/A_{280} та A_{260}/A_{230} в оцінці чистоти нуклеїнових кислот.
3. Домішки в препаратах загальної ДНК та їх вплив на визначення концентрації нуклеїнових кислот.
4. Види спектрофотометрів (однопроменеві, двопробові). Принцип роботи спектрофотометра.
5. Чому для вимірювання концентрації нуклеїнових кислот необхідним є використання стерильної деіонізованої води?
6. Які компоненти нуклеїнових кислот і білків є хромофорами? Чому?
7. Навіщо застосовують спектрофотометричне визначення концентрації нуклеїнових кислот та оцінку чистоту одержаних препаратів?.

Лабораторна робота 8. Визначення концентрації ДНК флуоресцентною спектрофотометрією

Мета – опрацювати метод визначення концентрації ДНК флуоресцентною спектрофотометрією.

Теоретичні відомості

Протягом останніх років відбулось значне збільшення використання флуоресценції для біологічних застосувань, наприклад, для цитометрії, у криміналістиці, у генетичних дослідженнях тощо. Методи, засновані на флуоресценції, є високочутливими, зокрема дають змогу визначити стан клітин (жива клітина, некроз, апоптоз), локалізацію тих чи інших молекул всередині клітин, структуру і конформацію молекул та ін. В нашій лабораторній роботі вимірювання флуоресцентного випромінювання використовується для кількісного визначення нуклеїнових кислот.

Флуоресценція є одним з видів люмінесценції. Люмінесценція – це електромагнітне випромінювання будь-якою речовиною, яке виникає внаслідок переходу електронів в молекулах із збудженого стану. Крім флуоресценції, до видів люмінесценції також відносять фосфоресценцію. Випромінювання пов'язане з поглинанням надлишкової енергії, яка переводить електрони з основних енергетичних рівнів у збуджені, після чого вони повертаються на основний рівень з виділенням енергії у вигляді флуоресцентного або фосфоресцентного світіння [6].

Явище флуоресценції супроводжується поверненням електронів зі збуджених синглетних рівнів S_1^* , S_2^* , S_3^* до основного рівня.

Явище фосфоресценції супроводжується поверненням електронів зі збуджених триплетних рівнів T_1 , T_2 , до основного енергетичного рівня (рис.16).

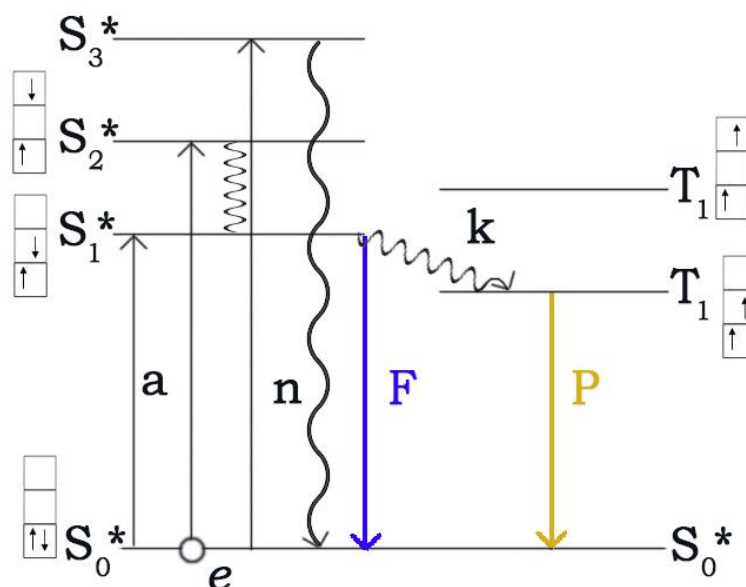


Рисунок 16 – Діаграма енергетичних рівнів молекули: S – синглетні рівні; T – триплетні рівні; a – поглинання квантів світла; n – внутрішня конверсія (безрадіаційні переходи – розсіяння енергії); F – флуоресценція; P – фосфоресценція; e – електрон; k – інтеркомбінаційна конверсія (перехід на триплетний рівень зі зміною спіну одного з електронів) [6].

