

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького*

Кафедра біотехнології та радіології

ЗАГАЛЬНА ТА МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА

**Методичні вказівки до лабораторних робіт для здобувачів
першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
ОП «Біотехнології та біоінженерія»**



Львів – 2024

Загальна та молекулярна генетика: методичні вказівки до лабораторних робіт для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія ОП «Біотехнології та біоінженерія» / [уклад. Малишева Х. В.] Львів: Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2024. 150 с.

Рецензент – Назар Манько, молодший науковий співробітник відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу, Інституту біології клітини НАН України, к.б.н.

Рекомендовано навчально-методичною радою факультету харчових технологій та біотехнології, протокол № 4 від 30.09.2024 р.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У БІОТЕХНОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ	9
Загальні правила роботи у лабораторії.....	9
НАДАННЯ ПЕРШОЇ ДОМЕДИЧНОЇ ДОПОМОГИ.....	10
РОБОТА З ОПТИЧНИМИ ПРИЛАДАМИ	11
Світловий мікроскоп.....	12
Основні характеристики.....	13
Порядок роботи	14
Загальні правила.....	15
ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ТА ЗАХИСТУ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ..	15
ЗАГАЛЬНА ГЕНЕТИКА	16
ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ.....	16
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №1. Вступне заняття.....	16
Теоретичні відомості	16
Практична частина.....	25
Контрольні питання	26
ЧАСТИНА 1. МОЛЕКУЛЯРНІ ТА ЦИТОЛОГІЧНІ ОСНОВИ	
СПАДКОВОСТІ.	27
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №2. Визначення мітотичного індексу у	
препаратах корінців цибулі.....	27
Теоретичні відомості	27
Практична частина.....	30
Контрольні питання	32
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3. Дослідження мейозу у мікроспорогенезі	
рослин.....	33
Теоретичні відомості	33
Практична частина.....	35
Контрольні питання	36
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4. Встановлення кількості статевих хромосом	
людини за тільцями Барра.....	37
Теоретичні відомості	37
Практична частина.....	38
Контрольні питання	39
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5. Вивчення політенних хромосом у слинних	
залозах личинок хірономуса.	39

Теоретичні відомості	39
Практична частина.....	41
Контрольні питання	42
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №6. Каріотип та морфометричний аналіз хромосом.	43
Практична частина.....	46
Контрольні питання	49
ЧАСТИНА 2. ЗАКОНОМІРНОСТІ УСПАДКУВАННЯ ОЗНАК.	49
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №7. <i>Drosophila melanogaster</i> як об'єкт генетичних досліджень.....	50
Теоретичні відомості	50
Практична частина.....	53
Контрольні питання	54
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №8. Генетичний аналіз успадкування моно- та полігенних ознак.	54
Теоретичні відомості	54
Контрольні питання	60
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №9. Генетичний аналіз взаємодії неалельних генів.	61
Теоретичні відомості	61
Контрольні питання	71
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №10. Дослідження успадкування ознак, зчеплених із статтю.....	71
Теоретичні відомості	71
Контрольні питання	76
ЧАСТИНА 3. НЕСПАДКОВА (МОДИФІКАЦІЙНА) МІНЛИВІСТЬ.....	76
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №11. Біометричне вивчення дискретного та безперервного варіювання ознак у рослин і тварин. Вивчення безперервної та дискретної мінливості у рослинних об'єктів.	76
Теоретичні відомості	77
Практична частина.....	80
Контрольні питання	81
ЧАСТИНА 4. МУТАЦІЇ, ХРОМОСОМНІ АБЕРАЦІЇ ТА ПЕРЕБУДОВИ.....	81
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №12. Дослідження мутаційної мінливості на прикладі <i>D. melanogaster</i> L. Види тератологій, індукуючі фактори.....	81
Теоретичні відомості	82
Практична частина.....	84

Контрольні питання	84
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №13. Аналіз частоти різних типів аберацій хромосом у меристематичних клітинах корінців цибулі-батуна (<i>Allium fistulosum</i>).	85
Теоретичні відомості	85
Практична частина	86
Контрольні питання	86
МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА.....	87
ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ.....	87
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №1. Вступне заняття.	87
Теоретичні відомості	87
Практична частина	89
Контрольні питання	91
ЧАСТИНА 1. ВИДІЛЕННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ.....	91
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №2. Екстракція РНК.	91
Теоретичні відомості	92
Практична частина	94
Контрольні питання	96
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3. Екстракція ДНК.....	97
Теоретичні відомості	97
Практична частина	99
Контрольні питання	101
ЧАСТИНА 2. ОЦІНКА КІЛЬКОСТІ ТА ЯКОСТІ ВИДІЛЕНИХ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ.....	101
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4. Спектрофотометрія нуклеїнових кислот. .	102
Теоретичні відомості	102
Практична частина	103
Контрольні питання	104
ЧАСТИНА 3. МЕТОДИ АМПЛІФІКАЦІЇ ТА АНАЛІЗУ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ.	104
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5. Полімеразна ланцюгова реакція.	104
Теоретичні відомості	104
Практична частина	106
Контрольні питання	108
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №6. ПЛР із зворотною транскрипцією.	108
Теоретичні відомості	108

Практична частина.....	109
Контрольні питання	112
ЧАСТИНА 3. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ. ..	112
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №7. Секвенування ДНК.....	113
Теоретичні відомості	113
Практична частина.....	115
Контрольні питання	116
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №8. Аналіз послідовностей ДНК за допомогою Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).....	117
Теоретичні відомості	117
Практична частина.....	119
Контрольні питання	120
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №9. Нозерн-блот.	121
Теоретичні відомості	121
Практична частина.....	122
Контрольні питання	124
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №10. Саузерн-блот.....	124
Теоретичні відомості	124
Практична частина.....	126
Контрольні питання	128
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №11. ДНК-мікрочіп.	128
Теоретичні відомості	128
Практична частина.....	129
Контрольні питання	131
ЧАСТИНА 4. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ БЛОК-НУКЛЕЇНОВИХ ВЗАЄМОДІЙ.	131
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №12. Імунопреципітація хроматину.	132
Теоретичні відомості	132
Практична частина.....	133
Контрольні питання	134
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №13. Імунопреципітація РНК.....	135
Теоретичні відомості	135
Практична частина.....	136
Контрольні питання	139
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №14. Аналіз структури ДНК-зв'язуючих білків за допомогою Protein Data Bank (PDB).	139

Теоретичні відомості	139
Практична частина.....	141
Контрольні питання	143
ЧАСТИНА 5. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ МОДИФІКАЦІЙ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ.....	144
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №15. Бісульфатне секвенування.....	144
Теоретичні відомості	144
Практична частина.....	145
Контрольні питання	148
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....	149
ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ.....	150

ВСТУП

Навчальна дисципліна «Загальна та молекулярна генетика» є фундаментальною складовою підготовки майбутніх біотехнологів, генетиків та інших фахівців у галузі біології. Вона надає здобувачам вищої освіти необхідні теоретичні знання та практичні навички для розуміння матеріальних основ спадковості і мінливості живих організмів, а також процесів регуляції та зміни генетичної інформації. Дисципліна охоплює широке коло тем, починаючи від класичних законів спадковості і закінчуючи молекулярними механізмами генетичних процесів.

Метою навчальної дисципліни «Загальна та молекулярна генетика» є глибоке вивчення процесів передавання генетичної інформації, її регуляції та змін на різних рівнях: субклітинному, молекулярному, популяційному та організмовому. Це включає дослідження структури, функцій і взаємодій нуклеїнових кислот і білків, що беруть участь у цих процесах, а також механізмів мутацій, рекомбінації та еволюційних змін. Особлива увага приділяється практичним аспектам, що дозволяють застосовувати знання з генетики для вирішення сучасних завдань біотехнології та медицини.

Завдання дисципліни полягають у формуванні в здобувачів глибокого розуміння молекулярних та цитологічних основ спадковості, а також закономірностей успадкування ознак. Особлива увага приділяється вивченню таких процесів, як мітоз, мейоз, та каріотипування, що дозволяє аналізувати хромосомні аберації та генетичні мутації. Під час лабораторних занять здобувачі матимуть можливість практично ознайомитися з методами виділення нуклеїнових кислот, їх кількісною та якісною оцінкою за допомогою спектрофотометрії, а також сучасними методами ампліфікації та аналізу, такими як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та ПЛР із зворотною транскрипцією.

Крім того, під час лабораторних робіт здобувачі освоюватимуть різні методи дослідження нуклеїнових кислот, зокрема секвенування ДНК та аналіз ДНК-послідовностей за допомогою BLAST, Саузерн-блот і Нозерн-блот, а також технологію ДНК-мікродіпів. Також передбачено вивчення методів дослідження білок-нуклеїнових взаємодій, таких як імунопреципітація хроматину та РНК, і аналіз структури ДНК-зв'язуючих білків за допомогою Protein Data Bank. Додатково здобувачі ознайомляться з методами вивчення модифікацій нуклеїнових кислот, зокрема бісульфатним секвенуванням, для аналізу епігенетичних змін у геномі.

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У БІОТЕХНОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Загальні правила роботи у лабораторії

Сучасна генетична лабораторія – це високотехнологічний комплекс, обладнаний передовими приладами та устаткуванням, що дозволяють проводити широкий спектр досліджень у галузі генетики. Однак, як і в будь-якій лабораторній роботі, одним з найбільш поширених джерел помилок залишається людський фактор. Навіть за наявності точного обладнання результати досліджень можуть відрізнятися залежно від умов конкретної лабораторії, що може призвести до варіативності результатів одного й того ж експерименту, проведеного в різних установах.

Особливістю роботи в лабораторії, що займається генетичними дослідженнями, є необхідність постійного дотримання стерильних умов і точності при роботі з нуклеїновими кислотами, клітинами та іншим біологічним матеріалом. Це особливо важливо під час проведення таких процедур, як виділення ДНК та РНК, оцінка їхньої кількості і якості, ПЛР, секвенування, каріотипування та дослідження мутацій. Підтримання стерильності є ключовим фактором для уникнення контамінації зразків і забезпечення достовірності результатів. Тому працівники лабораторії повинні неухильно дотримуватися таких правил:

ЗАБОРОНЕНО

- ✓ Перебувати у верхньому одязі (необхідний спеціальний одяг – халат).
- ✓ Відкривати вікна (можна тільки з дозволу викладача).
- ✓ Приносити та вживати напої і продукти.
- ✓ Палити.
- ✓ Приносити сторонні речі.
- ✓ Виходити за межі лабораторії в халатах або одягати верхній одяг на халат.
- ✓ Користуватися відкритим вогнем.
- ✓ Вмикати та вимикати тумблери на електрощиті (можна тільки з дозволу викладача).

Необхідно дотримуватись заходів безпеки, керуючись наступними правилами:

- ✓ Двері лабораторії повинні бути постійно зачиненими.
- ✓ Забороняється самостійно ремонтувати несправне обладнання та оптичні прилади (про це необхідно повідомити викладача).
- ✓ При виготовленні тимчасових препаратів слід обережно поводитися з ріжучими інструментами та склом. У разі порізів повідомити викладача для надання медичної допомоги.
- ✓ Забороняється викидати зламані предметні та покривні скельця у смітник, уламки необхідно складати у спеціальний контейнер.
- ✓ Брати живі або зафіксовані організми чи торкатися до них (можна тільки з дозволу викладача).

✓ Перш, ніж розпочати роботу, необхідно переконатися в цілковитій справності електронагрівних приладів, пальників, а також у наявності засобів пожежогашіння.

✓ Працювати з отруйними і легкозаймистими хімічними речовинами дозволяється тільки у витяжній шафі.

✓ Набирання реактиву і переливання його з однієї посудини в іншу допускається лише піпеткою з гумовою грушею.

✓ Працювання з небезпечними реактивами необхідно в медичинських рукавичках.

✓ Для роботи із зафіксованими об'єктами використовувати пінцет, оскільки фіксувальні рідини є отруйними. Під час роботи з препаратами слід бути обережними, щоб бризки при стисненні тканин не потрапили на обличчя та руки. У разі потрапляння рідин на шкіру негайно змити їх великою кількістю води.

✓ По закінченні роботи непотрібний біологічний матеріал та культури мікроорганізмів повинні бути знищені. Інструменти, які використовувалися в роботі, та поверхню робочого столу необхідно дезінфікувати.

✓ Після закінчення роботи обов'язково прибрати своє робоче місце, почистити інструменти і прилади, зокрема, протерти лінзу об'єктива мікроскопа, відключити всі електроприлади. Протерти робочий стіл дезінфікуючим розчином. Вимити руки з милом.

✓ Лише упевнившись в абсолютній чистоті робочого місця і цілковитій пожежній безпеці приладів, можна покинути лабораторію.

НАДАННЯ ПЕРШОЇ ДОМЕДИЧНОЇ ДОПОМОГИ

✓ При виникненні пожежі у лабораторії необхідно негайно виключити газ та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймисті рідини, вогонь засипати піском або накрити вовняною ковдрою, шматком азбесту, рушником або залити тетрахлорометаном. Великий вогонь гасять за допомогою вогнегасника. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою. Якщо на людині палає одяг, її треба швидко закутати в ковдру, халат або покласти на підлогу і перекочуючи збивати полум'я. Якщо загорілися дерев'яні предмети, полум'я гасять водою або вогнегасником.

✓ Під час роботи у хімічній лабораторії найбільш можливими є порізи склом, опіки термічні та хімічні, а також інгаляційне ураження парами токсичних речовин.

✓ У всіх лабораторіях у доступному постійному місці має бути аптечка з набором необхідних матеріалів і медикаментів. Всі працівники у лабораторії повинні бути обізнані з правилами надання першої медичної допомоги. В аптечці лабораторії необхідно мати стерильні бинти та вату, 5%-ий спиртовий розчин йоду, 2%-ий розчин гідрокарбонату натрію, мазь від опіків, лейкопластир, 2%-ий розчин калій манганату (VII) KMnO_4 , 2%-ий розчин оцтової кислоти, 2%-ий розчин борної кислоти, етанол, піпетки для очей, скляні палички та ножиці.

✓ При теплових опіках роблять примочку з розчином 2%-го калій манганату (VII) KMnO_4 або етанолу $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, а потім наносять мазь від опіків.

✓ При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити речовину, що викликала опік, відповідним розчинником, а потім уражену ділянку обробити етиловим спиртом і змазати маззю від опіків.

✓ При опіках кислотами ушкоджене місце обмивають водою з крану, а потім 3%-им розчином натрій гідрокарбонату (питної соди); при опіках їдкими лугами – водою, а потім 2%-им розчином оцтової або борної кислоти і знову водою.

✓ При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у розчині питної соди (3%-му), і знову змити водою; при опіках очей лугом – промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 2%-му розчині борної кислоти, і знову промити водою. Після цього необхідно звернутись до лікаря.

✓ При опіках бромом ушкоджене місце необхідно швидко промити спиртом та змастити маззю від опіків.

✓ У випадку опіку фенолом ушкоджене місце розтирають гліцеролом до відновлення природного кольору шкіри, потім промивають водою і накладають пов'язку з марлі, що змочена у розчині гліцеролу.

✓ При порізах склом у першу чергу необхідно пінцетом, попередньо промитим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, рану промити дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етиловому спирті, а далі змастити 5%-им розчином йоду та забинтувати. Невеликі порізи можна заклеїти антисептичним пластиром.

✓ При ураженні електрострумом насамперед необхідно відключити електроенергію, а потім, якщо необхідно, зробити штучне дихання та викликати швидку допомогу.

✓ При вдиханні галогенів, галогеноводнів та оксидів Нітрогену потрібно вдихнути спирт або понюхати 5%-ий розчин амоніаку, а потім вийти на свіже повітря.

✓ При інгаляційних ураженнях потрібно негайно вийти на свіже повітря.

У всіх випадках опіків, поранень та отруєнь після надання першої допомоги необхідно звернутися до лікаря!

РОБОТА З ОПТИЧНИМИ ПРИЛАДАМИ

Мікроскоп є оптико-механічним приладом, що дозволяє отримувати значно збільшене зображення об'єкта, розміри якого виходять за межі роздільної здатності неозброєного ока. У мікроскопі можна виділити такі системи: оптичну, механічну та освітлювальний пристрій.

Механічна система складається з підставки, тримача тубуса, тубуса, предметного столика, револьвера, макро- та мікрометричних гвинтів, які служать для наведення різкості (рис. 1).

Освітлювальний пристрій включає трансформатор (є не у всіх мікроскопах), лампу, конденсор, діафрагму та матові скла, призначені для спрямування світла на препарат, установки оптимального освітлення об'єкта та регулювання сили освітлення. Освітлювач може бути вбудованим або

розташовуватися окремо, при цьому є дзеркало, яке направляє світло на препарат.

До оптичної системи мікроскопа належать об'єктиви та окуляр. Об'єктив забезпечує значно збільшене дійсне обернене зображення досліджуваного об'єкта. Він складається із системи лінз, поміщених у металеву оправу. Найважливіша з них – зовнішня (фронтальна) лінза, від фокусної відстані якої залежить збільшення об'єктива. Зазвичай на револьвері розміщено кілька об'єктивів із різним збільшенням. Від збільшення об'єктива залежать також дві його характеристики: робоча відстань, тобто відстань від фронтальної лінзи до площини препарату, і площа поля зору. Чим більше збільшення об'єктива, тим менша його робоча відстань і вужче поле зору.

Окуляр використовується для розгляду зображення об'єкта, що дається об'єктивом, тобто виконує роль лупи. Він складається з 2-3 лінз і забезпечує додаткове збільшення об'єкта, значення якого вказане на його оправі. Загальне збільшення мікроскопа є добутком збільшення об'єктива і окуляра.

Чіткість отриманого зображення визначається роздільною здатністю мікроскопа, яка залежить від довжини хвилі використовуваного світла і числової апертури оптичної системи мікроскопа (її значення вказане на оправі об'єктива). Чим більше значення числової апертури, тим вища роздільна здатність. Підвищити роздільну здатність мікроскопа можна, збільшивши показник заломлення середовища, що межує з лінзою. Для цього між фронтальною лінзою об'єктива і досліджуванним об'єктом розміщують краплю рідини з високим показником заломлення, наприклад краплю води ($n=1,3$), гліцерину ($n=1,4$) або кедрової олії ($n=1,5$). Для кожної з цих рідин існують спеціальні об'єктиви, які називаються імерсійними.

Світловий мікроскоп

Світлові мікроскопи використовуються для спостереження біологічних об'єктів, таких як клітини, тканини та мікроорганізми, за рахунок збільшення зображення за допомогою системи лінз. Вони дозволяють досліджувати структуру та морфологію живих і фіксованих зразків. Основними елементами мікроскопа є окуляр, об'єктиви, конденсор, освітлювач та предметний столик. Завдяки можливості зміни збільшення, світлові мікроскопи є незамінними для вивчення як загальної будови клітин, так і деталей їх внутрішньої організації. Їх широко застосовують у біології, медицині та навчальних лабораторіях для візуалізації об'єктів, невидимих неозброєним оком.

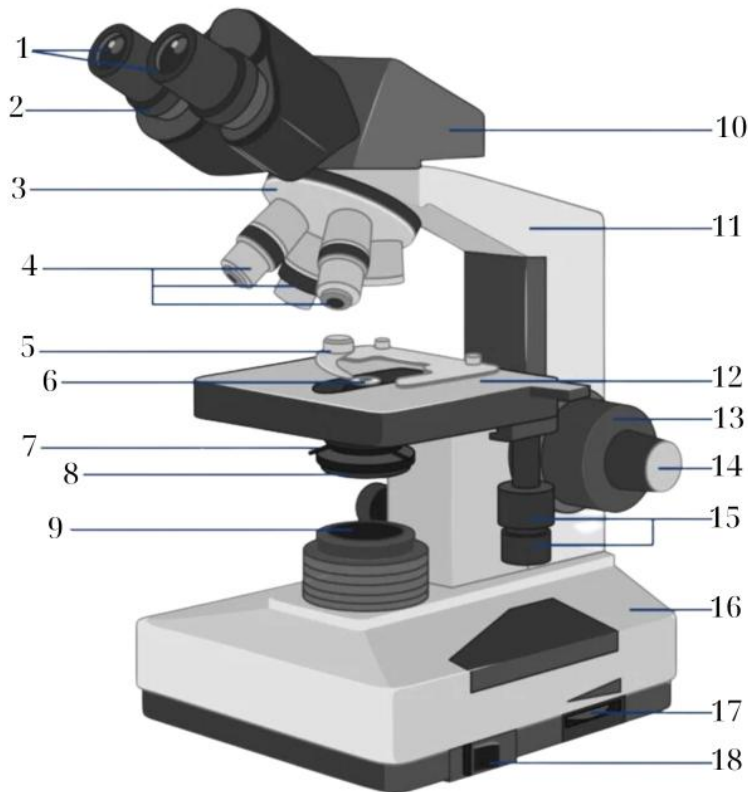


Рис. 1. Будова світлового мікроскопа

1 – окуляр; 2 – регулятор налаштування діоптрій; 3 – револьвер для об'єктивів; 4 – об'єктиви; 5 – пружинний важіль тримача об'єктів; 6 – апертура; 7 – діафрагма; 8 – конденсор; 9 – освітлювач; 10 – тубус; 11 – тубусотримач; 12 – предметний столик; 13 – макрогвинт для грубого налаштування; 14 – мікрогвинт для точного налаштування; 15 – ручка для переміщення предметного столика в напрямку X/Y; 16 – основа; 17 – регулятор яскравості освітлення; 18 – вимикач освітлювача.

Основні характеристики

Світловий мікроскоп складається з таких основних елементів:

- **окуляр (1)** – частина, через яку спостерігають зображення об'єкта, що збільшується;
- **регулятор налаштування діоптрій (2)** – дозволяє підлаштувати окуляри під індивідуальні особливості зору користувача;
- **револьвер для об'єктивів (3)** – механізм, на якому закріплені об'єктиви (4) різної кратності, що дозволяє швидко змінювати збільшення;
- **об'єктиви (4)** – лінзові системи, що формують зображення об'єкта з різними збільшеннями;
- **пружинний важіль тримача об'єктів (5)** – забезпечує надійну фіксацію препарату на предметному столику;
- **апертура (6)** – отвір у конденсорі для контролю кількості світла, що проходить через об'єкт;
- **діафрагма (7)** – регулює інтенсивність світлового потоку;
- **конденсор (8)** – система лінз, яка концентрує світловий потік на об'єкті дослідження;
- **освітлювач (9)** – джерело світла, яке підсвічує об'єкт знизу;

- **тубус (10)** – вертикальна частина мікроскопа, що з'єднує окуляр з об'єктивами;
- **тубусотримач (11)** – забезпечує стабільне розташування тубуса на мікроскопі;
- **предметний столик (12)** – платформа для розміщення препаратів, що переміщується за допомогою координатних ручок **(15)**;
- **макрогвинт (13)** – служить для грубого налаштування фокусу зображення;
- **мікрогвинт (14)** – використовується для точного налаштування фокусу;
- **ручка для переміщення предметного столика в напрямках X/Y (15)** – забезпечує рух предметного столика по горизонталі та вертикалі;
- **основа (16)** – нижня частина мікроскопа, що забезпечує його стійкість;
- **регулятор яскравості освітлення (17)** – дозволяє налаштувати яскравість світла;
- **вимикач освітлювача (18)** – вмикає та вимикає освітлювач мікроскопа.

Порядок роботи

1. Зняти чохол з мікроскопа і встановити його в зручне для роботи положення. Праворуч мають бути розташовані необхідні предмети (предметні та покривні скельця, реактиви, препарувальні голки, тощо).
2. Встановити об'єktiv малого збільшення.
3. Покласти препарат на предметний столик мікроскопа, закріпивши його важелем тримача об'єкта. Відрегулювати положення препарату відносно об'єктива.
4. Рухом макрогвинта, дивлячись збоку на препарат, опустити об'єktiv. Дивлячись в окуляр і обертаючи макрогвинт на себе, поступово піднімати оптичну частину мікроскопа, доки досліджуваний об'єкт не потрапить у фокус. Нечітке зображення сфокусувати мікрогвинтом.
5. Обертанням ручки регулятора освітлення встановити оптимальне освітлення поля зору.
Для роботи з великим збільшенням (10x, 40x, 100x):
6. Розмістити об'єкт або цікаву частину об'єкта в центрі поля зору, оскільки при великому збільшенні площа поля зору значно скорочується.
7. Поворотом револьвера до клацання обережно змінити об'єktiv.
8. Нечітке зображення сфокусувати спочатку макрогвинтом, а потім мікрогвинтом.
9. Чіткість зображення відрегулювати за допомогою діафрагми, розташованої під предметним столиком.
10. Після закінчення роботи знову перевести мікроскоп на мале збільшення, і тільки після цього зняти препарат з предметного столика.
11. При тривалій роботі необхідно періодично вимикати освітлювач, щоб уникнути його перегріву.
12. Після закінчення роботи вимкнути освітлювач, вставити блок живлення в приймальний пристрій і надіти чохол.