Випромінювання кванта світла флуоресценції відбувається із нижнього збудженого рівня незалежно від того, на який рівень був перед цим «закинутий» електрон після поглинання кванта світла. Проявленням цієї закономірності є незалежність ні спектра флуоресценції, ні її ефективності від довжини хвилі поглиненого світла (*правило Каші*).

Швидкість флуоресценції приблизно 10^8 c^{-1} , тому тривалість флуоресценції приблизно 10 наносекунд (10^{-8} c), водночас як швидкість фосфоресценції від 1 до 1000 мс та довше (наприклад, фосфоровмісні іграшки).

Спектр збудження флуоресценції – залежність інтенсивності флуоресценції I від довжини хвилі збуджувального світла: $I=f(\lambda_z)$. Спектр збудження дещо збігається зі спектром поглинання речовини [6].

Спектр поглинання речовини – це залежність кількості поглиненого світла від довжини хвилі. Прилади, за допомогою яких реєструють спектри поглинання, називаються спектрофотометрами.

Для того, щоб електрон перейшов з основного рівня на збуджений, необхідно, щоб енергія кванта світла відповідала енергії між цими рівнями. Якщо енергія кванта менше, то електронні переходи не відбуваються (радіочастотний діапазон); якщо, навпаки, більше, то атоми іонізуються, як у випадку γ -, рентгенівського і далекого ультрафіолетового (λ від 10 до 200 нм) діапазону.

Збудження атомів відбувається у видимому діапазоні та ближній області (λ від 200 до 400 нм) ультрафіолетового діапазону.

За законом Стокса, спектр флуоресценції речовини завжди лежить у більш довгохвильовій ділянці, ніж спектр збудження чи поглинання.

Прилади, за допомогою яких реєструють спектри флуоресценції, називаються спектрофлуориметрами.

Спектри випромінювання флуоресценції – це залежність інтенсивності флуоресценції від довжини хвилі (нм) або хвильового числа (см^{-1}) (рис.17).

На графіку зображено залежність коефіцієнту екстинкції (молярний коефіцієнт поглинання) від довжини хвилі (нм) або хвильового числа (см^{-1}) та залежність інтенсивності флуоресценції від довжини хвилі (нм) або хвильового числа (см^{-1}).

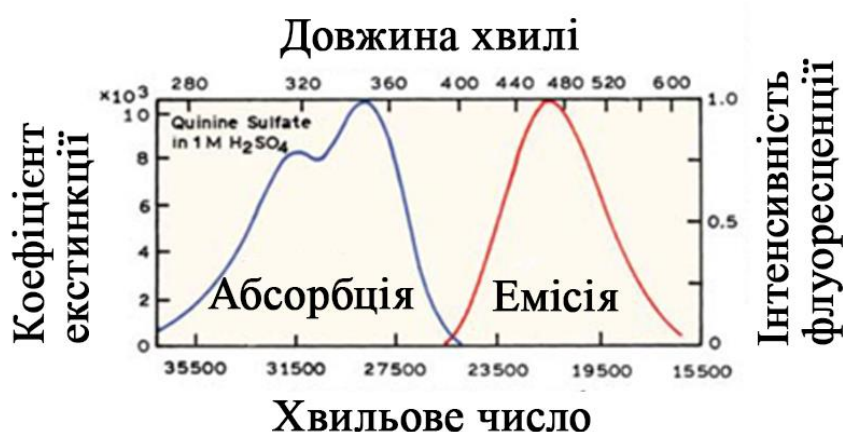


Рисунок 17 – Спектри поглинання світла та випромінювання флуоресценції хініну в 1 М H₂SO₄ [7].