Загальні правила

- ✓ При забрудненні зовнішніх лінз окулярів та об'єктивів під час роботи слід протерти їх м'якою чистою тканиною.
- ✓ Категорично забороняється відкручувати рухомі деталі, розбирати окуляри та об'єктиви, а також грубо обертати мікрометричний гвинт.
- ✓ При виявленні будь-яких несправностей слід звернутися до викладача.

ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ТА ЗАХИСТУ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

Усі лабораторні роботи з практикуму з дисципліни «Загальна та молекулярна генетика» оформлюються в окремому робочому зошиті, який здобувач зобов'язаний здавати на перевірку викладачу після кожного заняття. Ведення зошита передбачає фіксацію всіх етапів роботи, результатів експериментів та аналізу отриманих даних.

Під час підготовки до лабораторної роботи здобувач повинен ґрунтовно вивчити теоретичну частину, що стосується теми даного заняття. Це дозволить краще зрозуміти суть експерименту і його значення для вивчення генетичних процесів, таких як мітоз, мейоз, хромосомні аберації, мутації або молекулярні методи дослідження нуклеїнових кислот (наприклад, ПЛР, секвенування, Саузерн-блот тощо).

Перед початком лабораторної роботи, при співбесіді з викладачем, здобувач повинен:

- ✓ представити план роботи, складений у робочому зошиті з детальним описом етапів експерименту, відповідно до методики проведення лабораторного дослідження;
- ✓ обґрунтувати всі розрахунки, що включають кількість реагентів, об'єм розчинів та необхідні концентрації для проведення експерименту, щоб результати могли бути використані в подальших дослідженнях;
- ✓ пояснити механізм процесів та записати відповідні реакції, що лежать в основі дослідження (наприклад, реакції ампліфікації ДНК при ПЛР).

У звіті з лабораторної роботи фіксуються всі дані, що стосуються проміжних та кінцевих результатів дослідження. Це може включати кількість виділених нуклеїнових кислот, результати спектрофотометрії, успішність проведених реакцій та інші аналітичні показники.

При захисті лабораторної роботи здобувач повинен не лише чітко викласти суть використаного методу і представити кінцеві результати експерименту, але й дати вичерпні відповіді на питання викладача, продемонструвавши розуміння теоретичних основ і практичної значимості виконаного дослідження.

ЗАГАЛЬНА ГЕНЕТИКА

ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №1. Вступне заняття

Мета: засвоїти правила роботи у лабораторії, техніки безпеки і надання першої домедичної допомоги при нещасних випадках; ознайомитися з видами хімічних реактивів, різновидами і принципами використання лабораторного посуду, допоміжного та основного обладнання для проведення лабораторних робіт з генетики.

Теоретичні відомості

Принципи організаційної діяльності в лабораторії. Слово «лабораторія» походить від латинського слова *laborare*, що означає працювати, обробляти. Для аналізу біоматеріалів та експериментальних досліджень у сучасній лабораторії використовується різноманітне обладнання. Залежно від профілю лабораторії і переліку, виконуваних в ній досліджень, можуть бути виділені робочі місця для різних аналітичних робіт: фотометрії, мікроскопіювання тощо. Робочі місця для ручної роботи обладнуються на лабораторних столах, які можуть бути призначені для роботи сидячи або стоячи. Столи можуть бути обладнані настільними стелажми, мати тумби з полицями або висувними ящиками.

Для кожної методики (або групи близьких методик) має бути підготовлено своє робоче місце, на якому зібрані потрібні реактиви та посуд; піпетки і дозатори встановлюють в пробірках, які стоять в штативах або на спеціальних підставках; кожна пробірка підписується для якого реактиву або операції призначається; на флаконах з реактивами приклеюються етикетки з назвами реактивів і датами приготування.

Все необхідне для роботи слід розміщувати таким чином, щоб будь-який потрібний предмет – пробірку, піпетку, дозатор, флакон із реактивом – було зручно дістати рукою, не встаючи з місця. Після закінчення аналізу посуд і реактиви можуть бути прибрані, щоб звільнити робочу поверхню столу для інших робіт.

Освітлення. Гарне освітлення підвищує гостроту зору, сприяє підвищенню якості роботи, а недостатнє освітлення – призводить до перенапруження зору і швидкої втоми. Робоче місце може висвітлюватися природним світлом (в цьому випадку слід розташовувати столи перпендикулярно до вікон) або загальними світильниками, розташованими на стелі. У разі необхідності робоче місце може висвітлюватися локальним світильником.

Потрібно мати на увазі підвищену чутливість до дії світла деяких речовин і вживати заходів до захисту проб біоматеріалу від надлишкового освітлення.

Лабораторний посуд. Без використання хімічного посуду неможливо провести аналізи ні в одній лабораторії. Знання типів і різновидів хімічного посуду визначає точність і правильність проведення аналізів чи досліджень.

Чистота хімічного посуду при аналітичних дослідженнях має велике значення; при використанні недостатньо добре вимитого хімічного посуду (через недбалість або через невміння) можуть бути отримані спотворені результати досвіду і зроблені неправильні висновки!!!

Існує низка аспектів, яким повинен відповідати лабораторний посуд:

✓ **оперативність і легкість обробки.** Все в лабораторії повинне сприяти швидкій та неускладненій роботі працівника, посуд зокрема. Він повинен бути вчасно чистим і сухим.

✓ **високоміцність, стійкість до механічних впливів, ударостійкість.** Посуд має бути міцним, стійким до ударних навантажень і крихкого руйнування.

✓ **термостійкість** (стійкість до підвищених температур). Про ступінь термостійкості того чи іншого предмета можна дізнатися з технічних параметрів.

✓ **стійкість до впливу агресивних середовищ, хімічна інертність.** Кислоти, луги, розчинники та інші агресивні рідкі, газоподібні речовини - нерідкісне явище в більшості лабораторій.

✓ **довговічність з повним збереженням початкового зовнішнього вигляду.** Незалежно від інтенсивності задіяння посуду, сліди на поверхні залишатися не повинні, щоб не заважати візуальному контролю процесу.

✓ **невелика вага.** Інтенсивна експлуатація передбачає ще одну вимогу, а саме незначну вагу робочих предметів.

✓ **відповідне маркування.** Перш за все, важливе позначення обсягу на стінках посудини. Завдяки цьому підвищується зручність виконання маніпуляцій. Також має значення контрастна градувальна шкала. Вона не скрізь обов'язкова, точно повинна бути на мірних ємностях, на інших може бути присутня не завжди.

✓ **розумна ціна.** Занадто низька вартість часто може свідчити про негативні характеристики виробу, надмірно висока є економічно не виправданою в деяких ситуаціях, наприклад, в екстремальних умовах. Найкраще – це оптимальне якісно-цінове співвідношення.

Види лабораторного посуду, згідно з основними класифікаціями. За призначенням/застосуванням виділяють три групи лабораторного посуду, а саме:

- **Загального призначення (немірний).** Найпоширеніші та найчастіше задіявані вироби, які беруть участь у більшості процесів. Вони є в кожній лабораторії, можуть виготовлятися з різних матеріалів. Це, головним чином, скляні, керамічні, порцелянові, металеві або пластикові пробірки, колби, склянки, лійки, шпателі, кристалізатори, промивалки, холодильники та інше.

- **Спеціального призначення.** Функціональний посуд, який потрібен лише для частини дослідів, щоб полегшувати їх проведення й максимізувати безпеку. Має специфічні конфігурації, створюється зі спеціальних матеріалів і відрізняється особливостями застосування. До цієї групи належать, наприклад, установки для відгону (дистиляційні колби зі спец. скла, алонжі, дефлегматори та ін.). А взагалі різновидів існує багато. Кожен з них використовувати необхідно винятково за призначенням.

- **Мірний.** Призначений вимірювати обсяг і густину рідких речовин. Ключова конструктивна особливість – наявність градування/вказівки обсягу. Нагрівати в таких ємностях не можна, вони призначені тільки для вимірювальних цілей. Це піпетки, бюретки, циліндри, колби, склянки, мензурки тощо.

За матеріалом виготовлення, існує лабораторний посуд.

✓ **Скляний** (рис. 2). Найбільш затребуваний, з досить високою термостійкістю і взагалі з усіма якостями, які важливі в цьому напрямку. Буває прозорим (95-98%) і непрозорим (здатним поглинати УФ-промені). Дозволяє здійснювати лабораторні дослідження з абсолютним запобіганням будь-яким впливам на реактиви і на підсумки роботи. Має хороші параметри теплопровідності та інертність до величезного числа високоактивних сполук. Дає можливість реалізовувати дослідження з нагріванням зразків до 1200°C зі збереженням форми, у зв'язку з незначним коефіцієнтом темп. розширення скла. У випадку додаткового загартовування, володіє неабиякими показниками міцності. Якщо задіюються токсичні речовини, завдяки ємностям зі скла (найчастіше, силікатного або кварцового), можна запобігти загрозі для здоров'я лаборанта. А ще скляні вироби легко очищаються в ультразвуковій мийці, що дуже зручно при високій частотності експериментів, для яких необхідне саме скло, а не інші матеріали.

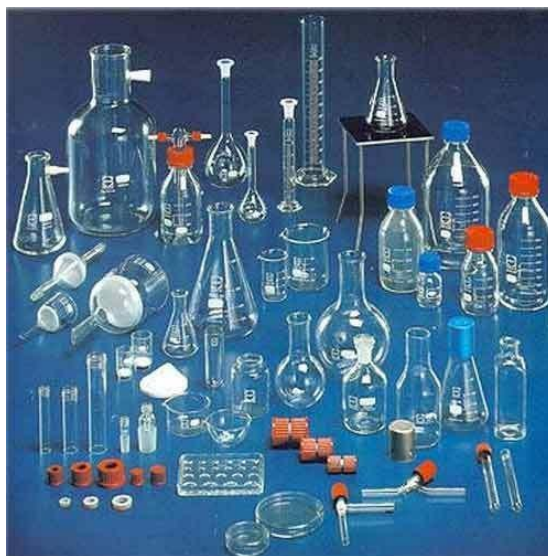


Рис. 2. Скляний лабораторний посуд

Дещо окремо стоїть кварцовий лабораторний посуд, примітний високими фізико-хімічними властивостями. Він прозорий, стійкий до їдких компонентів, органічних кислот, іонізуючого випромінювання та ін. Часто застосовується для виконання реакцій в умовах підвищених температур, тиску та інтенсивної радіації. Відмінно переносить різке нагрівання/охолодження. Основним конкурентом кварцу на сьогодні є боросилікатне скло, посуд з якого коштує значно дешевше, а характеристики практично нічим не поступаються. Особливість боросилікатних ємностей, завдяки якій вони не мають аналогів: рівень проникності для молекулярних сполук H, He і N під час нагрівання;

✓ **Пластиковий** (рис. 3). Також користується попитом, особливо в європейських лабораторіях і дослідницьких центрах. Це посуд, що

виготовляється з усіляких полімерів (в т.ч. поліетилену і фторопласту). Вагомі плюси такого: мала вага, значна міцність, зручність експлуатації, стійкість до різних агресивних середовищ, легке миття і швидке висихання, безпека, з огляду на нерозбивання і непоширення травмонебезпечних уламків, а також чудова ціна.



Рис. 3. Пластиковий лабораторний посуд

В пластмасових ємностях можна розводити кислоти і луги, зберігати біоматеріали тощо. Контейнери, пробірки, піпетки, чашки Петрі та інше з пластмаси не взаємодіють з лужними розчинами і плавиковою кислотою. Однак мають один недолік: робочий температурний діапазон пластику незначний;

✓ *Порцеляновий* (рис. 4). Примітний максимальною термічною стійкістю і високоміцністю. За цими параметрами він перевершує скляний, однак, порівняно з тим, більш важкий і завжди непрозорий. Відтак застосування посуду з порцеляни носить вузькоспеціалізований характер. Часто задіюється для перемелювання твердих сполук (ступки і товкачки) та виконання реакцій, які передбачають різке підвищення температури. Популярні порцелянові чаші для випарювання, шпателі для відбору хімічних речовин. Тонкостінні вироби з цього матеріалу відмінно витримують різкі температурні стрибки, а тому в них зручно здійснювати випарювання в муфельних печах, на газових пальниках і піщаних банях.



Рис. 4. Порцеляновий лабораторний посуд

Що деякою мірою є мінусом порцеляни, так це її повна світлонепроникність. Колби, пробірки, склянки або мензурки з такого

✓ *Керамічний* (рис. 5). Посуд з твердої високоякісної жароміцної та зносостійкої кераміки, зокрема мулітокремнеземні трубки, кулі й циліндри для помелу, барабани і футерування для кульових млинів, лійки Бюхнера, традиційні чашки і випарні чаші, склянки, тиглі, ступки, товкачки та ін.



Рис. 5. Керамічний лабораторний посуд

Лабораторна кераміка довговічна, підходить для роботи з високими температурами і може компонуватися з виробами, приладами з інших матеріалів. Ще вона екологічна, безпечна, легко і швидко встановлюється, проявляє стійкість до значних механічних впливів, стійка до термоударів і не піддається згоранню, з високою електроізоляцією та хімічною стійкістю;

✓ *Металевий.* Найчастіше виготовляється з дешевого і доступного заліза. Однак, з причини швидкого окислення, такий посуд тривалою експлуатацією не тішить. Крім того, він може реагувати з різними робочими матеріалами, що істотно зменшує спектр його функціональних можливостей. Інша річ – вироби зі шляхетних металів: платини, золота, срібла; а також міді та мідних сплавів. Як можна здогадатися, вони коштують дорого, але це рідко заважає їх лабораторному застосуванню. Цінуються, передусім, за низьку активність, а відтак за додаткові можливості. У резервуарі з платини, наприклад, можна зберігати плавикову кислоту.

✓ *Змішаний*. Тобто такий, при виготовленні якого задіяні різні матеріали. Яскравий приклад – тиглі, які поєднують у собі порцеляну, метали і малахіти. Також у лабораторії можна побачити посуд з корунду, спец. сортів глини і особливо міцного скла. Деякі деталі виробляються із синтетичної гуми, каучуку і силікону.

Крім того, розрізняють лабораторний посуд:

✓ *одноразового використання* (здебільшого з пластмаси, не потребує миття).

- ✓ багаторазового використання.

Догляд за лабораторним посудом. При роботі зі скляним посудом необхідно пам'ятати, що скло дуже крихке. Тому, при використанні скляних предметів та їх зберіганні потрібно робити все можливе, аби запобігти розбиття посуду та травм від розбитого скла. При проведенні аналізів та досліджень велике значення має чистота посуду. Погано помитий лабораторний посуд (з залишками речовин від попереднього аналізу або від застосованих миючих засобів) може внести суттєву похибку в дослід або зовсім зруйнувати його. Так, деякі поверхнево — активні речовини, в тому числі і мила, що використовують для миття посуду, вже в концентрації 1 мг/мл повністю пригнічують рост деяких видів бактерій. Тому весь посуд, що застосовують в аналізі повинен бути абсолютно (хімічно) чистим.

Хімічні реактиви та їх різновиди. Проведення аналізу, експериментів та досліджень у лабораторії неможливо без використання хімічних речовин — *реактивів*. Вони бувають тверді і рідкі (табл. 1).

Таблиця 1. Різновиди хімічних реактивів

	
Тверді реактиви	Рідкі реактиви

Хімічні реактиви випускаються і зберігаються в скляних або пластмасових банках із кришками, що щільно закриваються. Кожна банка повинна мати етикетку з назвою речовини, його хімічною формулою та інформацією про дату випуска, строк зберігання та про клас чистоти реактиву. На етикетці вказується також вміст основної сполуки і основних домішок. Залежно від змісту основної та допустимих домішок хімічні реактиви мають наступні марки чистоти:

➤ за ступенем чистоти (табл. 2)

Таблиця 2. Класифікація хімічних реактивів за ступенем чистоти

Марки реактивів	Умовні позначення	Загальний вміст домішок	Область застосування
Чистий	ч.	Не більше 2%	Лабораторні роботи учбового та виробничого характеру
Чистий для аналізу	ч.д.а.	0,5-1%	Науково-дослідні і аналітичні роботи
Хімічно чистий	х.ч.	Не перевищує 10^{-3}	Відповідальні

		$10^{-5}\%$	науково-дослідні роботи
Високочисті: ✓ спектрально-чисті ✓ еталонної чистоти ✓ особливо чисті	с.п. е.ч. о.ч.	$10^{-3} - 10^{-5}\%$ $10^{-5} - 10^{-10}\%$ $10^{-5} - 10^{-10}\%$	Спеціальні роботи
Технічний	техн.	Більше 2%	

Три перші марки охоплюють всі реактиви загального призначення. Препарати більш високої чистоти застосовуються лише для спеціальних робіт, де інколи навіть мільйонні долі відсотка домішок є неприпустимими. Ними користуються у промисловості напівпровідникових матеріалів, радіоелектроніці, квантовій електроніці. При проведенні більшості дослідів і синтезів використовують реактиви «ч.» і «ч.д.а.». Для технічних цілей, наприклад, приготування охолоджуючих сумішей або миття посуду, рекомендується брати найбільш дешеві реагенти.

➤ за властивостями (табл. 3)

✓ **Гігроскопічні (вологочутливі).** Поглинання вологи може відбуватися при негерметичній упаковці реактиву і може привести не тільки до зволоження речовини, але і зміни його властивостей.

✓ **Світлочутливі.** Деякі речовини під дією світла змінюються, вступаючи в реакції окислення, відновлення, ізомеризації тощо.

✓ **Пожежонебезпечні.** До них відносяться такі сполуки, які здатні від короткочасного контакту з джерелом запалювання (іскра, полум'я, нитка розжарення) або мимовільно запалюватися.

✓ **Отруйні.** Багато хімічних реактивів у більшій чи меншій мірі отруйні. Особливо небезпечно систематичне попадання в організм людини протягом тривалого часу сполук, що викликають хронічні отруєння (сполуки ртуті, миш'яку, синильної кислоти, ментол тощо.). Навіть з'єднання, які використовуються щодня у великих кількостях, можуть бути токсичними. Працювати з такими речовинами потрібно тільки у витяжній шафі.

Таблиця 3. Приклади реактивів, що відносяться до різних груп

Групи реактивів	Приклади реактивів	Умовні позначення
Гігроскопічні	гідроксиди калію і натрію, хлорид амонію, ангідриди кислот	
Світлочутливі	розчин йоду, пероксиду водню, сполуки срібла	
Пожежонебезпечні	легкозаймисті рідини (ЛЗР) такі як спирт, ацетон, бензол, ефіри	
Отруйні	сполуки ртуті, миш'яку, синильної кислоти, метанол	

Умови зберігання.

✓ У лабораторному приміщенні повинні зберігатися невеликі запаси хімічних реактивів. Їх тримають в банках, склянках з пришліфованою скляними пробками або пластмасовими кришками з поліетилену, а найбільш летючі

(хлороводнева кислота, розчин аміаку, бром) - на спеціальних полицях у витяжній шафі.

✓ Загальний запас ЛЗР, що одночасно зберігаються, не повинен перевищувати добові потреби. Склянки, в яких міститься більше 50 мл ЛЗР, повинні зберігатися в залізних ящиках для пального з щільно закритою кришкою, зі стінками і дном, викладеними азбестом.

✓ Світлочутливі реактиви зберігають у темних склянках або банках, обгорнутих чорним папером.

✓ Сильні отрути повинні зберігатися в опечатаних шафах і сейфах.

Правила користування реактивами.

✓ Головна вимога до реактивів - їх чистота.

✓ Не можна зсипати і зливати реактив з посуду, в якій проводиться реакція, назад в посуд для зберігання.

✓ Не можна плутати пробки від посуду з різними реактивами, а також зберігати реактиви без пробок. Гумовими пробками не можна закривати склянки з бензином, керосином, бензолом, толуолом тощо, а також дихлоретаном, ефіром, від парів яких гума набухає і розм'якшується.

✓ Не можна брати реактив руками

✓ Банки з летючими речовинами повинні відкриватися в момент безпосереднього користування ними.

✓ Роботи з отруйними, займистими речовинами і тими, що неприємно пахнуть, проводять у витяжній шафі.

✓ При необхідності визначення запаху обережно направляти пари речовини рукою від посудини до себе.

Отруйні та їдкі реактиви після проведення роботи зливати в спеціальні склянки.

Обладнання генетичної лабораторії. У лабораторії з загальної та молекулярної генетики використовується широкий спектр обладнання, яке забезпечує проведення експериментів на високому рівні. Сучасне обладнання дозволяє виконувати різноманітні процедури для дослідження спадковості та мінливості організмів, а також молекулярних механізмів, що лежать в їх основі. До основного обладнання генетичної лабораторії належать:

- **Інкубатори.** Використовуються для створення оптимальних умов для росту та зберігання біологічних зразків, таких як клітинні культури та бактерії, що забезпечує контрольоване середовище з необхідною температурою та вологістю.

- **Центрифуги.** Призначені для поділу зразків на окремі фракції за допомогою центрифугування. Таке обладнання дозволяє точно регулювати швидкість обертання, температуру і час, що є важливим під час виділення нуклеїнових кислот або білків із зразків.

- **Лабораторні холодильники та морозильні камери.** Призначені для зберігання біологічних зразків, реагентів і продуктів експериментів при низьких температурах, щоб запобігти їх розкладанню або втраті активності. Сучасні камери забезпечують рівномірний температурний режим по всій камері.

- **Бокси біобезпеки.** Використовуються для захисту зразків і оператора від біологічного забруднення, забезпечуючи стерильність і безпеку під час роботи з патогенними організмами або небезпечними хімічними речовинами.

- **Гомогенізатори.** Застосовуються для механічного подрібнення зразків з метою руйнування клітин і виділення внутрішньоклітинного вмісту для подальшого молекулярного аналізу, зокрема для виділення ДНК або РНК.

- **Спектрометри та флуориметри.** Призначені для оцінки концентрації та якості нуклеїнових кислот (ДНК, РНК) та білків за допомогою спектрофотометрії або флуориметрії, що дозволяє точно вимірювати їх кількість та чистоту.

- **Термоциклери.** Використовуються для проведення ПЛР-аналізу, який є основним методом ампліфікації ДНК. Точний контроль температурних циклів дозволяє провести багаторазове копіювання генетичного матеріалу, що необхідно для подальших генетичних досліджень.

- **Секвенатори.** Це обладнання використовується для автоматичного секвенування ДНК, що дозволяє визначати послідовність нуклеотидів у геномі або окремих генах, що є важливим для генетичного аналізу і дослідження спадкових захворювань.

- **Електрофорезні камери.** Використовуються для розділення ДНК, РНК або білків за їх розміром і зарядом у гелевій матриці, що дозволяє візуалізувати продукти ПЛР або визначати структуру білків.

- **Мікроскопи.** Високоточні мікроскопи використовуються для вивчення клітинних структур і процесів, таких як мітоз, мейоз і каріотипування, що дозволяє проводити цитогенетичний аналіз хромосомних перебудов і мутацій.

Це обладнання є базовим для проведення лабораторних робіт у галузі загальної та молекулярної генетики, однак у залежності від специфіки лабораторії можуть використовуватися додаткові прилади та інструменти для виконання більш складних досліджень.

Окрім основного обладнання, у генетичних лабораторіях також використовується допоміжне обладнання, яке сприяє забезпеченню точності та ефективності проведення досліджень. До нього належать:

- **Магнітні мішалки та шейкери.** Використовуються для рівномірного перемішування розчинів і реагентів у пробірках чи колбах, що є важливим для підготовки зразків та проведення реакцій.

- **Водяні та сухоповітряні термостати.** Призначені для підтримання сталої температури під час проведення ферментативних реакцій або інкубації зразків, що впливає на точність і стабільність процесів, таких як інкубація ферментів або гібридизація нуклеїнових кислот.

- **Сушильні шафи.** Використовуються для сушіння біологічних зразків, таких як осад після центрифугування, або проб, що вимагають видалення вологи для подальшого аналізу.

- **Сонікатори.** Призначені для делікатного очищення та підготовки зразків за допомогою ультразвукових хвиль, що дозволяє ефективно обробляти проби перед їх подальшим аналізом.

- **Автоклави.** Використовуються для стерилізації лабораторного посуду, інструментів та розчинів, що забезпечує необхідний рівень стерильності для проведення генетичних експериментів.

- **Системи для візуалізації та аналізу гелів.** Обладнання для візуалізації результатів електрофорезу ДНК, РНК або білків. Вони дозволяють фотографувати гелі після електрофорезу для подальшого аналізу та збереження результатів.

Всі ці допоміжні прилади забезпечують ефективність роботи лабораторії та сприяють підвищенню якості генетичних досліджень.

Практична частина

Матеріали і реактиви: реактиви різних класів чистоти (кислоти: соляна, сірчана; луги: гідроксид натрію, амоній; органічні розчинники: етанол, ацетон), буферні розчини, маркери для підписування ємностей, етикетки для маркування хімічних речовин, спирт 70% для дезінфекції, реактиви для стерилізації.

Обладнання: центрифуга, інкубатор, термоциклер, мікроскопи, витяжна шафа, бокси біобезпеки, піпетки, пробірки, колби, мірні циліндри, автоклав, УФ-стерилізатор, предметні та накривні скельця, штативи для пробірок і піпеток, лабораторні рукавички, захисні окуляри, маски, аптечка першої допомоги, вогнегасники.

Хід роботи

Завдання 1. Ознайомитися з лабораторією.

Під керівництвом викладача здійсніть огляд лабораторного обладнання та робочого простору.

- Ознайомтеся з основним обладнанням лабораторії. Визначте місця розташування таких приладів, як центрифуга, інкубатор, термоциклер, мікроскопи та витяжна шафа.

- Ознайомтеся з правилами використання боксових систем біобезпеки для роботи з небезпечними речовинами та біологічними зразками.

- Знайдіть місця розташування вогнегасників, аптечки першої допомоги, аварійних виходів.

- Ознайомтеся з розташуванням систем пожежної безпеки та сигналізації.

Завдання 2. Ознайомитися з лабораторним посудом.

- Ознайомтеся з основними різновидами лабораторного посуду, який використовується для проведення генетичних досліджень.

- Ознайомтеся з методами підготовки лабораторного посуду до експерименту, зокрема щодо їх стерилізації.

Завдання 3. Ознайомитися з хімічними реактивами.

- Під керівництвом викладача проведіть огляд реактивів, що використовуються у лабораторії, включаючи кислоти, луги, органічні розчинники та інші небезпечні речовини.

- Засвойте правила маркування реактивів та обов'язкові вимоги щодо зберігання, включаючи датування та вказівки на ступінь чистоти реактиву.

- Навчіться використовувати захисне спорядження (рукавички, маски, окуляри) під час роботи з отруйними або легкозаймистими речовинами.

Завдання 4. Засвоїти техніки безпеки.

- Ознайомтеся з основними вимогами техніки безпеки під час роботи з біологічним матеріалом та обладнанням.
- Ознайомтеся з правилами поведінки з небезпечними речовинами та біологічними зразками.
- Ознайомтеся з правилами поведінки у разі аварійних ситуацій (витоки речовин, розлив рідин, аварійне вимкнення обладнання).

Контрольні питання

1. Які основні вимоги до організації робочого місця в генетичній лабораторії?
2. Чому важливо підписувати пробірки та флакони з реактивами у лабораторії?
3. Які заходи слід вживати для захисту світлочутливих речовин у лабораторії?
4. Які основні види лабораторного посуду використовуються в генетичних дослідженнях?
5. Якими якостями повинен володіти лабораторний посуд, щоб забезпечити точність та надійність експериментів?
6. Як впливає чистота лабораторного посуду на результати досліджень?
7. Які види лабораторного посуду можна використовувати для нагрівання речовин?
8. Які переваги та недоліки має скляний лабораторний посуд порівняно з пластиковим?
9. Які заходи безпеки необхідно дотримуватись при роботі з агресивними хімічними речовинами у лабораторії?
10. Які основні принципи стерилізації лабораторного посуду та обладнання?
11. Як зберігаються гігроскопічні та світлочутливі реактиви у лабораторії?
12. Яке основне обладнання використовується в генетичній лабораторії для аналізу нуклеїнових кислот?
13. Які правила безпеки необхідно дотримувати при роботі з хімічними реактивами?
14. Які основні фактори можуть впливати на результати досліджень у генетичній лабораторії?
15. Чому стерильність є ключовим фактором під час роботи з біологічними зразками у генетичній лабораторії?
16. Які процедури потребують особливої уваги для уникнення контамінації зразків?
17. Назвіть основні правила, яких потрібно дотримуватися для забезпечення безпеки у лабораторії.
18. Що заборонено робити у лабораторії під час проведення експериментів?

19. Як правильно поводитися з отруйними та легкозаймистими речовинами під час роботи у лабораторії?
20. Якими засобами можна дезінфікувати робоче місце та інструменти після завершення роботи?
21. Які дії необхідно виконати після завершення роботи у лабораторії для забезпечення чистоти та безпеки робочого місця?
22. Які правила надання першої допомоги у випадку порізів чи хімічних опіків у лабораторії?
23. Що потрібно зробити у разі виникнення пожежі у лабораторії?
24. Які дії необхідно виконати при опіках кислотами чи лугами?
25. Як діяти у випадку хімічного опіку очей?
26. Які речовини необхідно використовувати для обробки опіків, викликаних бромом або фенолом?
27. Як надавати першу допомогу при ураженні електричним струмом у лабораторії?
28. Що потрібно робити при інгаляційних ураженнях токсичними речовинами?

ЧАСТИНА 1. МОЛЕКУЛЯРНІ ТА ЦИТОЛОГІЧНІ ОСНОВИ СПАДКОВОСТІ

Вивчення молекулярних та цитологічних основ спадковості є ключовим етапом у розумінні механізмів передачі та реалізації генетичної інформації на клітинному рівні. Дослідження процесів мітозу, мейозу, структурної організації хромосом, хромосомних перебудов і мутацій дозволяє оцінити закономірності успадкування ознак і роль клітинних механізмів у підтриманні генетичної стабільності організмів. Запропоновані лабораторні роботи надають здобувачам можливість ознайомитися з цими процесами та отримати практичні навички їх дослідження, що є основою для розуміння механізмів передачі генетичної інформації.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №2. Визначення мітотичного індексу у препаратах корінців цибулі

Мета: навчитися фарбувати хромосоми у клітинах рослинних меристематичних тканин, що активно діляться; розрізняти фази мітозу у клітинах цибулі ріпчастої *Allium* сера та розраховувати мітотичний індекс.

Теоретичні відомості

Клітинний цикл – це період життєдіяльності клітини з моменту її появи до загибелі або утворення дочірніх клітин.

Сукупність процесів, які відбуваються в соматичній клітині від одного поділу до наступного, і процесів самого поділу, який завершується утворенням двох клітин нової генерації, називають **мітотичним циклом**.

Розрізняють чотири періоди цього циклу: інтерфаза, яка включає 3 періоди (пресинтетичний або постмітотичний – G_1 , синтетичний – S,

постсинтетичний або премітотичний – G_2) і мітоз (рис. 6). Тривалість інтерфази становить 9/10 тривалості всього мітотичного циклу.

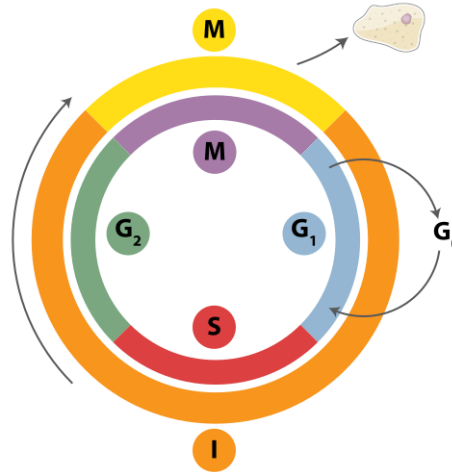


Рис. 6. Схематичне зображення мітотичного циклу

G_1 , S , G_2 – фази, I – інтерфаза, M – мітоз, G_0 – фаза спокою

Інтерфаза – це період функціонування та підготовки клітини до поділу. Вона поділяється на три періоди: (пресинтетичний або постмітотичний – G_1 , синтетичний – S , постсинтетичний або премітотичний – G_2)

Набір генетичної інформації в клітині позначають наступним чином: n – набір хромосом, xp – число хроматид в одній хромосомі, c – кількість ДНК в одній хроматиді.

Клітина, що утворилася після мітозу, містить диплоїдний набір хромосом, кожна хромосома має одну хроматиду, і $2c$ ДНК, тобто $2n1xp2c$. Така клітина входить у *пресинтетичний період* (G_1) інтерфази, тривалість якого коливається від кількох годин до кількох місяців і навіть років. У цей час клітина виконує свої функції, збільшується у розмірах, у ній відбувається синтез білків і нуклеотидів, накопичується енергія у вигляді АТФ.

У *синтетичний період* (S) відбувається реплікація молекул ДНК та її вміст у клітині подвоюється, тобто кожна хроматида добудовує собі подібну і генетична інформація до кінця цього періоду стає: $2n2xp4c$. Одночасно клітина продовжує виконувати свої функції. Тривалість цього періоду становить 6-8 годин.

У *постсинтетичний період* (G_2) клітина готується до мітозу: накопичується енергія, поступово пригнічуються всі синтетичні процеси, необхідні для репродукції органоїдів, змінюється в'язкість цитоплазми і ядерно-цитоплазматичне співвідношення, припиняється виконання клітиною основних функцій, накопичуються білки для побудови ахроматинового веретина і подвоюються центріолі. Набір генетичної інформації не змінюється ($2n2xp4c$). Клітина входить у мітоз.

Клітини у стадії інтерфази та мають чотириохкутну форму і оточені темними, добре помітними оболонками. Вони містять округлі або овальні ядра з одним або двома ядерцями і забарвлені зерна хроматину;

Після інтерфази настає ділення ядра клітини – мітоз або каріокінез.

Мітоз – це основний тип поділу соматичних клітин, внаслідок якого утворюються дві дочірні клітини, які містять ту ж кількість хромосом (диплоїдний набір, $2n$), що і материнська клітина.

Головними причинами початку мітозу є: 1) зміна ядерно-цитоплазматичного співвідношення (від $1/6 - 1/8$ до $1/69 - 1/89$); 2) "мітогенетичні промені" – клітини, що діляться, стимулюють до мітозу розташовані поруч клітини і 3) "ранові гормони" – пошкоджені клітини виділяють особливі речовини, що сприяють мітозу неушкоджених клітин.

У процесі мітозу послідовно відбувається п'ять фаз: профаза, прометафаза, метафаза, анафаза і телофаза, які дуже швидко ідуть одна за одною.

Профаза. Відбувається збільшення об'єму ядра, починається спіралізація хроматинових ниток, розходження центріолей до полюсів клітини, формування веретена поділу. До кінця профазы зникаєть ядерця, ядерна оболонка, хромосоми "виходять" у цитоплазму. До центромер хромосом прикріплюються нитки веретена поділу, і хромосоми прямують доцентру клітини. Набір генетичної інформації при цьому не змінюється ($2n2xp4c$).

Метафаза. Це найкоротша фаза, коли хромосоми розташовуються на екваторі клітини. Це стадія найбільшої спіралізації хромосом, коли їх найзручніше вивчати. Набір генетичної інформації залишається тим самим ($2n2xp4c$).

Анафаза. В цій фазі відбувається поділ хроматид в області центромер. Нитки веретена поділу скорочуються і хроматиди (дочірні хромосоми) розходяться до полюсів клітини. Набір генетичної інформації стає $2n1xp2c$ на кожному полюсі.

Телофаза. У цей період формуються ядра дочірніх клітин: хромосоми деспіралізуються, будуються ядерні оболонки, в ядрі з'являються ядерця. В клітинах з більш пізньою телофазою можна знайти нові ядра і перегородку, яка розділяє клітину на дві частини. Мітоз закінчується цитокінезом – розподілом цитоплазми материнської клітини. Зрештою утворюються дві дочірні клітини, кожна з яких має $2n$ хромосом, 1 хроматиду в хромосомі і 2сДНК.

Біологічне значення мітозу. Основне значення мітозу полягає в точному розподілі генетичної інформації між дочірніми клітинами та у підтримці сталості числа хромосом.

Під час виконання цитогенетичних досліджень часто необхідно враховувати рівень мітотичної активності досліджуваної тканини. Щоб обчислити рівень мітотичної активності тканини, обчислюють співвідношення числа клітин, що знаходяться на різних стадіях мітозу до загального числа клітин досліджуваної тканини, тобто визначають **мітотичний індекс (МІ, % від англ. Mitotic Index)**. МІ виражається в промілях – тисячних частках цілого або у відсотках.

На підставі підрахунку кількості клітин, що знаходяться у кожній стадії мітозу, визначається відносна тривалість профазы, метафазы, анафазы, телофазы – (у %) до загальної кількості клітин, які діляться.

Підрахунок клітин на різних фазах мітотичного циклу проводять у кількох полях зору. Щоб уникнути потрапляння на одне і те ж поле препарат

пересувається послідовно через одне поле зору до іншого, спочатку - зверху вниз до кінця препарату, потім - через одне поле у бік знизу вгору і т.д. Дані з підрахунку клітин по полях зору заносяться в таблицю, що включає всі стадії і потім сумуються.

Об'єктами дослідження фаз мітозу у навчальній лабораторії можуть бути корінці цибулі-батун, цибулі ріпчастої, кінських бобів, скереди. Можна замість корінців використовувати інші частини рослин з інтенсивним мітотичним поділом клітин, наприклад основи молодих листочків.

Зрізаючи з пророслого насіння корінці, слід урахувати, що перші мітози починаються у корінцях лише після досягнення ними певних розмірів. Те ж стосується й інтенсивності мітотичної активності, максимум якої настає лише на певній стадії. Тому зрізати слід корінці, що досягли 1–2 см у довжину.

Якщо перед фіксацією зрізані з рослин корінці витримати у холодильнику протягом ночі або дня, якість препаратів поліпшується; збільшиться кількість мітотичних клітин, хромосоми буде видно чіткіше (рис. 7).

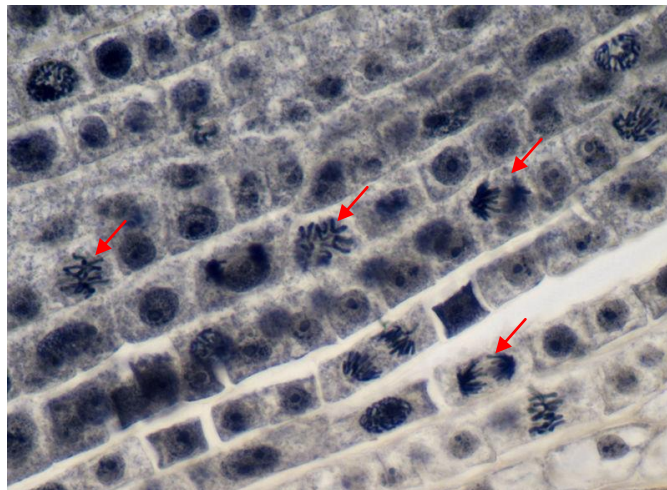


Рис. 7. Клітини апікальної меристеми корінця цибулі ріпчастої (A. cepa)

Насіння цибулі поміщають у чашки Петрі на змочений дистильованою водою папір і пророщують в термостаті при температурі 22°C. Через 24 години фіксують корінці довжиною 1,5–2,0 см у фіксаторі Кларка (суміш етилового спирту і льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1). Після фіксації впродовж 18 годин у холодильнику при температурі +8°C переносять корінці у 70% етиловий спирт і зберігають до виготовлення препаратів. Каріотип цибулі і плоідність клітин вивчають на давлених препаратах кореневої меристеми.

Для зафарбування готують розчин ацетокарміну. У колбу наливають 55 мл дистильованої води, додають 45 мл льодяної оцтової кислоти. Розчиняють у цій суміші 4-5 г карміну. Потім цю суміш кип'ятять протягом однієї години на водяній бані у колбі. Насичений розчин охолоджують і фільтрують у посудину, яку закривають пробкою.

Практична частина

Матеріали і реактиви: мікропрепарати поздовжнього зрізу корінця цибулі, таблиця-схема мітозу, мікрофотографії фаз мітозу A. cepa,

ацетокармін, 45% розчин оцтової кислоти, розчин для обконтуровування скелець, фільтрувальний папір.

Обладнання: мікроскопи, предметні та накривні скельця, препарувальні голки пінцети, скальпелі.

Хід роботи

Завдання 1. Виготовити тимчасові давлені препарати апікальної меристеми цибулі.

1. Помістити корінці у фарфоровий тигель із ацетокарміном.
2. Нагріти на електричній плитці до кипіння (працювати під тягою).
3. Вийняти корінці з барвника, перенести у 45%-у оцтову кислоту.
4. Помістити корінці на предметне скло в краплю 45% оцтової кислоти тонким пінцетом.
5. Скальпелем або лезом бритви відокремити конус наростання, прибрати непотрібні залишки корінця.
6. Накрити препарат накривним скельцем, а потім фільтрувальним папером. Видалити надлишок оцтової кислоти.
7. Легким постукуванням тупим кінцем препарувальної голки по 26 накривному скельцю досягти того, щоб клітини розташувалися в один шар.
8. Для подальшого аналізу і фотографування тимчасового препарату накривне скельце обконтуровувати розчином желатини у 45% оцтовій кислоті (придатні також лак для нігтів та інші речовини).
9. Налаштувати освітлення мікроскопа за Келером. На малому збільшенні знайти потрібну ділянку, перевести мікроскоп на більше збільшення.

Завдання 2. Обрахувати кількість клітин на стадії інтерфази і в різних фазах клітинного циклу.

- Змінюючи поля зору, обрахувати 500 клітин зони росту, позначаючи кількість клітин, що перебувають на стадії інтерфази (І) і різноманітних фазах мітозу: профазі (П), метафазі (М), анафазі (А) і телофазі (Т). У процесі роботи дані занести в таблицю (табл. 4).

Таблиця 4.

Поле зору, № препарату	Обраховано клітин						Примітки
	І	П	М	А	Т	Усього	

Завдання 3. Визначити мітотичну активність апікальної меристеми і відносну тривалість фаз мітозу.

На основі даних таблиці визначити мітотичну активність тканини, обчисливши мітотичний індекс (МІ) за формулою:

$$MI = \frac{(П + М + А + Т)}{N} \times 100\%$$

Користуючись даними таблиці, визначити відносну тривалість кожної фази мітозу (%), наприклад:

➤ *відносна тривалість профаз:*

$$П = \frac{П}{П + М + А + Т} \times 100\%$$

➤ *відносна тривалість метафаз:*

$$М = \frac{М}{П + М + А + Т} \times 100\%$$

➤ *відносна тривалість анафаз:*

$$А = \frac{А}{П + М + А + Т} \times 100\%$$

➤ *відносна тривалість телофаз:*

$$Т = \frac{Т}{П + М + А + Т} \times 100\%$$

➤ *відносна тривалість інтерфаз:*

$$І = \frac{І}{І + П + М + А + Т} \times 100\%$$

де П, М, А, Т, І – означають кількість клітин, обрахованих відповідно на стадіях профаз, метафаз, анафаз, телофаз, інтерфаз; N – загальна кількість проаналізованих клітин.

Контрольні питання

1. Дайте визначення життєвому циклу клітини, інтерфазі, мітозу.
2. Перерахуйте фази клітинного циклу. Які події відбуваються під час клітинного циклу?
3. Охарактеризуйте процеси, що відбуваються в інтерфазі.
4. В чому полягає біологічне значення мітозу?
5. Перерахуйте послідовно періоди мітозу. Які події відбуваються під час кожної фази мітозу?
6. У яких “звіряльних точках” відбувається перевірка правильності перебігу клітинного циклу?
7. Гени, які повинні були включитися в роботу в період G2, залишились неактивними. Чи вплине це на перебіг мітозу?
8. Скільки хромосом буде в дочірніх клітинах після мітозу, якщо у культурі тканини людини відбулася елімінація однієї хромосоми? (Розгляньте можливість елімінації у різних фазах мітозу).
9. Скільки хромосом буде в дочірніх клітинах людини, якщо під час мітозу не розійшлася одна пара хромосом?
10. Яка кількість хромосом і молекул ДНК міститься у клітинах у G1 та G2 фазах? Виберіть правильну відповідь: 2n 2c; 2n 3c; 4n 4c; 2n 4c; n 4c.

11. У якому з періодів клітинного циклу та фаз мітозу хромосома складається з однієї хроматиди?

12. Яка кількість хромосом та молекул ДНК міститься в ранній телофазі мітозу? Виберіть правильну відповідь: $2n$ $2c$; $2n$ $3c$; $4n$ $4c$; $2n$ $4c$; n $4c$.

13. Скільки хроматид рухається до кожного полюса в анафазі мітозу, якщо вихідна клітина має 14 хромосом?

14. Яка кількість хромосом, хроматид та молекул ДНК міститься у клітині в G1 та G2 фазах інтерфази?

15. У меристемі корінця цибулі міститься 2485 клітин, у тому числі 26 – у профазі, 8 – у метафазі, 10 – в анафазі, 12 – у телофазі. Визначте мітотичний індекс.

16. У який період інтерфази починається синтез фібрилярних білків, які задіяні у формуванні мітотичного веретена?

17. У якій фазі мітозу закінчується деспіралізація сестринських хромосом?

18. У якій фазі мітозу починається поділ цитоплазми та її органоїдів між дочірніми клітинами?

19. У якій фазі мітозу починає формуватися клітинна оболонка?

20. Який період інтерфази передуює реплікації молекули ДНК?

21. Наприкінці якої фази мітозу відбувається фрагментація ядерної оболонки і зникнення ядерця?

22. У якій фазі мітозу центромери хромосом розташовуються на екваторі клітини?

23. У якій фазі мітозу починається деспіралізація сестринських хромосом?

24. У якій фазі мітозу відбувається поділ центромери?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3. Дослідження мейозу у мікроспорогенезі рослин

Мета: виявити клітин, що знаходяться на різних стадіях мейозу у молодих пиляках лілії *Lilium sp.*

Теоретичні відомості

За визначенням **мейоз** або редукційний поділ – це два послідовних поділа клітини, яким передуює лише один цикл реплікації хромосом, внаслідок якого утворюються чотири гаплоїдні клітини. Під час першого поділу відбувається редукція числа хромосом (мейоз I), під час другого – екваційний поділ (мейоз II).

Як у першому, так і у другому поділі виділяють чотири морфологічні фази, які співпадають із стадіями мітозу: профаза, метафаза, анафаза і телофаза, але відрізняються за процесами, які відбуваються під час цих фаз (рис. 8).

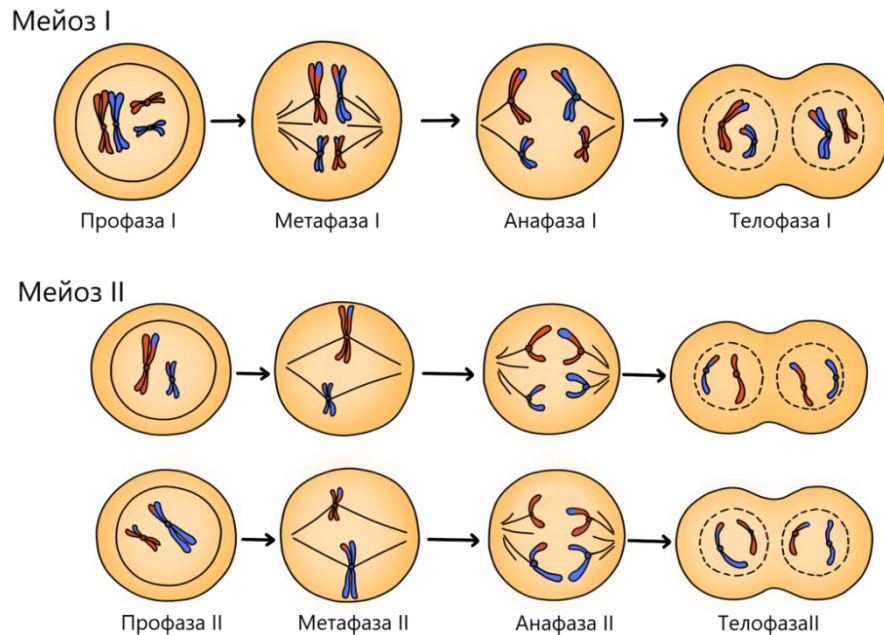


Рис. 8. Схематичне зображення мейозу

Редукційний поділ складається з наступних фаз.

П р о ф а з а I складна і проходить у декілька стадій.