Зсув спектру випромінювання в сторону збільшення довжини хвилі (батохромний зсув) пов'язаний із втратою частини енергії, а як відомо, чим більше значення довжини хвилі (λ), тим менша її частота ($\nu=1/\lambda$), а отже відповідно до формули $E=h\nu$, і менша енергія.

На рисунку 18 зображено блок-схему спектрофлуориметра. За допомогою більшості спектрофлуориметрів можна визначити обидва спектри: спектр збудження (Ex) та спектр випромінювання (Em) досліджуваної речовини.

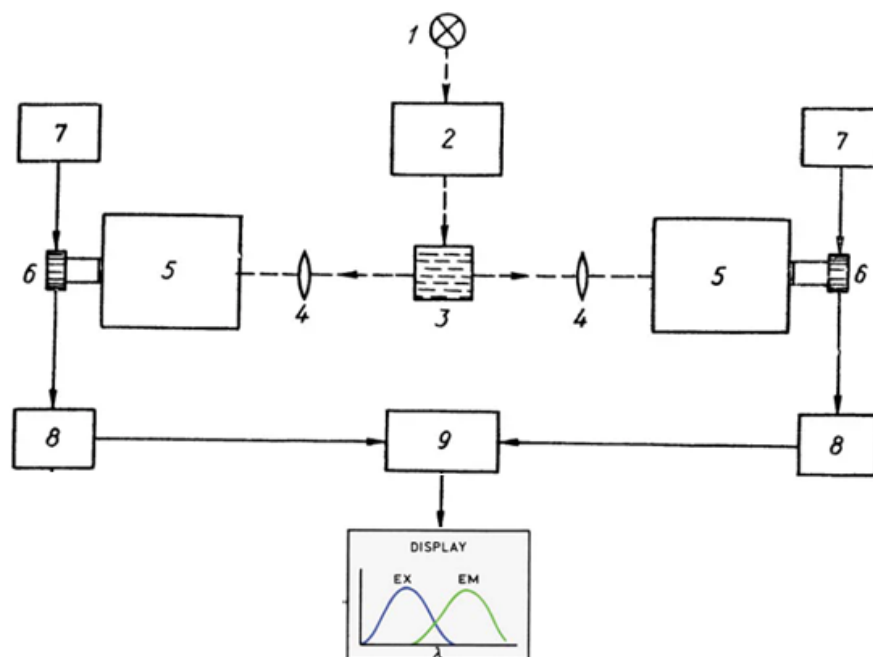


Рисунок 18 – Блок-схема спектрофлуориметра: 1 – джерело УФ світла, 2 – монохроматор збудження, 3 – кювета, 4 – лінзи, 5 – монохроматори флуоресценції, 6 – фотоелектронні помножувачі, 7 – високовольтні стабілізатори напруги, 8 – підсилювачі, 9 – комп'ютер [6, 7]

Джерело світла (1) випускає пучок світла, який проходить через монохроматор (2), який відбирає промені певної частоти. Проходячи через зразок у кюветі (3) світло далі рухається через лінзи (4) та монохроматори (5). Фотоелектронні помножувачі (6) – перетворюють отриманні світлові сигнали в електричні, які обробляє вбудований у прилад комп'ютер (9) та виводить у вигляді або числових значень або у вигляді кривої.

Квантовий вихід флуоресценції φ – відношення кількості квантів флуоресценції n_f до кількості поглинених квантів n_a або часткою переходів з випромінюванням від загальної кількості переходів (f – імовірність переходу зі збудженого стану у не збуджений з випромінюванням кванта світла; g – імовірність безвипромінювального переходу):

$$\varphi = n_f/n_a = f/f+g$$

Нуклеїнові кислоти не належать до речовин зі значимим квантовим виходом флуоресценції, тому визначення концентрації ДНК, РНК та білків за допомогою спектрофлуориметра, базується на вибіркового зв'язуванні цих сполук з флуоресцентними барвниками. Варто підбирати такі флуоресцентні барвники, що зв'язуються лише з відповідною сполукою – для того, щоб уникнути помилкового визначення домішок замість цільових молекул (рис.19).

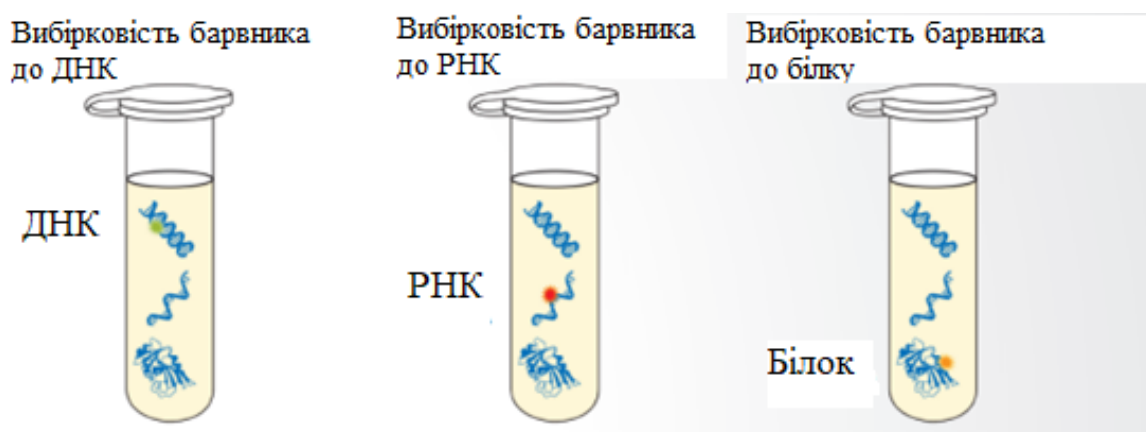


Рисунок 19 – Флуоресцентні барвники вибірково зв'язуються з ДНК, РНК або білком, випромінюючи світло різної довжини [8].

Після зв'язування ці специфічні для цільової речовини барвники після опромінення збуджувальним світлом починають випромінювати сильний флуоресцентний сигнал, інтенсивність якого вимірюють у відносних одиницях флуоресценції (RFU = relative fluorescence units). Слід зазначити, що флуоресцентні барвники, зв'язуючись, як правило, не ковалентно, – або змінюють інтенсивність, або спектр випромінювання, або і те, й інше, що дає змогу розрахувати кількість зв'язаної речовини. Це стосується, зокрема, флуоресцентних зондів, які мають декілька центрів зв'язування.

Для визначення концентрації сполук ДНК, або РНК, або білків порівнюють інтенсивність сигналу флуоресценції зі значеннями калібрувальної кривої, яку будують, використовуючи стандартні розчини з відомою концентрацією.

Наприклад, для Qubit4 побудову калібрувального графіка здійснюють (рис.20), використовуючи розчини з набору, в які входять стандартні набори ДНК з відомими концентраціями.



Рисунок 20 – Визначення концентрації ДНК на флуориметрі Qubit4 за допомогою наборів Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS [9]

Після додавання розчину буферу з барвником молекули ДНК зі стандартних наборів зв'язуються з барвником. Інтенсивність сигналу флуоресценції стандартних розчинів використовують для побудови графіку на приладі (на рис.20 точки St1, St2).

Інтенсивність сигналу флуоресценції зразка (рис.20 точка S2 (Sample2)) прилад порівнює з даними, отриманими з побудованої кривої, та видає перераховане значення концентрації ДНК в зразку, враховуючи кількість зразку, взятого для визначення.

Флуорометрія є чутливим та специфічним методом: на флуориметрі можна вимірювати інтенсивність флуоресцентного сигналу флуоресцентних молекул на основі їх характерних довжин хвиль збудження (E_x) і випромінювання (E_m).

Наприклад, для флуоресцентного барвника PicoGreen (рис. 21), що може бути застосований у флуориметричному дослідженні ДНК, приблизні максимуми поглинання/випромінювання флуоресценції становлять 502/523 нм у разі зв'язування з ДНК.