✓ **Лептотена** - хромосоми у вигляді тоненьких ниток, розміщених в ядрі неупорядковано.

✓ **Зиготена** - тонкі нитки гомологічних хромосом (уніваленти) взаємно притягуються, помітні окремі зони кон'югації поблизу кінцевих ділянок хромосом.

✓ **Пахітена** - кон'югація завершується утворенням бівалентів, котрі внаслідок спіралізації дещо скорочуються і товстішають. На цій стадії може відбуватися кросинговер - обмін гомологічними ділянками унівалентів.

✓ **Диплотена** - помітні потовщення внаслідок спіралізації бівалентів, в окремих місцях яких розпочинаються відштовхування гомологів, однак вони залишаються з'єднаними в точці перехрещування.

✓ **Діакінез** - біваленти максимально вкорочені і відокремлені, тому їх можна підрахувати. Кількість бівалентів дорівнює гаплоїдному набору.

М е т а ф а з а I - ядерна оболонка розчинена, біваленти розташовуються симетрично відносно екватора клітини. Хромосоми коротші і тонші, ніж у мітозі, помітні кінцеві хіазми.

А н а ф а з а I - спостерігається розходження гомологів до різних полюсів, причому один унівалент бівалента прямує до одного полюса, інший - до протилежного. Розходження хромосом одного бівалента до різних полюсів відбувається незалежно від розходження хромосом іншого бівалента, і це приводить до виникнення різних комбінацій хромосом на полюсах.

Т е л о ф а з а I - хромосоми деспіралізуються, стають тоншими і довшими. Біля кожного полюсу клітини формується ядро.

І н т е р к і н е з - нетривалий, короткочасний.

Унаслідок першого мейотичного циклу утворюються клітини або лише ядра з половинним порівняно з материнською клітиною набором хромосом.

Еквацийний поділ відбувається синхронно у двох дочірніх клітинах.

П р о ф а з а II - хромосоми поступово скорочуються і товстішають внаслідок спіралізації, зникає ядерна оболонка і ядерця.

М е т а ф а з а II - у двох дочірніх клітинах одночасно можна спостерігати дві метафазні пластинки; або ж одну метафазну пластинку та одну метафазну групу хромосом з добре помітним веретенем поділу (якщо положення екваторів у дочірніх клітинах взаємно перпендикулярне).

А н а ф а з а II - після поділу центромер хроматиди відходять до полюсів.

Т е л о ф а з а II - хромосоми біля полюсів деспіралізуються, утворюється четверо ядер. Після цитокінезу формуються чотири клітини, які, наприклад, в пиляках мають назву мікроспори. Зверніть увагу на те, що усі чотири сформовані мікроспори оточені калозною оболонкою і разом утворюють тетраду. Розпад тетрад на окремі мікроспори відбувається після розчинення калозної оболонки.

У результаті другого мейотичного поділу кількість хромосом залишається такою ж, як і після першого, але кількість хроматид кожної з хромосом зменшується вдвічі.

Біологічне значення мейозу. Мейоз є досконалим механізмом, який забезпечує сталість каріотипу видів, які розмножуються статевим шляхом. Завдяки двом мейотичним поділам статеві клітини мають половинний, порівняно з нестатевими, набір хромосом. А набір хромосом, характерний для організмів певного виду, відновлюється під час запліднення.

Мейоз також забезпечує спадкову мінливість організмів.

Практична частина

Матеріали і реактиви: зафіксовані бутони лілії, ацетокармін, 45%-а оцтова кислота, розчин для обкantuвання скелець, фільтрувальний папір, постійні препарати мейоцитів лілії, таблиці.

Обладнання: мікроскоп, предметні та накривні скельця, препарувальні голки, пінцети, скальпелі.

Хід роботи

Стадії мейозу досліджують у мікроспороцитах рослин, наприклад, кукурудзи, томату, лілії і т.д. Для фіксації беруть свіжий матеріал (бутони). Перед фіксацією об'єкту видаляють всі непотрібні для дослідження частини рослин (квітконіжки, чашолистки), які заважають проникненню фіксатора у тканини. Об'єм рідини, у якій фіксують об'єкт, повинен у 50-100 разів перевищувати об'єм матеріалу. Для фіксації готують бюкси і етикетки. Етикетки роблять із цупкого паперу розміром 1-1,5 x 3-4 см. На них олівцем пишуть назву об'єкта і час фіксації.

Зібрані бутони вміщують у бюкси з фіксатором (суміш льодяної оцтової кислоти і етилового спирту у співвідношенні 1:3) і вкладають туди етикетку. Бюкси ставлять у холодильник при температурі 2...4°C на 20-24 годин. Після фіксації матеріал промивають два рази по одній годині 70%-им етиловим спиртом. Для зберігання матеріал залишають у 70%-ому спирті при температурі +1° ... +4°C.

Завдання 1. Виготовити тимчасові давлені препарати мейоцитів лілії.

1. У день приготування препаратів матеріал промити дистильованою водою 2-3 рази протягом 30 хвилин. Потім витримати бутони 40 хвилин у 8%-ому розчині залізоамонійних галунів, після чого промити водопровідною водою від 30 хвилин до однієї години і прополоскати дистильованою водою.

2. Пиляки помістити на предметне скло у краплю ацетокарміну. Для кращого зафарбування подрібнені пиляки перемішують залізною голкою. Потім залишки стінок пиляків видалити, а краплю накрити накривним скельцем. Дерев'яною ручкою препарувальної голки, роблячи колові рухи по склу розподілити клітини в один шар.

3. Предметне скло обережно підігріти над полум'ям спиртівки або на нагрівному столику, доки цитоплазма і ядро не зафарбується в інтенсивний чорний колір. Після достатнього зафарбування препарат диференціювати, для чого краплю 45%-ої оцтової кислоти капати на один край накривного скельця, а фільтрувальним папером витягувати з іншого кінця ацетокармін.

4. Після диференціювання накривне скло обклеїти сумішшю із желатину і оцтової кислоти.

Завдання 2. Знайти клітини на різних стадіях мейозу і замалювати їх.

- На препаратах мікроспороцитів лілії розглянути і замалювати послідовні стадії мейозу. Розглядаючи препарати, звернути увагу на охарактеризовані в теоретичній частині моменти.

Контрольні питання

1. Перерахуйте фази першого поділу мейозу. Які події відбуваються під час мейозу I?

2. Перерахуйте послідовно стадії профазі I. Які події відбуваються під час цих стадій?

3. Перерахуйте фази другого поділу мейозу. Які події відбуваються під час мейозу II?

4. В чому полягає біологічне значення мейозу?

5. Що таке бівалент, тетрада, синаптенемальний комплекс?

6. Чим відрізняється кон'югація від кросинговеру?

7. Що таке хіазми і яке їхнє загальне число на хромосомний набір людини? На 1 бівалент?

8. Перерахуйте відмінності та подібності мітозу та мейозу.

9. Скільки хроматид відійде до полюсів в анафазі-II у мейозі у людини?

10. Скільки бівалентів утворюється в клітинах людини і скільки хроматид у профазі-I та профазі-II мейозу?

11. Скільки хроматид відійде до полюсів у клітинах людини в анафазі-I та анафазі-II мейозу?

12. Як багато типів сперматозоїдів з різними комбінаціями хромосом вийде, якщо людина має 46 хромосом?

13. Чи можна назвати інтерфазу "паузою" між двома мейотичними поділами?

14. Яким буде число хромосом у сперматозоїдах, якщо в людини не розійшлися хроматиди Х-хромосоми?
15. У якій фазі мейозу хроматиди починають розходитися до полюсів?
16. Скільки хромосом і ДНК міститься в зиготі ріпчастої цибулі?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4. Встановлення кількості статевих хромосом людини за тільцями Барра

Мета: ознайомитися з цитогенетичним методом дослідження генетики людини.

Теоретичні відомості

Цитогенетичний метод ґрунтується на мікроскопічному дослідженні хромосом. Порушення у кількості статевих (Х) хромосом досліджують за допомогою тілець Барра. **Статевий хроматин (тілець Барра)** – це розташоване у ядрах інтерфазних клітин щільне, інтенсивно забарвлене хромосомними барвниками гетерохроматинове тілець, що має певні розміри (у людини приблизно 0,7х1,2 мкм), форму і локалізацію (рис. 9).

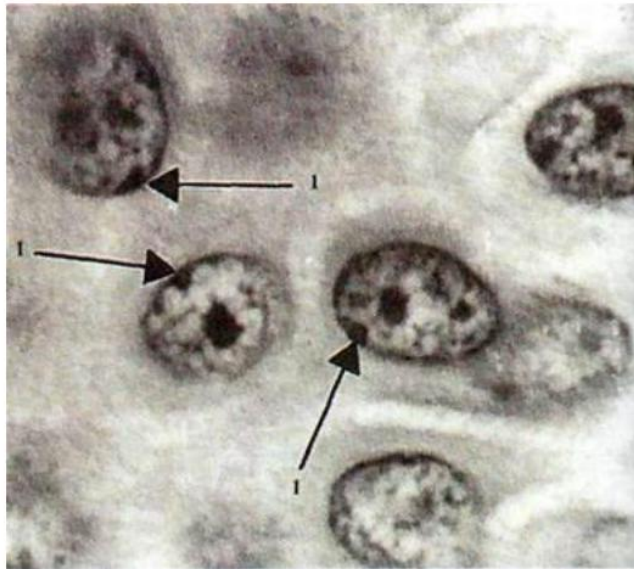


Рис. 9. Статевий хроматин (тілець Барра).

Це статевий хроматин, який являє собою гетерохроматизовану другу Х хромосому, яка інактивується у жінок ще у ранньому ембріогенезі до розвитку статевих залоз. Статевий хроматин може мати або форму трикутника, повернутого вершиною до центра ядра, або півкола, що іноді має вигляд потовщення ядерної мембрани.

Розрізняють три види локалізації статевого хроматину: той, що прилягає до ядерної мембрани; вільно розташований у ядрі; той, що прилягає до ядерця.

Вільне розташування статевого хроматину виявляється при розміщенні його у верхній по відношенню до спостерігача частині ядра; тому його вільна від ядерної мембрани локалізація – артефакт. Таке периферичне розташування статевого хроматину не є випадковим, оскільки гетерохроматин, різновидом якого є статевий хроматин, має тенденцію до накопичення у примембранних ділянках ядра.

У різних типах клітин навіть одного організму статевий хроматин зустрічається з різною частотою: тільки Барра виявляють 100% клітин амніотичної оболонки і клітин нервової тканини. У клітинах епітелію слизової оболонки рота (буккальних клітинах) у жінок і самок вищих мавп статевий хроматин виявляють у ядрах лише 20–70 % клітин. У чоловіків і самців мавп тільки Барра зустрічаються в ядрах 0–5% клітин (Грінберг, 1969). Це слід враховувати при виявленні статевого хроматину у клітинах різного походження (буккальні клітини, клітини крові, клітини волосної цибулини, епітелій різного походження, клітини шкіри, амніотична рідина тощо).

Практична частина

Матеріали і реактиви: фільтрувальний папір, марлеві салфетки, оцтовий алкоголь, імерсійна рідина, 45% оцтова кислота, ацетоорсеїн, ацетокармін.

Обладнання: світловий мікроскоп, скальпелі, леза бритви, гістологічні шпателі, пінцети, предметні і накривні скельця, чашки Петрі.

Хід роботи

Завдання 1. Встановити кількість X-хромосом у каріотипі за наявністю тілець Барра.

Пропис 1. Виявлення статевого хроматину в буккальних клітинах.

1. Видалити зі слизової оболонки щоки десквамовані клітини у яких статевий хроматин не виявляється. Для цього обстежуваний має обкусати щоку і сполоснути рот водою. Якщо з якихось причин він не може цього зробити, слід протерти йому рот марлевою салфеткою.

2. Взяти зіскоб епітелію слизової оболонки щоки. Роблять це бічною стороною шпателя, попередньо простерилізованого кип'ятінням або спиртом. Найкраще для цього підходить гістологічний шпатель, що має загнутий і злегка відточений кінець.

3. Розподілити зіскоб коловими рухами шпателя по поверхні чистого сухого предметного скла, так щоб клітини розташувались рівномірно, тонким шаром.

4. Не даючи мазку підсохнути, занурити предметне скло у фіксатор (етанол: оцтова кислота – 3:1). Фіксувати півгодини.

5. Нанести на мазок краплю ацетоорсеїну, накрити накривним скельцем.

6. Витримати препарат близько хвилини, покрити його фільтрувальним папером і злегка натиснути на накривне скельце для видалення надлишку барвника.

7. Розглянути препарат під мікроскопом: на малому збільшенні знайти скупчення клітин, після чого перейти на імерсійний об'єктив зі збільшенням 90х. Освітлення мікроскопа повинне бути настроєне за Келером.

8. Виконати облік ядер з брилками статевого хроматину у 100-200 клітинах, змінюючи поля зору і враховуючи тільки клітини з круглим чи овальним ядром і тонкою хроматиною сіткою.

Пропис 2. Виявлення статевого хроматину в клітинах волосних цибулин.

1. Вирвати волосину з волосяною цибулиною за допомогою пінцета або просто пальцями.
2. Скальпелем або лезом безпечної бритви відділити на предметному склі від волосини ділянку з волосяною цибулиною.
3. Нанести на волосяну цибулину краплю ацетоорсеїну, накрити накривним скельцем, витримати 2-3 хв.
4. Роздавити препарат, натискаючи на накривне скельце через три шари фільтрувального паперу, намагаючись добре розігнати клітини, але не пошкодити при цьому накривне скельце.
5. Мікроскопувати препарат: на малому збільшенні знайти скупчення клітин, після чого перейти на імерсійний об'єктив зі збільшенням 90X. Освітлення мікроскопа повинне бути настроєне за Келером.
6. Виконати облік ядер з брилками статевого хроматину у 100-200 клітинах, змінюючи поля зору і враховуючи тільки клітини з круглим чи овальним ядром і тонкою хроматиною сіткою.
7. Визначити частоту поширення клітин зі статевим хроматином у різних препаратах.

Контрольні питання

1. З якою метою використовують цитогенетичний метод?
2. Який каріотип у чоловіка, в клітинах якого виявили одне тільце Барра?
3. Який каріотип у жінки, в клітинах якої не виявили тілець Барра?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5. Вивчення політенних хромосом у слинних залозах личинок хірономуса

Мета: навчитися виготовляти та аналізувати препарати політенних хромосом із слинних залоз личинок хірономуса.

Теоретичні відомості

Ендомітоз – це такий тип поділу клітин, під час якого хромосоми реплікуються, а клітини не діляться. Якщо репліковані хромосоми роз'єднуються, утворюються поліплоїдні клітини з кратно помноженою кількістю гаплоїдного набору хромосом. Якщо репліковані хромосоми не роз'єднуються, утворюються гігантські, *політенні хромосоми*. Політенні хромосоми є сукупністю великої кількості паралельно розташованих ідентичних ниток ДНК, що утворюються в результаті багаторазових актів реплікації, після яких дочірні нитки ДНК не розходяться, а залишаються якимсь чином з'єднаними. Завдяки цій особливості політенні хромосоми характеризуються величезними розмірами, що дозволяє спостерігати під світловим мікроскопом експресію генома в інтерфазному ядрі: активовані ділянки хромосоми утворюють набухання – *пуфи*. Великі пуфи називаються кільцями Бальбіані (у деяких джерелах терміни «пуф» і «кільця Бальбіані» вживають як синонімічні) (рис. 10).

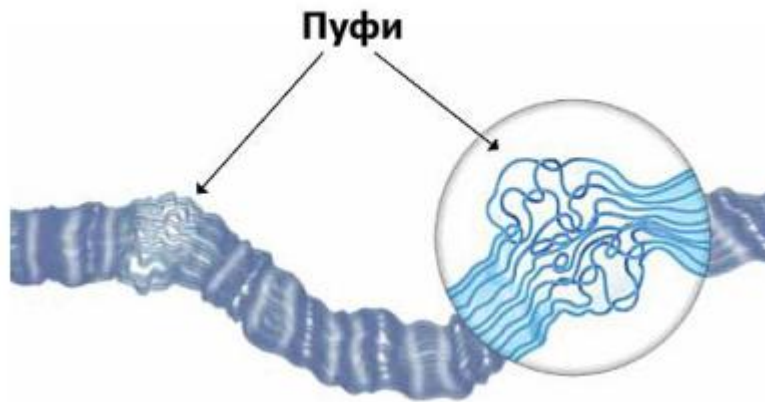


Рис. 10. Схема будови пувів політенних хромосом

Внаслідок багаторазової реплікації гігантські хромосоми дрозофіли містять 1-2 тисячі хроматид. Політенні хромосоми у 100-200 разів довші і в 1000 разів товщі, ніж хромосоми інтерфазних соматичних і статевих клітин (рис. 11).

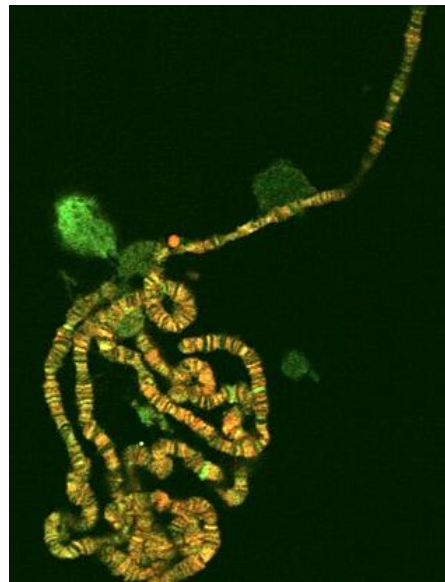


Рис. 11. Політенна хромосома із слинних залоз мухи

Наявність чіткого дискового спектра в сукупності з гігантськими розмірами політенних хромосом дозволяє використовувати їх для аналізу хромосомних перебудов, у систематиці, популяційно-генетичних дослідженнях, для картування генів шляхом гібридизації міченої мРНК з політенними хромосомами, для вивчення функціонування генома в інтерфазі та інших проблем.

Політенні хромосоми виявлені у представників найрізноманітніших систематичних таксонів: у дрозофіл, комарів, трофоцитах гризунів, деяких клітинах рослин. Організація політенних хромосом у різних видів має свої особливості: у ссавців, наприклад, вони, як правило, не мають чіткого дискового спектра – малюнка з чергуванням темних і світлих смуг, утвореного ділянками відповідно конденсованої і деконденсованої ДНК. Цей спектр дуже чітко видимий на політенних хромосомах дрозофіл і комарів; у рослин дисковий спектр не є постійною характеристикою, він може з'являтися і

зникати (однак характер спектра, його малюнок завжди залишаються однаковими). Політенні хромосоми можуть бути з'єднані своїми центромерами в одну спільну структуру – хромоцентр (як у дрозофіл) або залишатися індивідуальними (як у хірономуса), можуть мати ділянки, на яких ДНК реплікована значно більше, ніж на інших частинах хромосоми, – пуфи ДНК (як у сціарид), гомологи можуть бути вільними або скон'югованими тощо. Класичним об'єктом для вивчення політенних хромосом є слинні залози личинок дрозофіли і комара-дзвінця – хірономуса, відомих під назвою «мотиль». Личинки перед виготовленням препаратів необхідно витримати у вологій камері в холодильнику (на холоді вони менш рухомі).

Іншим відомим прикладом диференціальної експресії генів є формування хромосом типу *лампових щіток*. Хромосоми типу лампових щіток – це спеціальна форма хромосом, яку вони набувають у зростаючих ооцитах (жіночих статевих клітинах) більшості тварин, за винятком ссавців (рис. 12). Найбільш докладно описана організація хромосом типу лампових щіток хвостатих і безхвостих амфібій, domestikованих видів птахів і деяких видів комах.

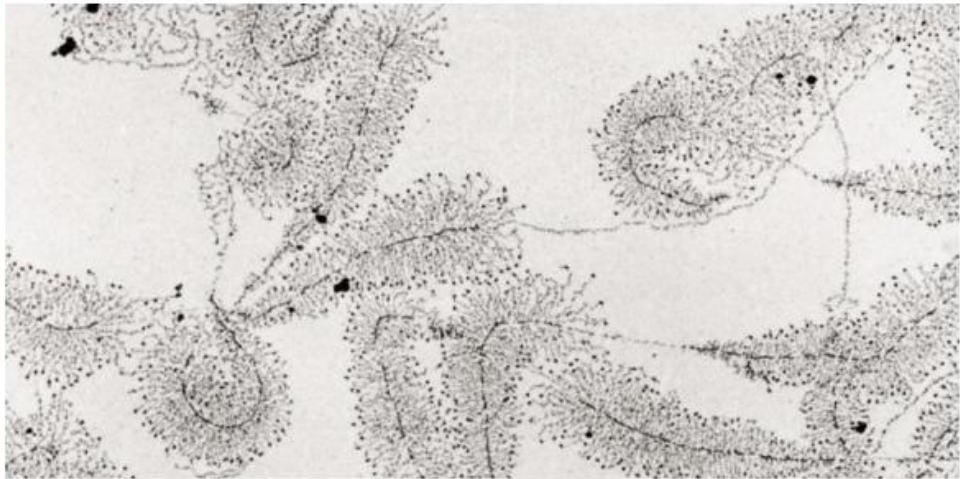


Рис. 12. Хромосоми типу лампових щіток

Під час затяжної стадії диплотени профазі I мейозу (див. нижче) активна транскрипція багатьох послідовностей ДНК призводить до того що з парних хромосом виходять латеральні петлі, які і містять транскрипційно активний хроматин. У зв'язку із чим хромосоми типу лампових щіток виробляють величезну кількість РНК, синтезованої на таких петлях. Кожна латеральна петля завжди містить одну і ту ж послідовність ДНК і залишається у витягнутому стані протягом всього росту ооциту, аж до початку конденсації хромосом. Разом з тим, велика частина ДНК залишається в конденсованому стані і організована в хромомери.

Практична частина

Матеріали і реактиви: личинки хірономуса, фізіологічний розчин, ацетокармін, 45%-ва оцтова кислота.

Обладнання: мікроскопи, термостат, годинникові, предметні та накривні скельця, скальпелі, піпетки, препарувальні голки.

Хід роботи

Завдання 1. Приготувати препарат політенних хромосом хірономуса.

1. Препарувати личинку хірономуса у розчині Рінгера або гемолімфі. Тіло личинки складається із сегментів, перший із яких – голова. Задній кінець тіла закінчується псевдоподіями. Слинні залози знаходяться під другим і третім сегментами личинки. Щоб видалити їх, необхідно відрізати головний сегмент.

2. Із тіла личинки видавити голкою дві безбарвні прозорі залози, які мають 2-5 – лопатеву форму. По краях залози видні клітини з дуже великими ядрами. Зарисувати загальний вигляд залози. Препарувальними голками обережно спробувати відокремити від слинних залоз жирові тіла, намагаючись не пошкодити самі залози.

3. Перенести залози за допомогою препарувальної голки у ацетокармін на предметне скло із лункою, накрити годинниковим склом і поставити в термостат з температурою 37°C на годину.

4. Зафарбовану залозу перенести на чисте желатинізоване предметне скло у краплю 45%-ої оцтової кислоти, накрити накривним скельцем таким чином, щоб між ними не лишилося повітря.

5. Роздавити залози і розподілити (розігнати) хромосоми. Для цього препарат помістити на столик стереомікроскопа МБС-10 (темне поле, освітлення зовнішнє) і легкими натисками препарувальної голки рівномірно розпластати клітини на склі, контролюючи процес через мікроскоп. Потім накрити препарат фільтрувальним папером, роздавити клітини і ядра, натискуючи на накривне скельце пальцем. Скельце не повинно зміщуватися відносно предметного. При недостатній розгонці постукати по накривному скельцю тупим кінцем препарувальної голки, добиваючись гарного розподілу хромосом у кількох ядрах.

6. Обкантувати краї накривного скельця гумовим клеєм або спеціальним середовищем (10% желатину на 50% оцтовій кислоті).

7. Перейти до мікроскопування тимчасового препарату. Вибрати клітину з добре помітними хромосомами у ядрі, розглянути їх будову та зарисувати. У клітинах слинної залози хірономуса спостерігається гаплоїдне число хромосом (гомологічні хромосоми кон'югують).

Завдання 2. Ідентифікувати політенні хромосоми хірономуса. Побудувати гістограму каріотипу: хромосоми схематично зобразити у вигляді паралельних прямих ліній відповідної довжини і вказати на них квадратами, поперечними смугами і кружками відповідно ділянки пуфів, найбільш помітних дисків, центромеру. Вказати ступінь активності пуфів у балах: вищий клас активності (кільця Бальбіані) — 6 клас (+++++), потім 5 клас (++++), 4 клас (+++), 3 клас (++) , 2 клас (+) і 1 клас (0).