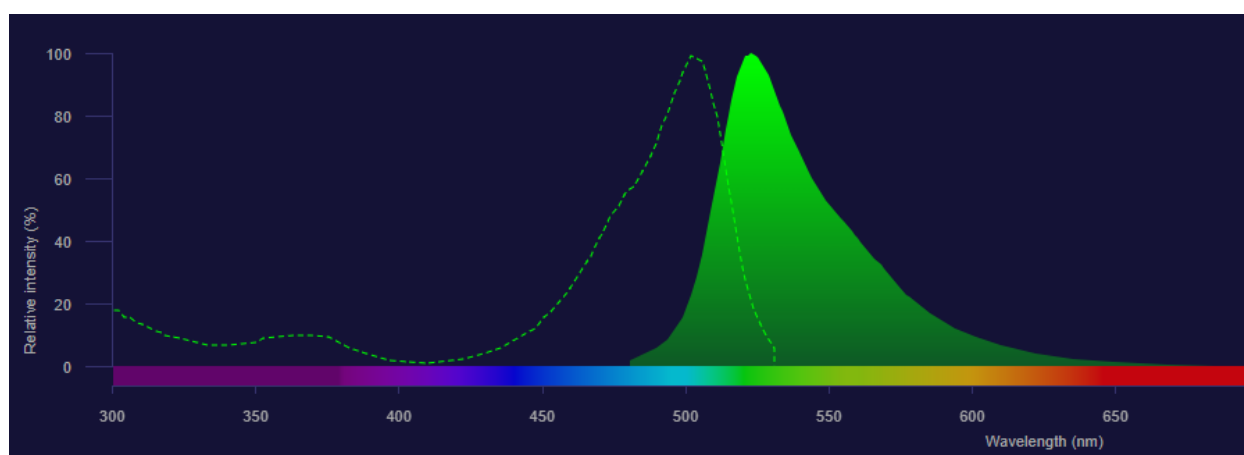
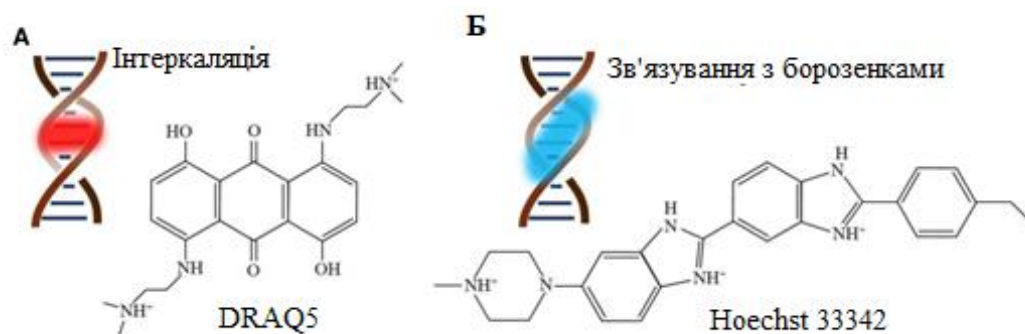


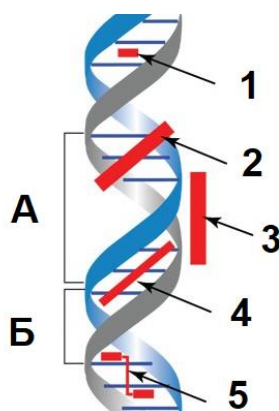
Рисунок 21 – Спектр флуоресценції барвника PicoGreen: пунктиром позначений спектр збудження; суцільна заливка – флуоресцентне випромінювання [9]

Флуоресцентні барвники приєднуються до ДНК за допомогою різних механізмів, включаючи інтеркаляцію між парами основ; зв'язування з великою/малою борозенкою; зовнішню асоціацію з фосфатним остовом та ін.

Деякі барвники, такі як Hoechst і DRAQ5, придатні для візуалізації живих клітин, інші не підходять через обмежену проникність мембрани та цитотоксичність. Барвник DRAQ5 інтеркалює в ДНК (рис. 22.1, А), барвник Hoechst зв'язується з борозенки (рис. 22.2, В).



а)



б)

Рисунок 22. а) механізми зв'язування ДНК та барвника: А – інтеркаляція. Б – зв'язування з борозенками ДНК [10]; б) механізми зв'язування ДНК та барвника: А – велика борозенка, Б – мала борозенка. 1 – барвник-інтеркалятор, 2 – зв'язування барвника з великими борозенками, 3 – зовнішнє зв'язування, 4 – зв'язування з малими борозенками, 5 – біс-інтеркалятор [9].

Наприклад, флуоресцентний барвник PicoGreen за моделлю Dragan та ін. має декілька механізмів взаємодії з ДНК (рис. 23).

Хінолінієва група (3) інтеркалює в ДНК. Тісний контакт хінолінієвої групи між парами основ стабілізований ван-дер-ваальсовою взаємодією з основами ДНК.

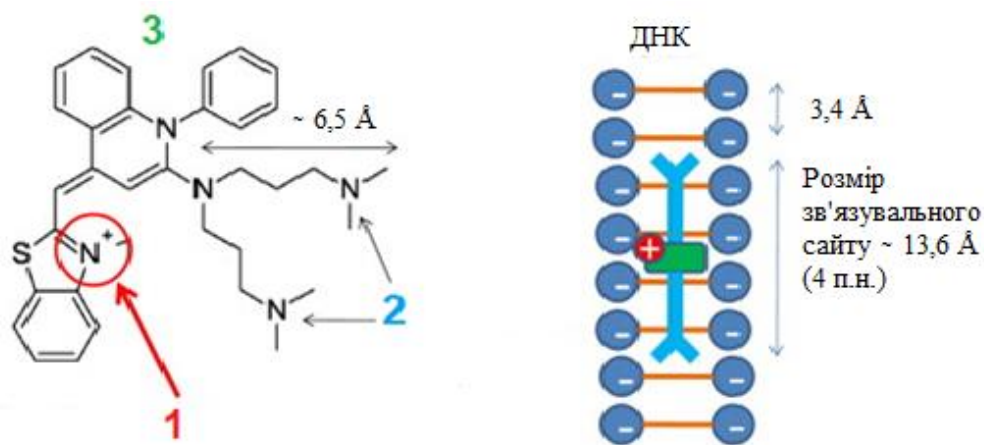


Рисунок 23 – Структурні елементи молекули PicoGreen, що відповідають за різні взаємодії з ДНК. Модель комплексу PicoGreen /ДНК: 1 – бензотіазолова ароматична система (в моделі червоний кружечок з «+») – інтеркалятор; 2 – диметиламінопропілові подовжені ланцюги – «плечі», що взаємодіють з малими борозенками (в моделі сині «Y»); 3 – фенілхінолінієва група – має електростатичні взаємодії з цукрофосфатним остовом (в моделі зелений прямокутник) [11]

Бензотіазолова ароматична система (1) яка має один локалізований позитивний заряд, відповідає за електростатичну взаємодію з фосфатною групою ДНК. Враховуючи те, що розмір сайту зв'язування PicoGreen на дуплексі ДНК становить майже 4 bp, що більше, ніж для класичного інтеркалятора (для бромистого етидію EtBr розмір сайту зв'язування 2bp), а також те, що PicoGreen має більшу спорідненість з ДНК, ніж EtBr), в моделі Dragan та ін. висловлено припущення, що дві диметиламінопропільні групи (2), кожна з яких у розширеній конформації має довжину $\sim 6,5$ Å, лежать своїми остовами глибоко в малій борозенці, разом покриваючи загалом ~ 4 bp дуплексу.