Контрольні питання

1. Що таке ендомітоз і в чому його відмінність від звичайного клітинного поділу?

2. Які клітини утворюються в результаті ендомітозу, якщо репліковані хромосоми роз'єднуються?

3. Що таке політенні хромосоми і як вони утворюються?

4. Що таке пуфи і яку роль вони відіграють у політенних хромосомах?

5. Скільки хроматид можуть містити гігантські хромосоми дрозофіли внаслідок багаторазової реплікації?

6. У чому полягає практичне значення політенних хромосом для генетичних досліджень?

7. У яких таксономічних групах були виявлені політенні хромосоми?

8. Які особливості організації політенних хромосом у різних видів тварин і рослин?

9. Що таке хромоцентр і як він пов'язаний з політенними хромосомами?

10. Які види комах є класичними об'єктами для вивчення політенних хромосом?

11. Які особливості підготовки личинок до виготовлення препаратів політенних хромосом?

12. Охарактеризуйте хромосоми типу лампових щіток.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №6. Каріотип та морфометричний аналіз хромосом

Мета: ознайомитися з морфологією хромосом, вивчити поняття каріотипу та його особливостей, розглянути принципи класифікації хромосом та засвоїти методику їх морфометричного аналізу.

Теоретичні відомості

Хромосома (старод.-греч. χρῶμα – колір і ζῶμα – тіло) – нуклеопротейдні структури в ядрі еукаріотичної клітини, в яких зосереджена приблизно 90% спадкової інформації та які призначені для її зберігання, реалізації та передачі. Всі хромосоми містять дуже довгий безперервний полімеризований ланцюг ДНК, який містить гени, регуляторні елементи та проміжні нуклеотидні послідовності. Хромосоми чітко помітні у світловому мікроскопі тільки в період мітотичного або мейотичного поділу клітини. Розміри хромосом у різних організмів варіюють у широких межах – від 0,2 до 50 мкм. Метафазні хромосоми складаються з двох поздовжніх копій, які називаються сестринськими хроматидами і які утворюються при реплікації (рис. 13).

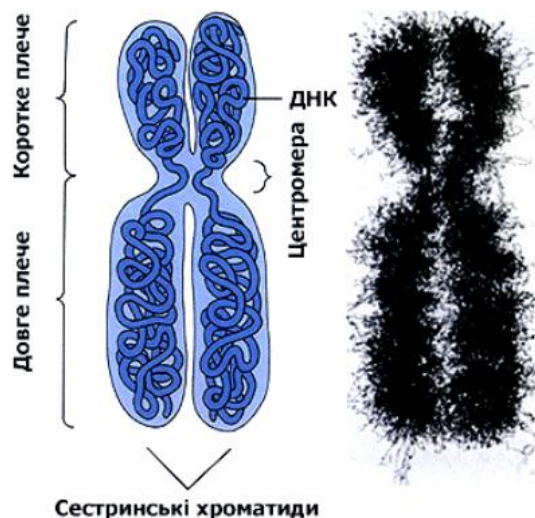


Рис. 13. Схематичне зображення хромосоми (ліворуч) та її фотознімок (праворуч)

На стадії метафази сестринські хроматиди з'єднані в районі первинної перетяжки, яка називається *центромерою*. Центромера відповідає за розходження сестринських хроматид по дочірнім клітинам при поділі. На центромері відбувається формування *кінетохору* – складної білкової структури, яка відповідає за прикріплення хромосоми до мікротрубочок веретена поділу на початку анафази мітозу чи на початку анафази II мейозу. Передчасний розрив сестринських хроматид за центромерами призводить до різкого порушення розподілу хромосом.

Центромера ділить хромосоми на дві частини, що називаються *плечами*. У більшості видів коротке плече хромосоми позначається буквою р, довге плече – буквою q. Довжина хромосоми і положення центромери є основними морфологічними ознаками метафазних хромосом. Додатковою морфологічною ознакою деяких хромосом є так звана *вторинна перетяжка*, яка зовні відрізняється від первинної відсутністю помітного кута між сегментами хромосоми. Вторинні перетяжки бувають короткими і довгими та локалізуються в різних точках вздовж хромосоми. На вторинних перетяжках знаходяться, як правило, *ядерцеві організатори*, що містять багаторазові повтори генів, кодуєрих рибосомальні РНК.

Невеликі хромосомні сегменти, які відокремлені від основного тіла хромосоми вторинними перетяжками, називаються *супутниками* (сателітами). Хромосоми, які володіють супутником, прийнято називати SAT-хромосомами (лат. SAT – Sine Acid Thymonucleinico – без ДНК). Супутник – це найчастіше гетерохроматиновий хромосомний сегмент, розташований дистально від вторинної перетинки. Виділяють наступні різновиди супутників:

✓ *за формою*

- мікросупутники – сферичної форми, маленькі супутники з діаметром удвічі або ще менше діаметра хромосоми;
- макросупутники – досить великі форми супутників з діаметром, що перевищує половину діаметра хромосоми;
- лінійні – супутники, що мають форму довгого хромосомного сегменту. Вторинна перетяжка значно віддалена від термінального кінця;

✓ *за розташуванням*

- термінальні – супутники, локалізовані на кінці хромосоми;
- інтеркалярні – супутники, локалізовані між двома вторинними перетяжками.

Супутник разом з вторинною перетинкою складають *супутникову ділянку*. Вторинні перетяжки можуть бути в одних хромосомах на довгому плечі, а у інших – на короткому. Кінцеві ділянки хромосоми називають *теломерами*. Особливість їх полягає в тому, що вони протидіють з'єднанню з іншими ділянками хромосом.

Набір всіх хромосом клітини, що називається **каріотипом**, є константною видоспецифічною ознакою. Число хромосом у різних видів може суттєво коливатись.

Хромосоми тварин і рослин являють собою паличкоподібні структури різної довжини з досить постійною товщиною, у більшій частини хромосом

вдається легко знайти зону *первинної перетяжки*, яка ділить хромосому на два плеча.

Наприкінці інтерфази кожна хромосома складається з двох сестринських хроматид. Кожна з них містить ущільнені ділянки – *хромомери*, які в світловому мікроскопі мають вигляд темнозabarвлених гранул. Їх кількість, положення і величина в обох хроматидах однакові і для кожної хромосоми відносно постійні. Відстані між хромомерами називаються *міжхромомерними ділянками*.

Парні хромосоми, які є однаковими за формою, розміром і спадковими задатками є *гомологічними*, решта – *негомологічні*. При порівнянні хромосомних наборів чоловічих та жіночих осіб одного виду спостерігається відмінність в одній парі хромосом. Ця пара отримала назву *статевих хромосом*, або *гоносом*. Решта пар гомологічних пар хромосом, однакових в обох статей, мають загальну назву *аутосоми*.

Нормальна довжина кожної хромосоми і сумарна довжина всіх хромосом каріотипу постійна. Морфологія хромосом визначається в першу чергу положенням центромери. Залежно від розташування центромери виділяють три типи хромосом:

- *метацентричні* хромосоми, у яких центромера розташована посередині або майже посередині;
- *субметацентричні* хромосоми з плечима нерівної довжини;
- *акроцентричні* хромосоми, у яких центромера знаходиться практично на кінці, і друге плече настільки мале, що його може бути не видно на цитологічних препаратах.

Цю класифікацію хромосом на основі співвідношення довжин плечей запропонував у 1912 році російський ботанік і цитолог С.Г.Навашин (1857-1930). Крім вищевказаних трьох типів С.Г.Навашин виділяв ще й *телоцентричні* хромосоми, тобто хромосоми тільки з одним плечем. Однак за сучасними уявленнями істинно телоцентричних хромосом не буває. Друге плече, нехай навіть дуже коротке і невидиме у звичайний мікроскоп, завжди присутнє.

У деяких організмів центромера дифузно розташована вздовж хромосоми і тому їх називають «дифузні» або *ацентричні*.

Характеристика хромосом за морфологію здійснюється за наступними ознаками: довжина плечей, положення центромери, наявність *вторинної перетяжки* або *супутника*. Супутники різних хромосом відрізняються за формою, величиною і довжиною нитки, яка з'єднує їх з основним тілом хромосоми.

Алгоритм цитогенетичного дослідження каріотипу і подальшого морфометричного аналізу хромосом складається з таких етапів:

1. Виготовлення препаратів хромосом;
2. Фарбування та фіксація хромосом;
3. Розгляд препаратів під мікроскопом;
4. Фотографування метафазних пластинок;
5. Визначення лінійних характеристик хромосом та їх класифікація.

Практична частина

Матеріали та обладнання: схеми каріограм ссавців, схеми будови хромосом.

Хід роботи

Завдання 1. Позначте цифрами на рис. 14 особливості морфології хромосом та вкажіть їх типи.

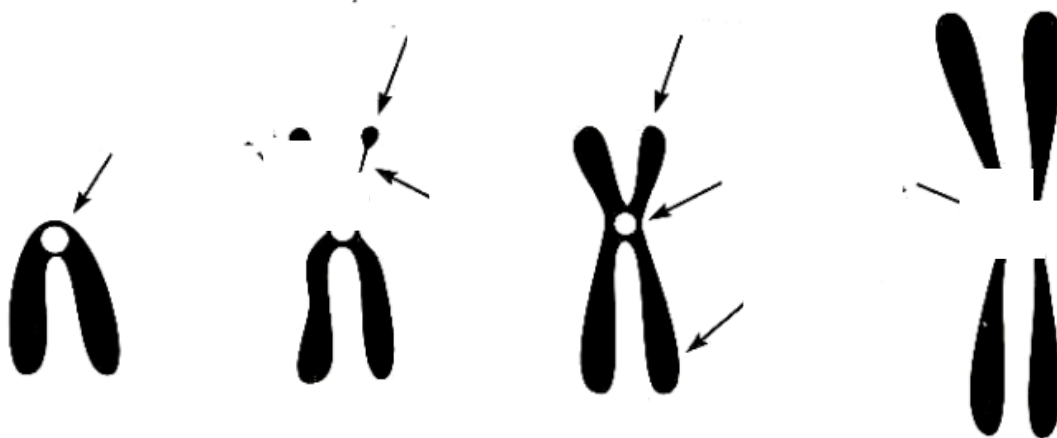


Рис. 14. Типи хромосом.

1 – центромера; 2 – теломера; 3 – тіло хромосоми; 4 – супутник; 5 – вторинна перетяжка; 6 – акроцентрична хромосома; 7 – метацентрична хромосома; 8 – субметацентрична хромосома; 9 – коротке плече (p); 10 – довге плече (q)

Завдання 2. Проведіть морфометричний аналіз хромосом домашньої свині (рис. 15). Результати розрахунків занесіть до нищенаведеної табл. 5.

Таблиця 5.

№	Абсолютна довжина			L^r , %	Γ^b	Γ^c , %	Тип хромосоми
	q, мм	p, мм	L, мм				
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							

Під мікроскопом на виготовлених препаратах вибирають найбільш чітко видимі метафазні пластинки та їх фотографують. Вивчення лінійних характеристик хромосом проводять на мікрофотографії та їх копіях за такими параметрами:

1. Індекс спіралізації:

$$I^s = \frac{\text{загальна довжина двох коротких хромосом}}{\text{загальна довжина двох довгих хромосом}}$$

2. Абсолютна довжина кожної хромосоми, мкм:

$$I^a = \frac{\text{довжина хромосоми на світлинi}}{\text{кратність збільшення мікроскопу}}$$

3. Відносна довжина кожної хромосоми, %:

$$I^r = \frac{\text{довжина конкретної хромосоми}}{\text{довжина всіх хромосом геному}} \times 100\%$$

4. Плечовий індекс:

$$I^b = \frac{\text{довжина довгого плеча}}{\text{довжина короткого плеча}}$$

5. Центромерний індекс, %:

$$I^c = \frac{\text{довжина короткого плеча}}{\text{довжина всієї хромосоми}} \times 100\%$$

6. Основне число:

NF – кількість плечей аутосом та двох X-хромосом.

Слід зазначити, що для дослідження придатні метафазні пластинки із однаковим I^s . Окрім того враховуючи величину плечового індексу хромосоми відносять до одного із вищевказаних морфометричних типів:

- а) $I^b = 1,0-1,9 \rightarrow$ метацентричні;
- б) $I^b = 2,0-4,9 \rightarrow$ субметацентричні;
- в) $I^b > 5,0 \rightarrow$ акроцентричні.

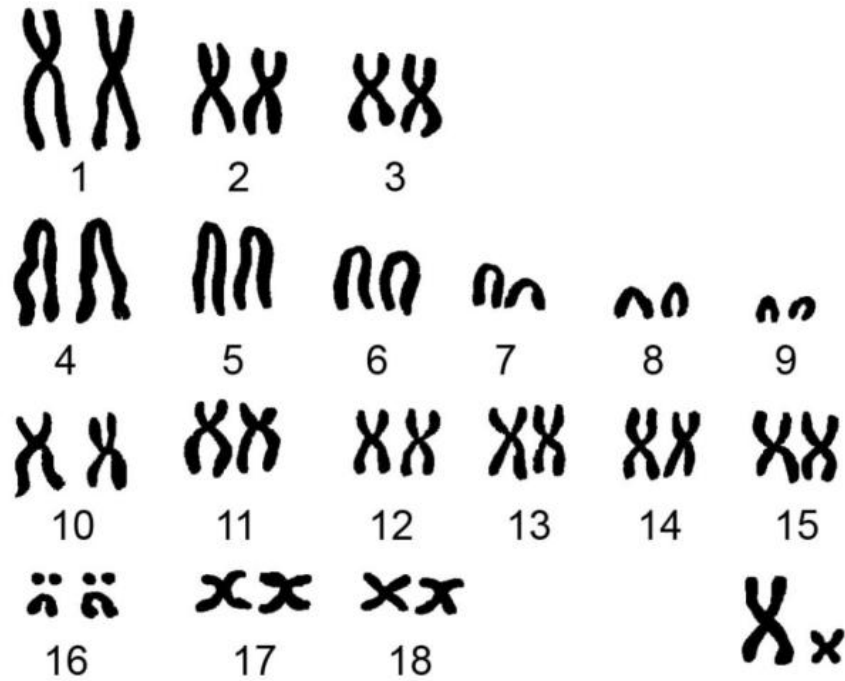


Рис. 15. Каріотип *Sus domestica*

Завдання 3. Визначте вид тварин, кількість хромосом, стать за їх каріотипами та підпишіть рис. 16-18. (наприклад, нормальний каріотип чоловіка, 46, XY)

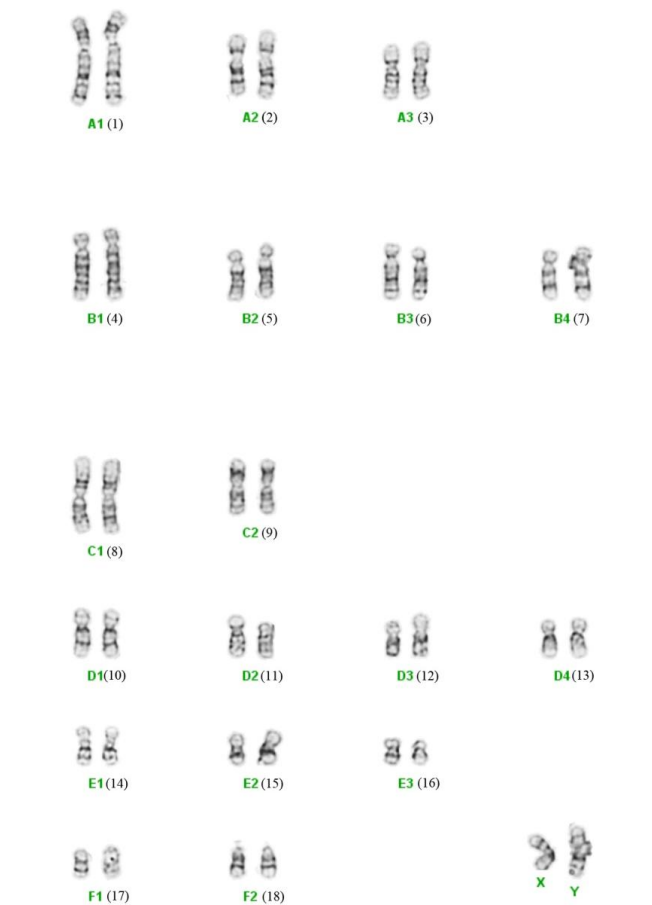


Рис. 16. Каріотип ссавця X

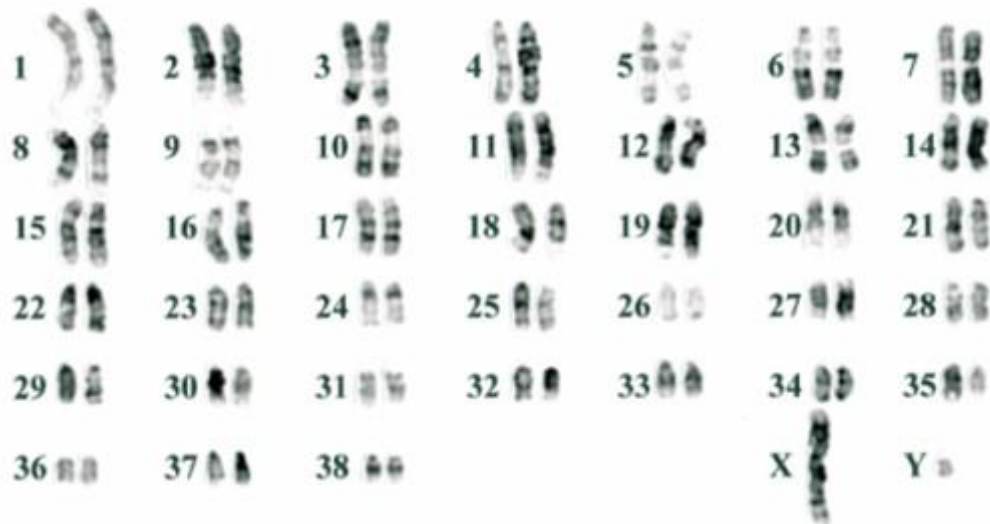


Рис. 17. Каріотип ссавця Y

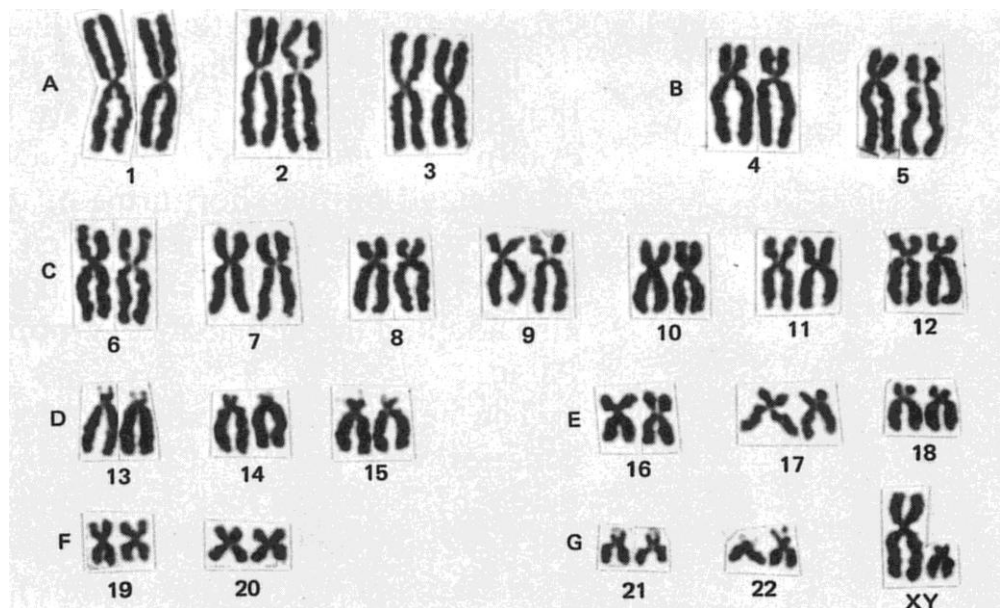


Рис. 18. Каріотип ссавця Z

Контрольні питання

1. Що таке хромосома і хроматида?
2. Які частини хромосоми Ви знаєте та яке їх значення?
3. Що таке супутники, які вони бувають?
4. Що є каріотипом?
5. Яка різниця між аутосомами та гоносомами?
6. Як класифікують хромосоми залежно від розташування центромери?
7. Який існує алгоритм цитогенетичного дослідження каріотипу?
8. Які формули використовують для морфометричного аналізу хромосом?

ЧАСТИНА 2. ЗАКОНОМІРНОСТІ УСПАДКУВАННЯ ОЗНАК

Вивчення закономірностей успадкування ознак є важливим етапом у розумінні механізмів передачі генетичної інформації від одного покоління до іншого. Лабораторні роботи з цієї теми дозволяють здобувачам на практиці ознайомитися з основними генетичними законами Менделя, типами

спадкування ознак, аналізом моногібридних і дигібридних схрещувань, а також з явищами неповного домінування, кодомінування і плейотропії. Практична частина цих досліджень дає можливість краще зрозуміти, як генетичні закономірності реалізуються на рівні клітин, організмів і популяцій, а також допомагає набути навички роботи з генетичними даними.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №7. *Drosophila melanogaster* як об'єкт генетичних досліджень

Мета: ознайомитися з життєвим циклом *D. melanogaster* (основними стадіями розвитку дрозофіли), умовами утримання мух в лабораторних умовах, статевим диморфізмом дорослих особин, фенотиповими характеристиками ліній дикого типу та мутаціями.

Теоретичні відомості

Біологія дрозофіли. *D. melanogaster*, або оцтова муха, є модельним об'єктом генетики, на якому вивчалися та вивчаються сьогодні основні принципи спадковості та мінливості. Цей модельний об'єкт (представник виду *melanogaster*, роду *Drosophila*, родини *Drosophilidae*, ряду *Diptera*, класу *Insecta*, підтипу *Tracheata* і типу *Arthropoda*) легко розмножується в лабораторних умовах, має короткий цикл розвитку, високу плодючість та чіткі морфологічні ознаки, за якими зручно вести генетичний аналіз. Через наявність великої кількості відомих спонтанних та індукованих мутацій і невеликого числа хромосом ($2n=8$) *D. melanogaster* є зручним об'єктом для проведення лабораторних робіт у навчальному процесі.

Батьківщиною *D. melanogaster* можна вважати Індомалайський регіон, хоч сьогодні вона є майже видом космополітом. Це дуже маленька мушка, розміром близько 3 мм, з коричнево-червоними очима та сірим тілом. Вважається, що колір тіла мухи дикого типу (wild type) є сірим (gray), хоча насправді він дещо відрізняється від такого.

Харчується дрозофіла ферментованими фруктами, овочами, соком дерев і її легко можна зібрати поблизу фруктових садів. Для цього достатньо виставити в саду, на городі посудину з фруктами або овочами. Мухи злітаються на них і легко можуть бути зібрані та введені в культуру.

У лабораторних умовах дрозофіла харчується продуктами дріжджового бродіння. Інгібітори росту грибів, які використовуються для запобігання заросту пліснявими грибами середовища, впливають на розвиток мух. Важливо при додаванні в середовище інгібітора чітко дотримуватись дозування, передбаченого рецептурою, оскільки збільшення кількості інгібітора в середовищі може призвести до інгібування росту дріжджів, відтак - і мух.

Одним із варіантів оптимального складу середовища є: вода – 1 л, агар-агар – 6 г, цукор – 50 г, дріжджі – 80 г (вологих), манна крупа – 50 г.

Статевий диморфізм. Для відбору мух на схрещування необхідно правильно розрізняти стать особин (рис. 19). Зазвичай стать у імаго розрізняють, аналізуючи зовнішні статеві органи (рис. 20). Геніталії самців оточені великими, темними щетинками, які не спостерігаються у самок. Ця ознака добре візуалізується навіть у мух, які тільки вилупились.