З цього прикладу зрозуміло, чому, наприклад, для ДНК та РНК використовують різні барвники. Відмінності також стосуються конформаційної різниці між суперскрученою плазмідною та лінійною ДНК, тРНК та мРНК, нкРНК, мкРНК та ін.

Для побудови калібрувального графіка для визначення концентрації ДНК використовують, як правило, готові набори (kit), що містять: буферний розчин (TE або фосфатний буфер), флуоресцентний барвник, розчини, що містять розчини ДНК відомої концентрації.

Визначаючи інтенсивність флуориметричного сигналу та порівнюючи з інтенсивністю флуориметричних сигналів відомих концентрацій (калібрувального графіка), знаходять концентрацію сполуки у досліджуваному зразку.

Обладнання та матеріали: спектрофлуориметр Qubit4; автоматичні дозатори з наконечниками на 200 та 10 мкл, тонкостінні мікропробірки об'ємом 0,5 мл, промивалка.

Реактиви: набір Qubit dsDNA assay (в який входить буфер з барвником та набір розчинів з визначеною концентрацією ДНК), дистильована вода, препарати загальної ДНК (препарати виділеної ДНК).

Хід роботи

1. Підготувати для аналізу дві пробірки для стандартних розчинів ДНК та по одній пробірці для кожного зразка.

2. Приготувати робочий розчин (PP), додаючи розчин барвника та буферний розчин з набору Qubit dsDNA assay. Розрахунок для одного зразку наведено в таблиці 3. Отриманий розчин підписати «PP».

Таблиця 3 – Розрахунок об'єму компонентів для робочого розчину

Компоненти кітів	Стандарт 1	Стандарт 2	Зразок	Всього
Об'єм компонентів, мкл				
Барвник	1	1	1	3
Буферний розчин	199	199	199	597
Сумарний об'єм, мкл				
Робочий розчин	200	200	200	600

3. Приготувати калібрувальні розчини: 10 мкл стандартного розчину ДНК № 1 (з набору Qubit dsDNA assay) та 190 мкл розчину «PP». Отриману суміш підписати «Ст1».

4. Додати 10 мкл стандартного розчину ДНК № 2 (з набору Qubit dsDNA assay) та 190 мкл розчину «PP». Отриману суміш підписати «Ст2».

5. Додати 1-20 мкл зразку та 180-199 мкл розчину «PP» (залежно від концентрації ДНК з зразку, щоб величина була у межах визначення приладу) таким чином, щоб сумарний об'єм зразка та робочого розчину становив 200 мкл. Отриману суміш підписати «31».

6. Перемішати на вортексі всі підготовлені пробірки 2-3 секунди.

7. Інкубувати всі підготовлені пробірки 2 хв за кімнатної температури.

8. Помістити підготовлену суміш «Ст1» у флуорометр, натиснути «Read». Вказати, що це стандартний розчин 1.

9. Помістити підготовлену суміш «Ст2» у флуорометр, натиснути «Read». Вказати, що це стандартний розчин 2.

10. Помістити підготовлену суміш «31» у флуорометр, вказати об'єм зразку (від 1 до 20 залежно від того, скільки було додано в п.5), натиснути «Read». За наявності більше, ніж одного зразка, повторити процедуру (пп 5-7 і 10 для кожного зразку).

11. Записати значення розрахованої приладом концентрації.

Оформлення результатів

1. Розрахуйте концентрацію виділених зразків з урахуванням розведення. Проаналізуйте отриманні результати.

2. Проілюструйте виконану роботу власними фото (рис. 24).

3. У висновку опишіть принцип флуорометричного дослідження ДНК, в чому полягають його переваги та недоліки. Поміркуйте, який метод зручніше для визначення концентрації ДНК із вивчених.