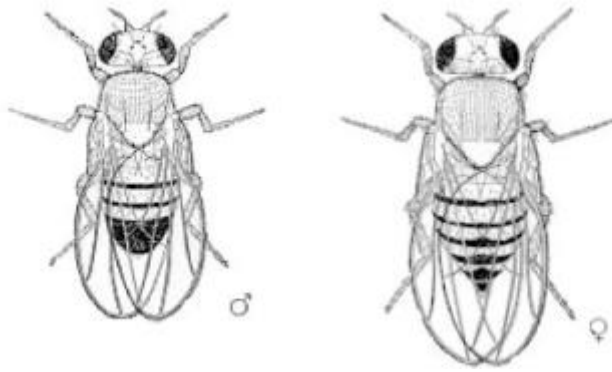


Рис. 19. Зовнішній вигляд самця (ліворуч) та самки (праворуч) (за Медведев, 1966)

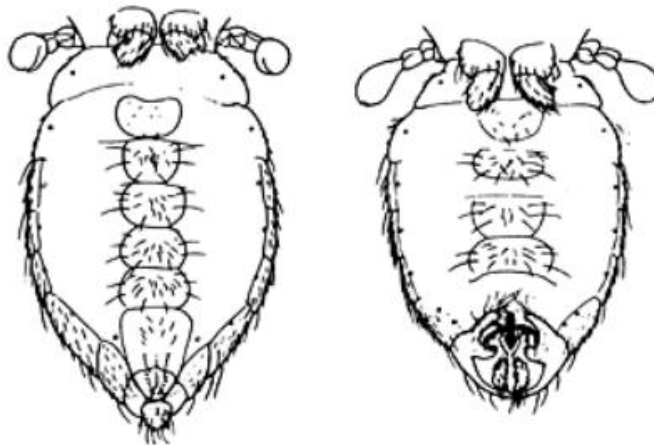


Рис. 20. Будова черевця самки (ліворуч) та самця (праворуч) (за Lindsley D.L. & Grell E.H., 1968)

У особин, хітиновий покрив яких затвердів, постеріорна частина черевця у самців завжди темніша, ніж у самок, кінець черевця у самців більш заокруглений, ніж у самок, черевце самок формується більшою кількістю стернітів. Загалом, в межах однієї і тієї ж популяції, самці менші, ніж самки, але цей параметр для визначення статі краще не використовувати з метою запобігання можливих помилок. При необхідності стать можна визначати і за допомогою інших ознак. Так, на передній парі лапок самець має пару статевих гребінців мідного кольору, яких не мають самки. Цю ознаку можна використовувати для ідентифікації статі у особин, які ще не вилупились (на стадії пупарію).

Життєвий цикл. Дрозофіліди – це комахи з повним перетворенням, і в їх життєвому циклі розрізняють чотири стадії: яйце, личинка, лялечка та імаго. Загалом для всіх видів дрозофіл, яких культивують у лабораторії, є справедливим правило: при збільшенні температури культивування (у певних межах), цикл розвитку скорочується. Так *D. melanogaster* при 21°C дає нове доросле покоління приблизно через два тижні: 8 днів для яйця та личинкових стадій та 6 днів для розвитку лялечки. Дорослі особини можуть жити більше 8 тижнів за оптимальних умов. *D. virilis* дає нове покоління через 18 днів за 24°C. На наступний день після відкладки яйця з нього вилуплюється личинка.

Личинка линяє двічі. Вона позбувається при цьому кутикули, гачків ротового апарату та дихалець.

Таким чином, на личинковій стадії розрізняють три періоди розвитку. Кутикула личинки третього періоду розвитку твердне та темніє, перетворюючись на пупарій. В цей момент (приблизно через 11 діб), зазвичай використовують слинні залози личинки для отримання препаратів політених хромосом. На стадії пупарію відбувається метаморфоз. Під кінець періоду розвитку пупарію, через його прозорі оболонки можна розрізнити дві темні плями (складені крила) та два червоних округлих утвори (очі).

Після закінчення метаморфозу з пупарію вилуплюється через його апікальну частину доросла особина. У момент вилуплення покриви дорослої мухи світлі, крила не розправлені, черевце значно видовжене. За декілька годин крила розправляються, наповнюючись гемолімфою, черевце вкорочується та потовщується. Покрови тіла темнішають.

Яйце дрозофіли має продовгувату форму близько 0,5 мм у довжину. У свіжих культурах їх легко помітити відкладеними на поживному середовищі поруч із стінками склянки. Запліднення яєць відбувається в момент проходження їх через верхній відділ 30 вагіни. При затриманні відкладання яйця через якісь несприятливі умови воно проходить перші стадії розвитку в статевих шляхах самки і тоді на поживне середовище відкладається розвинута личинка. За нормальних умов ембріональний розвиток відбувається зовні тіла матері та при температурі 27°C продовжується близько 20 год. Деякий час після вилуплення личинки знаходяться на поверхні поживного середовища. Потім вони заглиблюються в нього. Личинки I та II віку знаходяться у верхньому шарі поживного середовища і активно харчуються, личинки III віку мають найбільші розміри і виходять з поживного середовища на стінки склянки; період з моменту знерухомлення личинки III віку до моменту потемніння її покривів називається стадією передлялечки. Ця стадія є найбільш зручною для видалення слинних залоз при приготуванні препаратів політених хромосом. Лялечки дрозофіли мають вигляд коричневих коконів, котрі прикріплені нерухомо до стінок склянки. На стадії лялечки органи личинки (крім статевої та нервової систем) проходять зворотний розвиток і заміщуються іншими, які розвиваються з певних зачатків ембріональних тканин, що називаються імагінальними дисками.

Терміни розвитку дрозофіли при оптимальній температурі (23-25°C) наступні: яйце - 1 доба; личинки (I, II, III віку) - 5 діб; лялечки - 5 діб. Таким чином, виліт нового покоління мух відбувається через 10-12 діб після відкладення яєць мухами на свіжому середовищі. Через два дні після вилуплення самка може почати відкладати яйця. Після досягнення статевої зрілості і практично до кінця життя запліднена самка (і не запліднена також, але менш продуктивно) здатна відкладати яйця. Самки дрозофіли здатні зберігати сперму самців в своїх спермоприймачах протягом всього життя і таким чином відкладати запліднені яйця навіть лише після одного спаровування.

Умови культивування мух. Пробірки (ємності) з лініями (культурами) дрозофіли зберігають в чистому місці, яке не підлягає впливу прямих променів сонця. при температурі +20-25°C. При підвищенні температури цикл розвитку

дрозофіли скорочується, але підвищення температури понад 31°C, особливо за недостатньої вологості, може досить швидко призвести до стерильності самців, розвитку бактеріальної та грибової контамінації, а також зараження кліщами. Зниження температури значно подовжує тривалість життєвого циклу дрозofil.

Для проведення найпростіших генетичних експериментів з дрозofilою виникає потреба в наступному матеріально-технічному забезпеченні: скляні (пластикові) посудини (пробірки об'ємом до 50 мл, баночки на 200 мл, пеніцилінові флакони і та ін.), маркери по склу для написів на пробірках, речовини для знерухомлення мух (диетиловий ефір або CO₂), кахельні (скляні, залізні, пластикові) пластини, художні пензлі або пір'я птахів для сортування мух та лупи, або біокулярні мікроскопи, поживне середовище.

Практична частина

Матеріали і реактиви: вода, дріжджі (вологі), агар-агар, цукор, манна крупа, 10% спиртовий розчин ніпагіну або пропіонова кислота, мухи *D. melanogaster* дикого типу.

Обладнання: склянки об'ємом 50 мл для утримання дрозofil, вата для прикриття склянок, водяна баня, плитка для кип'ятіння суміші, мірний посуд, ложки або мішалки, автоклав, ефіризатор для знерухомлення мух (або альтернативний засіб наркозу), біокулярний мікроскоп або лупа, пензлик для маніпуляцій з мухами, пластина-поле для розміщення мух, джерело світла для огляду стадій розвитку, лінійка або інші засоби для вимірювання розмірів личинок/лялечок (за потреби).

Хід роботи

Завдання 1. Приготувати поживне середовище для утримання мух у лабораторних умовах.

До 1 л окропу додайте 80 г дріжджів і прокип'ятіть 20 хвилин. Окремо поставте 6 г 23 агар-агару на водяну баню і розтопіть. До прокип'ячених дріжджів додайте розтоплений агар-агар та 50 г цукру і дайте ще прокипіти 15 хвилин. Потім додайте до суміші 50 г манної крупи і зніміть з вогню. До початку приготування поживного середовища у воді треба розчинити у воді трохи цукру та дріжджів і поставити в тепле місце. Коли зварене поживне середовище охолоне до температури 40-50°C, але ще не загусне, до нього додають розчинені дріжджі та залишають бродити на 24 год. Дрозofil утримують у склянках об'ємом 50 мл, які зверху прикривають ватою. Склянки й вата попередньо стерилізуються. Для того, щоб на поживному середовищі не розмножувались плісняві гриби до нього додають 10% спиртовий розчин ніпагіну (етилпарабензойної кислоти) з розрахунку 10 мл на 1 л середовища, або пропіонову кислоту із розрахунку 4 мл на 1 л середовища.

Завдання 2. Розглянути особини дрозofil дикого типу.

Зарядіть ефіризатор і помістіть у нього мух, які підлягають наркотизації. Після знерухомлення останньої мухи негайно висипте їх на пластину-поле. Протягом кількох хвилин, поки мухи знаходяться під наркозом, користуючись біокулярним та пензликом, розгляньте очі, форму крил та колір тіла. Якщо мухи під час роботи почнуть оживати, їх можна знову підморити.

Завдання 3. Провести спостереження основних стадій розвитку дрізофіли в баночних культурах мух.

Контрольні питання

1. Чому *D. melanogaster* є модельним об'єктом для генетичних досліджень?
2. Які основні переваги дрізофіли для лабораторних робіт у генетиці?
3. Де можна зустріти дрізофілу в природі та в яких умовах вона розмножується?
4. Яка харчова основа використовується для культивування дрізофіли в лабораторних умовах?
5. Що таке статевий диморфізм, і як можна розрізнити самців і самок дрізофіли?
6. Які стадії розвитку проходить *D. melanogaster* у своєму життєвому циклі?
7. Як температура впливає на тривалість життєвого циклу дрізофіли?
8. На якому етапі розвитку личинок дрізофіли зазвичай досліджують політенні хромосоми?
9. Які умови культивування є оптимальними для збереження ліній дрізофіли в лабораторії?
10. Яке матеріально-технічне забезпечення необхідне для проведення генетичних експериментів з дрізофілою?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №8. Генетичний аналіз успадкування моно- та полігенних ознак

Мета: навчитися розв'язувати задачі на моногібридне схрещування.

Теоретичні відомості

Спадковість – це властивість організмів передавати свої ознаки потомству.

Мінливість – це властивість організмів набувати нових ознак.

Генотип – це сукупність усіх генів організму. При розв'язанні задач із генетики термін генотип вживають у його вузькому значенні, маючи на увазі тільки ті гени, що зумовлюють досліджувані ознаки.

Фенотип – це сукупність усіх ознак і властивостей організму, які формуються внаслідок взаємодії його генотипу й зовнішнього середовища. При розв'язанні задач із генетики термін фенотип вживають у вузькому значенні, маючи на увазі певні конкретні ознаки організму.

Розрізняють поняття «ознака» і «прояви ознаки». Наприклад, така ознака, як «колір насіння гороху» має два прояви — «жовтий колір» і «зелений колір», ознака «колір квітки гороху» має такі прояви, як «червоний колір» і «білий колір».

Один із проявів ознаки є *домінантним*, другий — *рецесивним*.

У найпростішому випадку певна ознака зумовлена відповідним геном.

Ген може перебувати в різних формах, які розміщені в гомологічних хромосомах і відрізняються за структурою.

Різні форми одного й того ж самого гена називаються *алелями*.

Наприклад, певний ген відповідає за колір насіння й має два алелі – домінантний і рецесивний, які відповідно зумовлюють жовтий і зелений кольори. Отже, ген зумовлює певну ознаку, а його алелі – різні прояви цієї ознаки.

Організм, гомологічні хромосоми якого містять однакові алелі того чи іншого гена, називають *гомозиготним*.

Організм, гомологічні хромосоми якого містять різні алелі того чи іншого гена, називають *гетерозиготним*.

Для запису схем схрещувань у генетиці користуються спеціальною символікою і літерами латинського алфавіту, наприклад:

A — домінантний алель;

a — рецесивний алель;

X — символ схрещування;

P — батьківські організми;

F1 — гібридне покоління;

♀ — символ жіночої статі;

♂ — символ чоловічої статі.

Моногібридне схрещування – це схрещування особин, які відрізняються за однією досліджуваною ознакою. Класичні досліди з моногібридного схрещування провів Грегор Мендель. За наслідками цих дослідів він сформулював закономірності, які згодом було названо «законами Менделя».

Перший закон Менделя (закон одноманітності гібридів першого покоління): при схрещуванні генетично однорідних форм, які відрізняються за однією ознакою, всі гібриди першого покоління будуть одноманітними.

Другий закон Менделя (закон розщеплення): при схрещуванні гібридів першого покоління між собою в другому поколінні з'являються особини як із домінантними, так і з рецесивними ознаками в середньому співвідношенні 3:1.

Виходячи з другого закону Менделя, англійський генетик Уільям Бетсон у 1902 р. сформулював *закон чистоти гамет*: «кожна із статевих клітин гібридів є чистою щодо однієї з батьківських ознак», тобто містить лише один із алелів даного гена. Закономірності розщеплення мають *статистичний характер*. Це означає, що вони спостерігаються лише за достатньо великої кількості досліджуваних об'єктів.

У задачах часто наводиться реальне розщеплення. В таких випадках слід визначити, якому теоретичному розщепленню відповідає наведене в умові задачі реальне розщеплення.

При розв'язуванні задач на моногібридне схрещування слід користуватися таким алгоритмом:

- ✓ спочатку запишіть позначення алелів і відповідних проявів ознак;
- ✓ генотип рецесивної особини можна визначити відразу, оскільки можливий лише один його варіант;
- ✓ особини з домінантною ознакою обов'язково матимуть один домінантний алель, а другий можна визначити, знаючи, що в кожного гібрида один алель — від однієї батьківської особини, а другий — від іншої.

Для полегшення розв'язування задач можна використати решітку Пеннета. Зазвичай, по вертикалі записуються алелі, які містяться в жіночих гаметах, а по горизонталі — ті, що в чоловічих.

Дигібридне схрещування — це схрещування особин, які відрізняються за двома досліджуваними ознаками.

Г. Мендель схрещував два сорти гороху — один із жовтим гладеньким насінням, другий — із зеленим зморшкуватим. Ці сорти відрізняються за двома ознаками — забарвленням та формою насіння.

Виходячи з наслідків досліду, Мендель сформулював закономірність, яка дістала назву **третього закону Менделя** (закон незалежного успадкування ознак): *успадкування кожної ознаки відбувається незалежно одна від іншої, внаслідок чого в другому поколінні з'являються особини з новими (порівняно з батьківськими) комбінаціями проявів ознак.*

Алгебраїчно успадкування ознак при дигібридному схрещуванні можна записати як квадрат двочлена $(3+1)^2$, а розщеплення за фенотипом визначити за формулою:

(3 жовті + 1 зелена) x (3 гладеньких + 1 зморшкувата) = 9 жовтих гладеньких + 3 жовтих зморшкуватих + 3 зелених гладеньких + 1 зелена зморшкувата

Успадкування алелів алгебраїчно можна записати як $(1 + 2 + 1)^2$, а розщеплення за генотипом визначити за формулою:

(1AA+2Aa+1aa) x (1Bb+2Bb+1bb) = 1AABV + 2AABb + 1AAbb + 2AaBV + 4AaBb + 2Aabb+1aaBV + 2aaBb + 1aabb

Полігібридне схрещування — це схрещування особин, які відрізняються за кількома досліджуваними ознаками. Наприклад, у гороху **A** — червоний колір квіток, **a** — білий; **B** — жовтий колір насіння, **b** — зеленим; **C** — гладенька форма насіння, **c** — зморшкувата.

Число гамет, які утворює F_1 , дорівнює 2^n , де **n** — кількість досліджуваних ознак (або відповідних генів). Загальна формула розщеплення за фенотипом у F_2 : $(3 + 1)^n$

Розщеплення за фенотипом у наведеному прикладі: $(3+1)^3 = (3 \text{ червоних} + 1 \text{ біла}) \times (3 \text{ жовтих} + 1 \text{ зелене}) \times (3 \text{ гладеньких} + 1 \text{ зморшкувате}) = 27 \text{ червоних жовтих гладеньких} + 9 \text{ червоних жовтих зморшкуватих} + 9 \text{ червоних зелених гладеньких} + 3 \text{ червоних зелених зморшкуватих} + 9 \text{ білих жовтих гладеньких} + 3 \text{ білих жовтих зморшкуватих} + 3 \text{ білих зелених гладеньких} + 1 \text{ біла зелене зморшкувате}.$

Число фенотипових класів у F_2 дорівнює 2^n ; в наведеному прикладі $2^3 = 8$. Загальна формула розщеплення за генотипом у F_2 : $(1+2+1)^n$ Розщеплення за генотипом у наведеному прикладі:

(1AA + 2Aa + 1aa) x (1BB+2Bb+1bb) x (1CC + 2Cc + 1cc) = 1AABVCC + 2AaBVCC + 2AABbCC + 4AaBbCC + 2AABVcc + 4AaBbCc + 4AABbCc + 8AaBbCc + 1AABVcc + 2AaBVcc + 2AABbcc + 4AaBbcc + 1AAbbCC + 2AabbCC + 2AAbbCc + 4AabbCc + 1AAbbcc + 2Aabbcc + 1aaBVCC +

$2aaBbCC + 2aaBBCc + 4aaBbCc + 1aaBBcc + 2aaBbcc + 1aabbCC + 2aabbCc + 1aabbcc$

Приклади задач на моногібридне схрещування

Задача 1. У дрозофіли сірий колір тіла — домінантна ознака, чорний колір — рецесивна. При схрещуванні сірих і чорних мух половина потомства має сіре тіло, половина — чорне. Визначте генотипи батьків.

Розв'язання. Позначимо: A — сірий колір, a — чорний. Усі чорні мухи мають генотип aa , а у всіх сірих обов'язково є принаймні один алель A . Чорні гібридні мухи отримали по одному алелю від кожного з батьків, звідси генотип сірих батьківських форм — Aa . У сірих гібридних мух також по одному алелю від кожної батьківської форми, тому їх генотип також Aa .

Задача 2. У морської свинки кудлата шерсть домінує над гладенькою. При схрещуванні кудлатих самців і самок отримано 29 гладеньких і 90 кудлатих особин. Визначте генотипи батьків і потомства.

Розв'язання. Позначимо: A — кудлата шерсть, a — гладенька. Розщеплення ознак у гібридів $90 : 29$, що відповідає співвідношенню $3:1$. Розщеплення $3 : 1$ відбувається лише тоді, коли батьки мають генотипи $Aa \times Aa$.

Задача 3. Групи крові у людини визначаються одним геном, який має три алелі — i° , I^A , I^B . Алелі I^A , I^B домінують над i° , а в разі сумісного перебування в генотипі проявляються обидва: $I^A = I^B$ (явище кодомінантності). Особи з генотипом $i^\circ i^\circ$ мають першу групу крові, з генотипом $I^A I^A$ чи $I^A i^\circ$ — другу, з генотипом $I^B I^B$ чи $I^B i^\circ$ — третю, з генотипом $I^A I^B$ — четверту. Які групи крові можливі у дітей, якщо в їхньої матері друга група, а в батька — перша?

Розв'язання. Особа з другою групою крові може мати генотип $I^A I^A$ чи $I^A i^\circ$, тому можливі два варіанти:

- а) $I^A I^A \times i^\circ i^\circ$
- б) $I^A i^\circ \times i^\circ i^\circ$

Таким чином, у дітей можливі як перша, так і друга групи крові.

Приклади задач на дигібридне схрещування

Задача 1. У морських свинок кудлата шерсть і чорне забарвлення — домінантні ознаки, гладенька шерсть і біле забарвлення — рецесивні. Внаслідок схрещування кудлатої чорної свинки з гладкошерстою чорною отримано 28 гладкошерстих чорних, 30 кудлатих чорних, 9 гладкошерстих білих, 11 кудлатих білих. Визначте генотипи батьків.

Розв'язання. Позначимо: A — кудлата шерсть, a — гладенька; B — чорне забарвлення, b — біле.

1-й спосіб. Задачу можна розв'язати шляхом аналізу успадкування кожної ознаки окремо. Розщеплення за ознакою характеру шерсті — 41 з кудлатою: 37 з гладенькою або $1:1$. Таке розщеплення спостерігається тоді, коли генотипи батьків за даним геном $Aa \times aa$. Розщеплення за ознакою забарвлення шерсті — 58 чорних : 20 білих або $3:1$. Таке розщеплення відбувається за генотипів батьків $Bb \times Bb$. Звідси повні генотипи батьків: $AaBb \times aaBb$.

2-й спосіб. Визначення генотипів батьків за рецесивним потомством. Певні алелі батьківських особин можна визначити відразу: $A—B—$ х $—aaB$.

Серед потомків є гомозиготні рецесивні особини (гладкошерсті білі) з генотипом ***aabb***. Оскільки потомок отримує від батьків по одному алелю з кожної пари, можна визначити інші алелі батьків: ***AaBb* X *aaBb***.

Задача 2. У малини червоний колір плодів і колюче стебло — домінантні ознаки, а жовтий колір плодів і гладеньке стебло — рецесивні. Унаслідок схрещування гетерозиготних за обома ознаками рослин із рослинами, які мають жовті плоди і гладеньке стебло, отримано 100 потомків. Скільки з них матимуть жовті плоди й колючі стебла?

Розв'язання. Позначимо: ***A*** — червоний плід, ***a*** — жовтий; ***B*** — колюче стебло, ***b*** — гладеньке.

Схема схрещування:

P ♀ *AaBb* (червоні колючі) X ♂ *aabb* (жовті гладенькі)

Гамети P *AB Ab aB ab ab*

F1 *AaBb* (червоні колючі), *Aabb* (червоні гладенькі), *aaBb* (жовті колючі), *aabb* (жовті)

Таким чином, жовті плоди й колючі стебла матимуть 1/4 потомків, або 25 особин.

Задача 6. У жінки з резус-негативною кров'ю **III** групи народилася дитина з **IV** групою крові, у якої була гемолітична хвороба внаслідок резус-конфлікту. Що можна сказати про групу крові та резус-фактор батька дитини?

Розв'язання. Генотип дитини з **IV** групою крові — ***I^AI^B***. Від матері дитина отримала алель ***I^B***, від батька — ***I^A***. Отже, батько може мати **II** групу крові (***I^AI^A*** або ***I^Ai***) чи **IV** групу (***I^AI^B***). Оскільки між організмами плоду і матері виник резус-конфлікт, значить плід є резус-позитивним. Це можливо у випадку, коли батько резус-позитивний (гомозиготний або гетерозиготний).

Приклади задач на полігібридне схрещування

Задача 1. Полідактилія, короткозорість і карий колір очей успадковуються як домінантні ознаки. Гени, що визначають ці ознаки, містяться в різних парах хромосом. Яка ймовірність народження кароокої дитини без аномалій, якщо обоє батьків гетерозиготні за всіма трьома генами?

Розв'язання. Ймовірність народження кароокої дитини — 3/4, з нормальною будовою кисті — 1/4, з нормальним зором — 1/4. Отже, ймовірність народження кароокої дитини без аномалій дорівнює:

$$\frac{3}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{3}{64}.$$

Задача 2. У курей біле пір'я домінує над забарвленим, оперені ноги — над голоногістю, горохоподібний гребінь — над листоподібним. Гомозиготну білу курку з опереними ногами й горохоподібним гребенем схрестили із забарвленим голоногим півнем, що має листоподібний гребінь. Яка частина білих оперених з горохоподібним гребенем потомків **F₂** від цього схрещування не дасть розщеплення в разі схрещування із забарвленими голоногими з листоподібним гребенем птахами?

Розв'язання. Позначимо: ***A*** — біле пір'я, ***a*** — забарвлене; ***B*** — оперені ноги, ***b*** — голі; ***C*** — горохоподібний гребінь, ***c*** — листоподібний.

Схема схрещування:

P ♀ *AABBCC* x ♂ *aabbcc*

Гамети P *ABC abc*

F₁ AaBbCc

Білі оперені з горохоподібним гребенем потомки F_2 не дадуть розщеплення при схрещуванні з рецесивними гомозиготними формами в тому випадку, якщо вони будуть гомозиготами **AABBCC**. Частина таких особин в F_2 становить 1/64.

Задачі для самостійного розв'язування на моногібридне схрещування

Задача 1. Ген комолості (безрогості) у великої рогатої худоби домінує над геном рогатості. Комола корова народила двох телят, перше з яких виявилось безрогим, а друге огатим. Визначте можливі генотипи батьків.

Задача 2. Унаслідок схрещування високорослого помідора з карликовим всі рослини F_1 мали високе стебло. Але в F_2 серед 35 800 одержаних кущів 8950 були карликовими. Скільки гомозиготних рослин є серед гібридів F_2 ?

Задача 3. У кроликів нормальна довжина шерсті є домінантною ознакою, коротка — рецесивною. У кролиці з короткою шерстю народилося 7 кроленят, з яких 4 були короткошерстими і 3 зі звичайною довжиною шерсті. Визначте генотип і фенотип батька кроленят.

Задача 4. Ген ранньостиглості ячменю домінує над пізньостиглістю. 1. Якими будуть рослини в (F_1), одержані в результаті запилення гомозиготної ранньостиглої рослини пилком пізньостиглої? 2. Яким буде ячмінь у другому поколінні (F_2)? 3. Які рослини можуть утворитися від схрещування однієї з пізньостиглих рослин другого покоління (F_2) з гібридом (F_1)?

Задача 5. Гігантські розміри рослин вівса — рецесивна ознака. 1. Яким є генотип батьківських рослин, якщо половина гібридів має нормальну, а половина — гігантську висоту? 2. А якщо лише чверть гібридів вирізняється гігантизмом? 3. Які форми вівса треба схрестити, щоб усе потомство було однорідним за даною ознакою?

Задачі для самостійного розв'язування на дигібридне схрещування

Задача 1. Плоди томатів бувають червоні й жовті, круглі та грушоподібні. Гени червоних плодів і гени круглої форми плодів домінантні. У зібраному в господарстві врожаю помідорів виявили 36 т помідорів червоної круглої форми і 12 т червоних грушоподібної форми. Яка маса (т) усього врожаю помідорів та яка маса (т) жовтих грушоподібних плодів помідорів, якщо помідори вирощували з гібридного дигетерозиготного насіння?

Задача 2. Чорний безрогий бик — представник чистої лінії — схрещується з червоними рогатими коровами. Якими будуть гібриди? Яким буде потомство F_2 від схрещування цих гібридів між собою? Чорна масть і безрогість — ознаки домінантності; причому гени обох ознак перебувають у різних хромосомах.

Задача 3. Від здорових батьків народилася дитина — глухонімий альбінос. Запишіть генотипи батьків і дитини.

Задача 4. У сім'ї, де батьки добре чули та мали один гладке волосся, а інший — кучеряве, народилася глуха дитина з гладким волоссям. Їхня друга дитина добре чула та мала кучеряве волосся. Яка вірогідність появи глухих дітей з кучерявим волоссям у сім'ї, якщо відомо, що ген кучерявого волосся домінує над гладким, глухота — ознака рецесивна, а обидві пари генів містяться в різних хромосомах?

Задача 5. У помідорів червоний колір (А) домінує над жовтим (а), а куляста форма плода (В) — над грушоподібною (Ь) . Схрестили рослину, гетерозиготну за червоним забарвленням і з грушоподібною формою плода, з гетерозиготною за кулястою формою й з жовтими плодами. Визначте, якими будуть гібриди першого покоління.

Задачі для самостійного розв'язування на полігібридне схрещування

Задача 1. Скільки та яких гамет може утворитися у самця морської свинки з чорним хутром, з довгою розетковою шерстю за умови: а) якщо він гомозиготний за всіма ознаками; б) якщо він гомозиготний за першими двома і гетерозиготний за третьою ознакою; в) якщо він гомозиготний за першою, але гетерозиготний за другою і третьою ознаками; г) якщо він гетерозиготний за всіма трьома ознаками. Поясніть це з точки зору цитології.

Задача 2. Гетерозигота (AaBb CcDd) схрещена з рецесивною гомозиготою (aabb ccdd). Визначте кількість типів гамет у цих особин. Яка частина потомства матиме всі чотири домінантні гени? Яка частина потомства матиме всі чотири рецесивних гени?

Задача 3. Які типи гамет утворюють особини з такими генотипами: а) AABVCC б) AABVCC с) AaBbCC д) AaBbCc

Задача 4. Особини з генотипом AaBbCc схрещені між собою. а) Скільки типів гамет утворюють дані особини? б) Яка частина потомства має всі три домінантні ознаки? с) Яка частина потомства має всі три рецесивні ознаки?

Задача 5. У гороху жовтий колір насіння (А) домінує над зеленим (а), гладенька форма насіння (В) – над зморшкуватою (Ь), біб простої форми (С) - над бобом з перетяжками(с). Схрещено рослини: AaBbсс x aabbCc. Визначте розщеплення за фенотипом у гібридному поколінні.

Задача 6. У томатів червоне і жовте забарвлення плоду визначається алелями А і а, кругла й грушоподібна форма плоду – алелями В і Ь, високе і низьке стебло – алелями R і r. Схрестили жовтоплідну рослину, гетерозиготну за ознаками форми плоду й висоти стебла, з низькою рослиною, гетерозиготною за ознаками кольору й форми плоду.

Задача 7. Кароокий, темноволосий резус-позитивний чоловік одружується з кароокою, темноволосою резус-негативною жінкою. Визначте ймовірність народження блакитноокої світловолосої резус-негативної дитини, якщо батьки обоє гетерозиготні за домінантними ознаками.

Контрольні питання

1. Що таке спадковість та мінливість?
2. Як визначається генотип і фенотип організму? У чому полягає різниця між ними?
3. Що таке алелі і як вони впливають на прояви ознак?
4. Що означає термін "гомозиготний" та "гетерозиготний" організм?
5. Які символи використовують у генетиці для позначення генів, алелів та схрещувань?
6. Що таке моногібридне схрещування?

7. У чому полягає перший закон Менделя (закон одноманітності гібридів першого покоління)?
8. Який зміст має другий закон Менделя (закон розщеплення)?
9. Що таке закон чистоти гамет і хто його сформулював?
10. Як використовувати решітку Пеннета при розв'язуванні задач на моногібридне схрещування?
11. Що таке дигібридне схрещування?
12. Як алгебраїчно записується успадкування ознак при дигібридному схрещуванні?
13. Що таке полігібридне схрещування, і як визначити кількість фенотипових класів у F_2 поколінні?
14. Як розрахувати кількість можливих гамет при полігібридному схрещуванні?
15. Яким чином здійснюється розщеплення за генотипом і фенотипом при полігібридному схрещуванні?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №9. Генетичний аналіз взаємодії неалельних генів

Мета: навчитися розв'язувати задачі на взаємодію неалельних генів.

Теоретичні відомості

В організмі одночасно виявляють свою дію гени з різних алелів. Багато з них можуть впливати на дію один одного, навіть якщо містяться в різних парах хромосом. При цьому може відбуватися відхилення від закону незалежного успадкування ознак.

Існує 3 форми взаємодії неалельних генів: *епістаз*, *комплементарність* та *полімерія*.

Задачі на епістаз

Епістаз — це пригнічення дії генів одного алеля генами іншого. Ген, який пригнічується, не виявляє своєї дії. Існує домінантний і рецесивний епістаз.

За схрещування дигібридів під час домінантного епістазу розщеплення за фенотипом у F_2 може становити:

- ✓ 13:3;
- ✓ 12:3:1;
- ✓ 7:6:3.

Приклад домінантного епістазу: у гарбуза домінантний ген Y спричиняє жовте забарвлення плодів, а рецесивний y — зелене. Крім того, є домінантний ген W , що пригнічує прояв будь-якого забарвлення, в той час як рецесивний w не заважає прояву забарвлення. Тому рослини, які мають у своєму генотипі хоча б один домінантний ген W , утворюватимуть білі плоди незалежно від того, які алелі гена Y будуть наявні в їхніх генотипах. Наприклад, у рослини з генотипами $YYWW$, $YyWw$, $yyWw$ плоди будуть білими.

За схрещування дигібридів під час рецесивного епістазу розщеплення за фенотипом у F_2 може становити:

- ✓ 9:3:4;
- ✓ 9:7;
- ✓ 13:3.

Приклад рецесивного епістазу: успадкування забарвлення шерсті у хатньої миші. Забарвлення агуті (рудувато-сіре) визначається домінантним геном *A*, його рецесивний алель у гомозиготному стані визначає чорне забарвлення. Домінантний ген іншої пари *C* визначає розвиток пігменту, а гомозиготи за його рецесивним алелем *c* є альбіносами. Особи, що є домінантними гомозиготами за геном *C* або гетерозиготними за цим геном, матимуть забарвлення шерсті відповідно до свого генотипу за геном *A*. Так, тварини з генотипами *AACC* та *AACc* будуть рудувато-сірі, а *aaCC* та *aaCc* — чорні. Але всі особи, гомозиготні за рецесивним геном *c*, — *Aacc*, *Aacc* та *aacc* — будуть альбіносами.

Приклади задач на епістаз

Задача 1. У господарстві «Братик Кролик» з розведення кроликів вирощують тварин різного забарвлення: чорного, сірого та білого. Забарвлення шерсті визначається таким чином: у кроликів рецесивний ген відсутності пігменту пригнічує дію домінантного гена наявності пігменту. Інша пара алельних генів впливає на розподіл пігменту, якщо він є: домінантний алель визначає сіре забарвлення (оскільки спричиняє нерівномірний розподіл пігменту по довжині волосини: пігмент накопичується біля її основи, а кінчик волосини залишається позбавленим пігменту), рецесивний — чорну (тому що він не впливає на розподіл пігменту).

Робітники господарства провели схрещування двох тварин, що є гетерозиготами. Які можуть бути нащадки цього схрещування за генотипом і фенотипом?

Розв'язання. Вводимо позначення: *B_C_* — сіре забарвлення; *B_cc* — чорне забарвлення; *bbC_* — біле забарвлення; *bbcc* — біле забарвлення. Складаємо схему схрещування *BbCc* × *BbCc*:

♀ \ ♂	<i>BC</i>	<i>Bc</i>	<i>bC</i>	<i>bc</i>
<i>BC</i>	<i>BBCC</i> сірі	<i>BBCc</i> сірі	<i>BbCC</i> сірі	<i>BbCc</i> сірі
<i>Bc</i>	<i>BBCc</i> сірі	<i>BBcc</i> чорні	<i>BbCc</i> сірі	<i>Bbcc</i> чорні
<i>bC</i>	<i>BbCC</i> сірі	<i>BbCc</i> сірі	<i>bbCC</i> білі	<i>bbCc</i> білі
<i>bc</i>	<i>BbCc</i> сірі	<i>Bbcc</i> чорні	<i>bbCc</i> білі	<i>bbcc</i> білі

Генотипи нащадків з родини A: 1 *bbcc* : 2 *bbCc* : 1 *bbCC* : 2 *Bbcc* : 4 *BbCc* : 2 *BbCC* : 1 *BBcc* : 2 *BBCc* : 1 *BBCC*.

Фенотипи: 9/16 у сірих (56,25 %); 3/16 у чорних (18,75 %); 1/4 у білих (25 %).

Задача 2. Андрій розводить голубів білого та темного кольору. Забарвлення птахів визначається таким чином:

✓ ген *A* визначає наявність темного забарвлення пір'я у голубів, *a* — білого забарвлення;

✓ ген *B* пригнічує дію гена *A* і також зумовлює біле забарвлення пір'я.

Хлопчик підібрав для розмноження пару домінантних і рецесивних гомозигот. З'ясуйте, чи відбуватиметься розщеплення у F_2 під час схрещування білих птахів: $AABB \times aabb$.

Визначте генотипи та фенотипи гібридів у F_1 та F_2 . Яким чином відбувається успадкування ознаки?

Розв'язання. Складаємо схему схрещування для F_1 :

♀	♂	<i>AB</i>
		<i>AaBb</i> білі
<i>ab</i>		

Генотип: усі *AaBb*.

Фенотип: усі білі внаслідок пригнічення дії гена *A* геном *B*.

Складаємо схему схрещування для F_2 :

♀ \ ♂	<i>AB</i>	<i>Ab</i>	<i>aB</i>	<i>ab</i>
<i>AB</i>	<i>AABB</i> білі	<i>AABb</i> білі	<i>AABB</i> білі	<i>AABb</i> білі
<i>Ab</i>	<i>AABb</i> білі	<i>AAbb</i> темні	<i>AaBb</i> білі	<i>Aabb</i> темні
<i>aB</i>	<i>AaBB</i> білі	<i>AaBb</i> білі	<i>aaBB</i> білі	<i>aaBb</i> білі
<i>ab</i>	<i>AaBb</i> білі	<i>Aabb</i> темні	<i>aaBb</i> білі	<i>aabb</i> білі

Співвідношення генотипів: 1 *aabb* : 2 *Aabb* : 1 *Aabb* : 2 *aaBb* : 4 *AaBb* : 2 *AABb* : 1 *aaBB* : 2 *AaBB* : 1 *AABB*.

Фенотипи: 13/16 у білі голуби (81,25 %); 3/16 у темні голуби (18,75 %).

Відбувається розщеплення ознак 3:13. Це випадок домінантного епістазу.

Задача 3. Господиня вирощує чорних і білих курей. За схрещування чорної курки з білим півнем усі курчата виявилися чорними. За аналізуючого схрещування отримали 28 білих та 10 чорних курчат. Як успадковується ознака?

Розв'язання. У випадку успадкування ознаки за однією парою генів за аналізуючого схрещування має відбутися розщеплення 1:1. Однак, за умовою, розщеплення дорівнює приблизно 3:1.

Робимо висновок: це випадок дигібридного схрещування.

Оскільки у F_1 усі гібриди були одноманітними, робимо висновок: батьківські особини були гомозиготними: *BB* та *CC*.

Складаємо схему схрещування чорної курки ♀ *BBCC* та білого півня ♂ *bbcc* для F_1 :

♀ \ ♂	bc
BC	$BbCc$ чорні

Генотип: усі $BbCc$.

Фенотип: 100% чорні.

Складаємо схему схрещування $BbCc \times bbcc$ для F_2 :

♀ \ ♂	BC	Bc	bC	bc
bc	$BbCc$ чорні	$Bbcc$ білі	$bbCc$ білі	$bbcc$ білі

Співвідношення генотипів нащадків: 1 $BbCc$: 1 $Bbcc$: 1 $bbCc$: 1 $bbcc$.

Фенотипи: 3/4 у білі (75 %); 1/4 у чорні (25 %).

Це співвідношення може утворитися під час взаємодії генів за принципом подвійного рецесивного епістазу.

Задачі на комплементарність

Комплементарність — це явище, коли дія двох неалельних генів утворює нову ознаку, не схожу на ті, що утворюються без їхньої взаємодії. Розщеплення за фенотипом у F_2 може становити: Š

- ✓ 9:6:1; Š
- ✓ 9:3:4; Š
- ✓ 9:7; Š
- ✓ іноді 9:3:3:1.

Приклад: успадкування форми плодів гарбуза. За наявності в генотипі доміnantних генів A або B виникає сферична форма плодів, а рецесивних — видовжена. За наявності в генотипі одночасно доміnantних генів A та B форма плодів — дископодібна. За схрещування чистих ліній із сортами, що мають сферичну форму плодів, у першому гібридному поколінні F_1 усі плоди матимуть дископодібну форму, а в поколінні F_2 відбудеться розщеплення за фенотипом: 9/16 рослин матимуть дископодібні плоди, 6/16 — сферичні, 1/16 — видовжені.

Приклади задач на комплементарність

Задача 1. За результатами досліджень, форма гребня у курей визначається взаємодією двох пар неалельних генів: Š

- ✓ горіхоподібний гребінь визначається взаємодією доміnantних алелів цих генів;
- ✓ комбінація одного гена в доміnantному, а іншого — в рецесивному стані визначає розвиток або трояндоподібного, або горохоподібного гребня; Š
- ✓ особини з простим гребнем є рецесивними за обох алелів.

Дослідники схрестили двох дигетерозиготних птахів. Якими за формою гребня можуть бути їхні нащадки?

Розв'язання. Вводимо позначення: $A_B_$ — горіхоподібний; A_bb — трояндоподібний; $aaB_$ — горохоподібний; $aabb$ — простий.

Складаємо схему схрещування:

♀ \ ♂	<i>AB</i>	<i>Ab</i>	<i>aB</i>	<i>ab</i>
<i>AB</i>	<i>AABB</i> горіхоподібний	<i>AABb</i> горіхоподібний	<i>AaBB</i> горіхоподібний	<i>AaBb</i> горіхоподібний
<i>Ab</i>	<i>AABb</i> горіхоподібний	<i>AAbb</i> трояндоподібний	<i>AaBb</i> горіхоподібний	<i>Aabb</i> трояндоподібний
<i>aB</i>	<i>AaBB</i> горіхоподібний	<i>AaBb</i> горіхоподібний	<i>aaBB</i> горохоподібний	<i>aaBb</i> горохоподібний
<i>ab</i>	<i>AaBb</i> горіхоподібний	<i>Aabb</i> трояндоподібний	<i>aaBb</i> горохоподібний	<i>aabb</i> простий

Співвідношення генотипів: 1 *aabb* : 2 *Aabb* : 1 *Aabb* : 2 *aaBb* : 4 *AaBb* : 2 *AABb* : 1 *aaBB* : 2 *AaBB* : 1 *AABB*.

Фенотипи: 9/16 у з горіхоподібним гребнем (56,25 %); 3/16 у з трояндоподібним гребнем (18,75 %); 3/16 у з горохоподібним гребнем (18,75 %); 1/16 у з простим гребнем (6,25 %).

Задача 2. На дослідній ділянці інституту овочівництва вирощують гарбузи з плодами різної форми: сферичної, дископодібної та видовженої. Науковці схрестили гарбузи двох сортів, що мали сферичну форму плодів, але різні генотипи: *AAdd* та *aaDD*.

Всі рослини у F_1 мали дископодібні плоди, а у F_2 плоди були трьох різних форм: сферичні, дископодібні й видовжені.

Поясніть причини такого успадкування ознак. В якому співвідношенні відбулося розщеплення ознак у F_2 ?

Розв'язання. Відбувається взаємодія неалельних генів за типом комплементарності. Поява дископодібної форми спричинена комбінацією дії двох домінантних генів: *A* та *D*. Видовженої — дії двох рецесивних генів у гомозиготному стані: *aa* та *dd*.

Складаємо схему схрещування для F_1 :

♀ \ ♂	<i>AD</i>
<i>ad</i>	<i>AaDd</i> дископодібні

Генотип: усі *AaDd*.

Фенотип: усі рослини мають дископодібні плоди.

Складаємо схему схрещування для F_2 :

♀ \ ♂	<i>AD</i>	<i>Ad</i>	<i>aD</i>	<i>ad</i>
<i>AD</i>	<i>AADD</i> дископодібні	<i>AADd</i> дископодібні	<i>AaDD</i> дископодібні	<i>AaDd</i> дископодібні
<i>Ad</i>	<i>AADd</i> дископодібні	<i>AAdd</i> сферичні	<i>AaDd</i> дископодібні	<i>Aadd</i> сферичні
<i>aD</i>	<i>AaDD</i> дископодібні	<i>AaDd</i> дископодібні	<i>aaDD</i> сферичні	<i>aaDd</i> сферичні
<i>ad</i>	<i>AaDd</i> дископодібні	<i>Aadd</i> сферичні	<i>aaDd</i> сферичні	<i>aadd</i> видовжені

Співвідношення генотипів: 1 *aadd* : 2 *Aadd* : 1 *AAdd* : 2 *aaDd* : 4 *AaDd* : 2 *AADd* : 1 *aaDD* : 2 *AaDD* : 1 *AADD*.

Фенотипи: 9/16 у з дископодібним плодами (56,25 %); 6/16 у зі сферичними плодами (35,5 %); 1/16 у з видовженими плодами (6,25 %).

Задача 3. Студенти-генетики хрестили між собою два сорти рослини, один з яких має лійкоподібну форму квітки, другий — бокалоподібну. Ці ознаки визначаються дією різних домінантних генів. Рецесивні гомозиготи мають циліндричну форму квітки.

Всі гібриди у F_1 мали особливу форму квітки, не схожу на попередні.

Визначте фенотипи рослин у F_2 . Поясніть утворення нової форми квіток у гібридів F_1 та F_2 .

Розв'язання. Нові форми квітки зумовлені комплементарною дією двох генів. Вводимо позначення:

L — лійкоподібні квіти; *l* — циліндричні квіти; *B* — бокалоподібні квіти; *b* — циліндричні квіти.

Визначаємо генотипи батьківських форм. Оскільки у F_1 не відбулося розщеплення, обидві батьківські рослини були гомозиготними. Отже, їхні генотипи: *bbLL* та *Bbll*.

Складаємо схему схрещування для F_1 :

♀ \ ♂	<i>bL</i>
<i>Bl</i>	<i>BbLl</i> нова форма квітки

Генотип: усі *BbLl*.

Фенотип: усі рослини матимуть нову форму квітки.

Складаємо схему схрещування для F_2 :

♀ \ ♂	<i>BL</i>	<i>Bl</i>	<i>bL</i>	<i>bl</i>
<i>BL</i>	<i>BBLL</i> нова форма	<i>BBLl</i> нова форма	<i>BbLL</i> нова форма	<i>BbLl</i> нова форма
<i>Bl</i>	<i>BBLl</i> нова форма	<i>BBll</i> бокалоподібні	<i>BbLl</i> нова форма	<i>Bbll</i> бокалоподібні
<i>bL</i>	<i>BbLL</i> нова форма	<i>BbLl</i> нова форма	<i>bbLL</i> лійкоподібні	<i>bbLl</i> лійкоподібні
<i>bl</i>	<i>BbLl</i> нова форма	<i>Bbll</i> бокалоподібні	<i>bbLl</i> лійкоподібні	<i>bbll</i> циліндричні

Співвідношення генотипів: 1 *bbll* : 2 *Bbll* : 1 *BBll* : 2 *bbLl* : 4 *BbLl* : 2 *BBLl* : 1 *bbLL* : 2 *BbLL* : 1 *BBLL*.

Фенотипи: 9/16 у з нової формою квіток (56,25 %); 3/16 у з бокалоподібними квітками (18,75 %); 3/16 у з лійкоподібними квітками (18,75 %); 1/16 у з циліндричними квітками (6,25 %).

Задачі на полімерію

Полімерія — явище, за якого одна й та сама ознака визначається кількома алелями. При цьому, чим більше в генотипі міститься домінантних генів, що визначають цю ознаку, тим яскравіше ця ознака виявляється.

Найчастіше полімерні гени контролюють кількісні ознаки: висоту рослин, масу тварин, яйценосність курей, довжину волокон у льону, вміст цукру в коренеплодах цукрового буряка та ін.

Приклад: у людини колір шкіри (кількість пігменту меланіну в шкірі) визначається трьома неалельними генами: A_1 , A_2 , A_3 . Найбільша кількість меланіну утворюється в тому випадку, коли в генотипі всі три алелі перебувають у гомозиготному домінантному стані $A_1A_1A_2A_2A_3A_3$. У цьому випадку утворюється темнокоричневий колір шкіри, притаманний негроїдній расі. Найсвітлішому кольору шкіри, що наявний у представників європеїдної раси, відповідає генотип, за якого всі три алелі перебувають у гомозиготному рецесивному стані $a_1a_1a_2a_2a_3a_3$. Проміжні варіанти визначатимуть різну інтенсивність пігментації, за якої чим більше домінантних генів опиниться в генотипі, тим більш темною буде шкіра.

За *кумулятивної полімерії* дія домінантних алелів підсумовується, а ступінь виявлення ознаки залежить від числа домінантних алелів цього гена.

За *некумулятивної полімерії* для максимального виявлення ознаки достатньо хоча б одного домінантного алеля в парі (або групі) генів, що взаємодіють.

Приклади задач на полімерію

Задача 1. Жовте забарвлення пелюсток квітки рослини визначається двома парами генів. Кожний домінантний ген цих алелів визначає жовте забарвлення. Рецесивні гомозиготні рослини мають білі квітки. Визначте, яке розщеплення за фенотипом відбудеться під час схрещування дигетерозиготної рослини з рецесивною гомозиготою.

Розв'язання. Вводимо позначення:

$Y_1Y_1Y_2Y_2$ — темно-жовті квіти;

$Y_1Y_1Y_2y_2$, $Y_1y_1Y_2Y_2$ — яскраво-жовті квіти;

$y_1y_1Y_2Y_2$, $Y_1Y_1y_2y_2$, $Y_1y_1Y_2y_2$ — жовті квіти;

$y_1y_1Y_2y_2$, $Y_1y_1y_2y_2$ — блідо-жовті квіти;

$y_1y_1y_2y_2$ — білі квіти.