Рисунок 24 – Покази флуорометра досліджуваних зразків

Контрольні запитання

1. Порівняйте флуоресценцію та фосфоресценцію.
2. Чому спектр випромінювання речовини завжди знаходиться в більш довгохвильовій ділянці спектру порівняно зі спектром збудження?
3. Чому у спектрофлуориметрах встановлено монохроматори збуджувального та випромінюваного речовиною світла?
4. Чому для вимірювання концентрації ДНК до зразків додають флуоресцентні барвники?
5. Чому застосовують різні флуоресцентні барвники? Які існують механізми взаємодії флуоресцентних барвників з ДНК?
6. Опишіть механізм визначення концентрації ДНК флуоресцентною спектрофотометрією.
7. Наведіть пояснення для чого визначають інтенсивність флуоресцентного сигналу стандартних розчинів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Основи молекулярної біології-1. Молекулярна біологія ДНК: Лабораторний практикум [Електронний ресурс] : навч. посіб. для студ. спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / А. І. Степаненко, О. Р. Лахнеко, Л. В. Маринченко, М. О. Банникова ; КПП ім. Ігоря Сікорського, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. – Електронні текстові дані (1 файл: 0,79 Мбайт). – Київ : КПП ім. Ігоря Сікорського, 2021. – 70 с. URL: <https://ela.kpi.ua/handle/123456789/39933>
2. McKiernan H. E., Danielson P. B. Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. *Molecular Diagnostics*. 2017. P. 371–394. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802971-8.00021-3>
3. How does qPCR work: SYBR® Green vs TaqMan®. INTEGRA. URL: <https://www.integra-biosciences.com/global/en/blog/article/how-does-qpcr-work-sybr-green-vs-taqmanr> (date of access: 02.05.2024).
4. Evaluation of TaqMan qPCR System Integrating Two Identically Labelled Hydrolysis Probes in Single Assay / A. Nagy et al. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/srep41392>
5. Інструкція із застосування набору реагентів для виявлення ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі «HPV 16, 18, 45-ПЛР». Номер за каталогом REF K6552. – ХЕМА, серпень 2023 р. – 12 с.
6. Костюк П. Г. та ін. Біофізика: підруч. для студ. біол. спец. вищ. навч. закл. Київський національний ун-т ім. Тараса Шевченка. К.: Київський університет, 2008. 567 с.
7. Lakowicz J. R. Introduction to Fluorescence. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Boston, MA, 1999. P. 1–23. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3061-6_1
8. Qubit fluorometers and assays Accurate, specific, and sensitive quantification of DNA, RNA, and protein samples URL: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/brochures/qubit-fluorometers-assays-brochure.pdf>

9. Thermo Fisher Scientific - DE. Thermo Fisher Scientific - DE. URL: <http://www.thermofisher.com>

10. Weiss L. E., Naor T., Shechtman Y. Observing DNA in live cells. *Biochemical Society Transactions*. 2018. Vol. 46, no. 3. P. 729–740. URL: <https://doi.org/10.1042/bst20170301>

11. Characterization of PicoGreen Interaction with dsDNA and the Origin of Its Fluorescence Enhancement upon Binding / A. I. Dragan et al. *Biophysical Journal*. 2010. Vol. 99, no. 9. P. 3010–3019. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.09.012>

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Glick B. R., Patten C. L. Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. 6 th ed. – John Wiley & Sons, 2022. - 877 p.
2. Alberts B. Molecular biology of the cell. – Garland science, 2017.
3. Aaij C., Borst P. The gel electrophoresis of DNA // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis, 1972. – 269(2). – P. 192-200.
4. Fisher M.P., Dingman C.W. 1971. Role of molecular conformation in determining the electrophoreties of polynucleotids in agaroseacrylamide composite gels // Biochemistry. – 1971, 10(10). – P. 1895-1899.
5. Holmes D.S., Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids // Analytical biochemistry. – 1981, 114(1). – P. 193-197.
6. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія: Підручник – К.: ВПЦ «Київський університет» – 2008. – 384 с.
7. Мартиненко О.І. Методи молекулярної біотехнології: Лабораторний практикум / За наук. ред. чл.-кор. НАН України, проф. Д.М.Говоруна. – К.: Академперіодика, 2010. – 232 с.