Складаємо схему схрещування $Y_1y_1Y_2y_2$ (жовті квітки) $\times$ $y_1y_1y_2y_2$ (білі квітки):

♀ \ ♂	Y_1Y_2	Y_1y_2	y_1Y_2	y_1y_2
y_1y_2	$Y_1y_1Y_2y_2$ жовті	$Y_1y_1y_2y_2$ блідо-жовті	$y_1y_1Y_2y_2$ блідо-жовті	$y_1y_1y_2y_2$ білі

Генотипи: 1 $Y_1y_1Y_2y_2$: 1 $Y_1y_1y_2y_2$: 1 $y_1y_1Y_2y_2$: 1 $y_1y_1y_2y_2$

Фенотипи: 1/4 у рослини з жовтими квітками (25 %); 1/2 у рослини з блідо-жовтими квітками (50 %); 1/4 у рослини з білими квітками (25 %).

Задача 2. Колір шкіри людини визначається дією генів за типом полімерії: чим більше домінантних генів, тим він темніше. За 4-х домінантних

генів — шкіра чорна, за 3-х — темна, за 2-х — смаглява, за 1-го — світла. Якщо всі гени в рецесивному стані — шкіра біла.

Майкл, який має чорну шкіру, одружився з білошкірою жінкою на ім'я Мері. Якими можуть бути їхні онуки, якщо їхній син одружиться з мулаткою (дигетерозиготна особина)?

Розв'язання. Вводимо позначення:

$A_1A_1A_2A_2$ — чорна шкіра;

$A_1A_1A_2a_2$, $A_1a_1A_2A_2$ — темна шкіра;

$A_1a_1A_2a_2$, $A_1A_1a_2a_2$, $a_1a_1A_2A_2$ — смаглява шкіра;

$a_1a_1a_2A_2$, $A_1a_1a_2a_2$ — світла шкіра;

$a_1a_1a_2a_2$ — біла шкіра.

Визначаємо генотип сина Майкла й Мері за схемою схрещування ♀ $a_1a_1a_2a_2 \times \text{♂ } A_1A_1A_2A_2$:

♀ \ ♂	A_1A_2
a_1a_2	$A_1a_1A_2a_2$ смаглява шкіра

Складаємо схему схрещування ♀ $A_1a_1A_2a_2 \times \text{♂ } A_1a_1A_2a_2$ для визначення можливих генотипів онуків:

♀ \ ♂	A_1A_2	A_1a_2	a_1A_2	a_1a_2
A_1A_2	$A_1A_1A_2A_2$ чорна шкіра	$A_1A_1A_2a_2$ темна шкіра	$A_1a_1A_2A_2$ темна шкіра	$A_1a_1A_2a_2$ смаглява шкіра
A_1a_2	$A_1A_1A_2a_2$ темна шкіра	$A_1A_1a_2a_2$ смаглява шкіра	$A_1a_1A_2a_2$ смаглява шкіра	$A_1a_1a_2a_2$ світла шкіра
a_1A_2	$A_1a_1A_2A_2$ темна шкіра	$A_1a_1A_2a_2$ смаглява шкіра	$a_1a_1A_2A_2$ смаглява шкіра	$a_1a_1A_2a_2$ світла шкіра
a_1a_2	$A_1a_1A_2a_2$ смаглява шкіра	$A_1a_1a_2a_2$ світла шкіра	$a_1a_1A_2a_2$ світла шкіра	$a_1a_1a_2a_2$ біла шкіра

Співвідношення генотипів:

$$\begin{aligned}
 &1 a_1a_1a_2a_2 : 2 A_1a_1a_2a_2 : 1 A_1A_1a_2a_2 : \\
 &: 1 A_1A_1a_2a_2 : 2 a_1a_1A_2a_2 : 4 A_1a_1A_2a_2 : 2 A_1A_1A_2a_2 : \\
 &: 1 a_1a_1A_2A_2 : 2 A_1a_1A_2A_2 : 1 A_1A_1A_2A_2.
 \end{aligned}$$

Фенотипи: 1/16 у чорних (6,25 %); 1/4 у з темною шкірою (25 %); 6/16 у зі смаглявою шкірою (37,5 %); 1/4 у зі світлою шкірою (25 %); 1/16 у з білою шкірою (6,25 %).

Задача 3. Ботаніки з'ясували, що в рослини грицики звичайні плід стручечок може бути трикутної або кулястої форми. Генетичні дослідження виявили, що за схрещування будь-якої гетерозиготної форми з трикутним стручечком із рослиною, що має кулясті стручечки, у гібридів F_1 завжди утворюються трикутні стручечки.

На дослідній ділянці був поставлений експеримент для визначення типу успадкування ознаки. Визначте генотипи рослин, якщо схрещування дає такі результати розщеплення: 3 частини рослин — з трикутними стручечками : 1 частина рослин — з кулястими. Як успадковується ознака?

Розв'язання. Це випадок некумулятивної полімерії. Два різних гени C_1 та C_2 визначають трикутну форму плодів, а рецесивні гени c_1 та c_2 — кулясту. Складаємо схему схрещування двох гомозиготних рослин — домінантної та рецесивної $C_1C_1C_2C_2 \times c_1c_1c_2c_2$:

♀ \ ♂	♂	c_1c_2
	♀	C_1C_2
		$C_1c_1C_2c_2$ трикутні плоди

Генотип: усі $C_1c_1C_2c_2$.

Фенотип: усі рослини з трикутними плодами.

Проводимо аналізуюче схрещування $C_1c_1C_2c_2 \times c_1c_1c_2c_2$:

♂ ♀	C_1C_2	C_1c_2	c_1C_2	c_1c_2
c_1c_2	$C_1c_1C_2c_2$ трикутні плоди	$C_1c_1c_2c_2$ трикутні плоди	$c_1c_1C_2c_2$ трикутні плоди	$c_1c_1c_2c_2$ кулясті плоди

Генотип: 1 $C_1c_1C_2c_2$: 1 $C_1c_1C_2c_2$: 1 $c_1c_1C_2c_2$: 1 $c_1c_1c_2c_2$

Фенотип: 3/4 у рослини з трикутними плодами (75 %); 1/4 у рослини з кулястими плодами (25 %).

Задачі для самостійного розв'язування

Задача 1. У запашного горошку пурпурне забарвлення квіток зумовлене поєднанням дії двох домінантних комплементарних (що доповнюють один одного) генів — C і P . Якщо обидва вони (або один з них) відсутні, пігмент не утворюється і квітки залишаються білими.

- Схрестили білокріткову рослину ($CCpp$) з білокрітковою ($ccPP$). Який фенотип матиме перше покоління гібридів?
- Схрестили дві червоноквіткові дигетерозиготні рослини з F_1 . Встановіть розщеплення за фенотипом у другому поколінні гібридів.
- Квітки дигетерозиготної червоноквіткової рослини запилили пилком білокріткової рецесивної за обома парами алелей. Встановіть розщеплення за фенотипом у третьому поколінні гібридів.

Задача 2. Червоне забарвлення плодів у томата визначається взаємодією комплементарних домінантних генів (R і T). Оранжеві плоди утворюють рослини з генотипом $rrT-$, проміжні жовто-оранжеві — рослини з генотипом $rrtt$. Які генотипи заявляться в другому поколінні гібридів після схрещування рослин із жовтими ($RRtt$) і оранжевими ($rrTt$) плодами?

Задача 3. Чорні собаки породи коккер-спаніель мають генотип $AaBb$, руді — $Aabb$, коричневі — $aaBb$, світло-жовті — $aabb$. Від схрещування чорного коккер-спаніеля зі світло-жовтою самицею народилося світло-жовте цуценя. Якого співвідношення цуценят за фенотипом слід чекати від схрещування цього ж чорного спаніеля із самицею однакового з ним генотипу?

Задача 4. Схрестили дві рослини вівса. Перша має зерно чорного кольору, що визначається генами $A_1A_1A_2A_2$, друга — жовтого, що визначається генами $a_1a_1a_2a_2$. Рослини, що мають проміжний генотип, фенотипно відрізняються різними відтінками забарвлення зерна (від темно-сірого до світло-сірого). Визначте вид взаємодії генів і розщеплення за кольором зерна внаслідок схрещування рослин з генотипами $A_1a_1A_2a_2 \times A_1a_1A_2a_2$.

Задача 5. Припустимо, що червоне забарвлення зернівок пшениці залежить від двох пар полімерних генів A_1 і A_2 . Інтенсивність забарвлення зумовлюється кількістю домінантних генів. Гени a_1 і a_2 визначають біле забарвлення зернівок.

- Яке розщеплення за забарвленням зерна отримаємо внаслідок схрещування двох рослин, гетерозиготних за обома парами генів?

- Унаслідок схрещування двох рослин зі світло-червоними і блідо-рожевими зернами отримали гібриди, серед яких було $1/8$ рослин із червоними зернами, $3/8$ — зі світло-червоними, $3/8$ — із блідо-рожевими і $1/8$ — з білими зернами. Які генотипи батьківських рослин?

Задача 6. Вуха кроликів породи баран мають 30 см довжини, у інших порід — 10 см. Довжина вух залежить від двох пар генів з однозначною дією. Генотип кроликів породи баран — $L_1L_1L_2L_2$, звичайних кроликів — $I_1I_1I_2I_2$. Визначте довжину вух кроликів F_1 та в усіх можливих генотипів F_2 .

Задача 7. У коней чорна масть зумовлена домінантним геном B , руда — рецесивною його алеллю b . Ген C з другої пари генів епістатичний відносно генів B і b і дає сіру масть. Унаслідок схрещування сірої тварини з генотипом $BBCC$ і рудої з генотипом $bbcc$ перше покоління було сірої масті. Визначте розщеплення в другому поколінні за фенотипами й генотипами.

Задача 8. Утворення в клітинах людського тіла специфічного білка інтерферону пов'язане з комплементарною взаємодією двох домінантних неалельних генів (A і B), локалізованих у різних хромосомах (A — у другій, B — у п'ятій). Батьки здорові, але дигетерозиготні за генами A і B . Визначте ймовірність народження у них здорових і хворих дітей.

Задача 9. Припускають, що нормальне забарвлення шкіри людини зумовлене комплементарно взаємодіючими домінантними генами A і B . Люди з генотипом $aaB-$, $A-bb$ або $aabb$ — альбіноси. Визначте ймовірність народження альбіносів у двох здорових дигетерозиготних за генами A і B батьків.

Задача 10. У людини одна з форм спадкової глухоти визначається двома рецесивними незчепленими алелями d та e . Для нормального слуху необхідна наявність домінантних алелей D та E , одна з яких визначає розвиток завитки, а друга — слухового нерва.

- У сім'ї обоє батьків глухі, а двоє їхніх дітей мають нормальний слух. Визначте генотипи членів сім'ї. Як взаємодіють у цій сім'ї два домінантні неалельні гени?

- Яка ймовірність народження дитини з нормальним слухом, якщо мати страждає спадковою глухотою, а батько має спадково нормальний слух?

- У шлюбі здорових людей з'явилась глухоніма дитина. Чому це сталося? Запишіть генотипи батьків і дітей.

Контрольні питання

1. Що таке епістаз і які його види існують?
2. Як впливає домінантний епістаз на фенотипове розщеплення у F_2 поколінні?
3. Який приклад домінантного епістазу можна навести для рослин, таких як гарбуз?
4. Що таке рецесивний епістаз, і яке розщеплення за фенотипом він може викликати?
5. Наведіть приклад рецесивного епістазу у хатньої миші, пояснюючи успадкування забарвлення шерсті.
6. Що таке комплементарність у генетиці, і яке фенотипове розщеплення вона може викликати у F_2 поколінні?
7. Який приклад комплементарної взаємодії генів можна навести для форми плодів гарбуза?
8. Що таке полімерія і які ознаки зазвичай контролюють полімерні гени?
9. Як полімерія впливає на колір шкіри людини? Які генотипи відповідають за найтемніший і найсвітліший колір шкіри?
10. У чому полягає різниця між кумулятивною і некумулятивною полімерією?
11. Як кількість домінантних алелів у генотипі впливає на виявлення полімерних ознак?
12. Чим відрізняються взаємодії алельних і неалельних генів у контексті успадкування ознак?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №10. Дослідження успадкування ознак, зчеплених із статтю

Мета: навчитися розв'язувати задачі на успадкування ознак, зчеплених зі статтю.

Теоретичні відомості

Зчепленими зі статтю є ознаки, гени яких розташовані не в аутосомах, а в статевих хромосомах: X та Y.

У людини жінки мають дві однакові статеві хромосоми: XX (гомогаметна стать). Чоловіки – різні: XY (гетерогаметна стать). Жіночі гамети несуть по одній X-хромосомі. Чоловічі: 50% – хромосому X, 50% – хромосому Y. За злиття гамет під час запліднення визначається стать майбутнього організму.

Y-хромосома зазвичай менша за X-хромосому. У X- та Y-хромосомах є гомологічні ділянки, що містять алельні гени. Але в X- та Y-хромосомах є й негомологічні ділянки. У цих ділянках X-хромосоми містять гени, яким немає алельних у Y-хромосомі (наприклад, гени дальтонізму, гемофілії). І навпаки, в негомологічній ділянці Y-хромосоми містяться гени, у яких немає алелів у X-хромосомі (ген гіпертрихозу).

Якщо ген зчеплений з Y-хромосомою, він успадковується тільки чоловіками. Якщо ген локалізований у X-хромосомі, він може передаватися від

батька – тільки донькам, а від матері – як синам, так і донькам з однаковою вірогідністю.

Якщо ген зчеплений з Х-хромосомою і є рецесивним, то у жінок він виявляється лише в гомозиготному стані. Оскільки у чоловіків Х-хромосома лише одна, ця ознака виявляється завжди (і в домінантному, і в рецесивному стані).

Для розв'язання задач із цього розділу треба знати:

- ✓ у закономірності хромосомного визначення статі;
- ✓ у типи визначення статі у різних організмів;
- ✓ у особливості успадкування зчеплених зі статтю ознак.

У багатьох групах організмів гомогаметною статтю є жіноча, а гетерогаметною – чоловіча (мухи, клопи, жуки, ссавці, більшість видів риб, деякі земноводні та дводомні рослини тощо), а в інших – навпаки (метелики, плазуни, птахи, деякі риби й земноводні).

Реципрокні схрещування – це пари взаємозворотних схрещувань, за яких вихідні форми протилежно відрізняються за досліджуваними ознаками та статтю.

Крис-крос успадкування (хрест-нахрест) – випадок успадкування генів, зчеплених зі статтю, за якого ознаки батька передаються донці, а ознаки матері – синові.

Під час розв'язування задач на зчеплене зі статтю успадкування генотипи у схемах схрещування слід записувати у хромосомному виразі (приклади: X^bX^b , X^BY , Z^pZ^p , Z^pW), вказуючи, в якій хромосомі локалізований досліджуваний ген.

Отже, під час розв'язування задач пам'ятайте:

1. Одна стать є гомогаметною, а інша – гетерогаметною.
2. Часто ознаки, що зчеплені зі статтю, контролюються генами, які локалізовані лише в Х-хромосомі.
3. Існує чотири типи хромосомного визначення статі, тому варто звертати увагу на те, яка стать є гетерогаметною, а яка – гомогаметною.
4. Гомогаметна стать утворює один тип гамет, а гетерогаметна – два.
5. Якщо гомогаметною статтю є жіноча, то сини завжди отримують Х-хромосому від матері, а Y-хромосому – від батька, доньки отримують по одній Х-хромосомі від батька та матері.
6. Гени, що локалізовані в Y-хромосомі, завжди передаються тільки від батька до сина.
7. Якщо гени локалізовані в гомологічних ділянках Х- і Y-хромосом, їх успадкування визначається законами Менделя.
8. Під час запису генотипів особин, що схрещуються, спочатку пишуть аутосомні гени, а потім – гени, що локалізовані у статевих хромосомах (приклади: AaX^bX^b , CcX^BY).

Приклади задач

Задача 1. За результатами досліджень, у кішок гени чорного та рудого кольору шерсті є алельними й містяться у Х-хромосомі, а в разі їх поєднання утворюються триколірні (черепашкові) особини.

На одному подвір'ї живе триколірна кішка Марта. До неї залицяються два сусідських коти – чорний Пірат та Апельсин рудого забарвлення. Яких

нащадків слід очікувати від схрещування триколірної кішки з кожним із цих котів?

В якому випадку можна за забарвленням визначити стать цих тварин і чому? Чи можуть бути винятки?

Розв'язання. Чорні коти мають лише один ген, що визначає колір шерсті – чорний – і він локалізований у Х-хромосомі. Саме цей ген буде передаватися від батька до кошенят жіночої статі. Руді коти так само мають лише один ген забарвлення шерсті – рудий – і так само будуть передавати його лише кошеняткам жіночої статі. Кішка ж буде утворювати яйцеклітини, 50% з яких будуть містити гени чорного забарвлення шерсті, 50% – рудого. Складемо схему схрещування триколірної кішки з чорним котом:

♀ \ ♂	$X^{\text{чорн.}}$	Y
$X^{\text{чорн.}}$	$X^{\text{чорн.}} X^{\text{чорн.}}$ чорні кішки	$X^{\text{чорн.}} Y$ чорні коти
$X^{\text{руд.}}$	$X^{\text{чорн.}} X^{\text{руд.}}$ черепахові кішки	$X^{\text{руд.}} Y$ руді коти

Серед нащадків 25% будуть чорними кішками, 25% – триколірними кішками, 25% – чорними котами, 25% – рудими котами. Складемо схему схрещування триколірної кішки з рудим котом:

♀ \ ♂	$X^{\text{руд.}}$	Y
$X^{\text{чорн.}}$	$X^{\text{чорн.}} X^{\text{руд.}}$ черепахові кішки	$X^{\text{чорн.}} Y$ чорні коти
$X^{\text{руд.}}$	$X^{\text{руд.}} X^{\text{руд.}}$ руді кішки	$X^{\text{руд.}} Y$ руді коти

Серед нащадків 25% будуть рудими кішками, 25% – триколірними кішками, 25% – чорними котами, 25% – рудими котами.

Триколірними за норми можуть бути лише кішки, адже тільки жіночі особини одночасно мають дві Х-хромосоми, що містять гени забарвлення. При цьому одна Х-хромосома має нести ген чорного забарвлення, а інша Х-хромосома – рудого. Винятком можуть бути лише коти з аномальним генотипом: $X^{\text{руд.}} X^{\text{чорн.}} Y$.

Задача 2. Дрозофіла має пару алельних генів, що зчеплені зі статтю. Один з них визначає розвиток білих очей, а інших – червоних.

Студенти-генетики під час практичних занять схрестили самок, що мають червоні очі, із самцями, що мають білі очі. Всі нащадки у F_1 виявилися з червоними очима. А у F_2 з'явилися самці як з білими, так і з червоними очима.

Студенти мають скласти схему схрещування, допоможіть їм. Визначте: який із двох алелів є рецесивним, а який – домінантним?

Яка частина самців матимуть білі очі у F_1 ?

Розв'язання. Оскільки у F_1 усі особини мають червоні очі, алель червоних очей домінує над алелем білих очей.

Вводимо позначення: B – червоні очі; b – білі очі. Визначаємо генотипи батьківських особин: самці X^bY , самки X^BX^B .

Складаємо схему схрещування для F_1 :

♀ \ ♂	X^b	Y
X^B	X^BX^b червоні очі, самки	X^BY червоні очі, самці
X^B	X^BX^b червоні очі, самки	X^BY червоні очі, самці

Складаємо схему схрещування для F_2 :

♀ \ ♂	X^B	Y
X^B	X^BX^B червоні очі, самки	X^BY червоні очі, самці
X^b	X^BX^b червоні очі, самки	X^bY білі очі, самці

Генотипи: $1 X^BX^b : 1 X^bX^b : 1 X^BY : 1 X^bY$

Фенотипи: самки з червоними очима (50%); самці з червоними очима (25%); самці з білими очима (25%).

Вірогідність утворення самців з білими становить $1/4$ від загальної кількості особин.

Задача 3. Дрозофіла має дві пари альтернативних ознак: нормальне сіре та жовте забарвлення тіла, нормальна та зачаткова форма крил.

Науковці схрестили гомозиготну самку з жовтим тілом і нормальними крилами з гомозиготним самцем, що має сіре тіло та зачаткові крила. У F_1 усі самки виявилися нормальними за двома ознаками, а всі самці мали жовте тіло й нормальні крила.

Допоможіть науковцям визначитися: Яка ознака зчеплена зі статтю, а яка – ні? Які ознаки є домінантними, а які — рецесивними?

Розв'язання. Оскільки у F_1 усі особини мають нормальні крила, то ця ознака є домінантною, а зачаткові крила – рецесивною. Жовте тіло мають тільки самці. Припускаємо, що ця ознака є рецесивною й ген міститься у X-хромосомі (тобто ознака зчеплена зі статтю). Перевіримо припущення.

Вводимо позначення: W – нормальні крила; w – зачаткові крила; B – сіре тіло; b – жовте тіло.

Генотипи вихідних особин: ♀ WWX^BX^b (гамети: WX^b), ♂ wwX^BY (гамети: wX^B та wY).

Складаємо схему схрещування для F_1 :

♀ \ ♂	wX^B	wY
WX^b	WwX^BX^b самки, нормальні крила, сіре тіло	WWX^bY самці, нормальні крила, жовте тіло

Всі самки мають нормальні крила та сіре забарвлення тіла, генотип: WwX^BX^b . Усі самці – нормальні крила та жовте тіло, генотип: WwX^bY . Припущення є правильним.

Задачі для самостійного розв'язування

Задача 1. Дальтонізм — форма кольорової сліпоти, що успадковується як рецесивна ознака. Ген дальтонізму міститься у X-хромосомі й виявляється, як правило, у чоловіків. Тимофій, який є сином дальтоніка, взяв шлюб з донькою дальтоніка Мар'яною. Обидва нормально розрізняють кольори. Вкажіть генотипи подружжя. Визначте генотипи та фенотипи їхніх нащадків у F_1 .

Задача 2. Ярослав, як і його батько, є дальтоніком, а його мати розрізняє кольори нормально. Чи можна стверджувати, що син успадкував цю ознаку від батька? Чи можуть у цій сім'ї народитися доньки, що не розрізнятимуть кольори?

Задача 3. Месьє Бретон, дальтонік, узяв шлюб з мадемуазель Софі, яка нормально розрізняє кольори. У цьому шлюбі народилося двоє дітей: син-дальтонік і донька з нормальним зором. Яким є генотип мадам Бретон?

Задача 4. Чи можуть у Алекса, який є гемофіліком, і здорової жінки Джулії, батько якої був гемофіліком, народитися здорові діти?

Задача 5. Чи може у здорових батьків народитися сингемофілік? Якими мають бути генотипи сина та батьків?

Задача 6. Яким може бути зір у дітей від батька та матері, що нормально розрізняють кольори, якщо відомо, що обидва дідусі були дальтоніками?

Задача 7. Павло, який має сірі очі й нормальний зір, одружився з Тетяною – жінкою з карими очима та нормальним зором (у всіх її родичів були карі очі, а її брат був дальтоніком). Якими можуть бути діти від цього шлюбу?

Задача 8. Остап – дальтонік, хворий на глухоту, взяв шлюб з Марічкою, яка мала нормальний зір та слух. У них народилися глухий син-дальтонік і дочка-дальтонік з нормальним слухом. Чи можливе народження в цій родині дочки з обома захворюваннями, якщо глухота є рецесивною ознакою, що не зчеплена зі статтю?

Задача 9. Здоровий чоловік Михайло бере шлюб зі здоровою жінкою Євгенією. У них народжується п'ятеро синів. Двоє з них є дальтоніками, але їхня кров нормально зсідається. Двоє хворі на гемофілію, але нормально бачать. І один страждає на дальтонізм і гемофілію. З'ясуйте, чому жінка має синів трьох типів, і визначте генотипи всіх осіб у родині. Які ще генотипи та фенотипи дітей можливі в цій родині?

Задача 10. У молодих курчат немає помітних зовнішніх ознак статі. Розрізнення статі курчат у цьому віці має практичне значення: курочки, яких вирощують для отримання яєць, мають отримувати певне харчування. Півників, яких вирощують на м'ясо, утримують в інших умовах. Чи можливо на птахофермі «Золоте курча» для розрізнення статі використати ту обставину, що ген, який визначає чорне або рябе забарвлення, міститься в Z-хромосомі, а рябе забарвлення – це домінантна ознака? Різниця в забарвленні курчат виявляється одразу.

Контрольні питання

1. Що таке зчеплені зі статтю ознаки, і як вони успадковуються?
2. Яка стать у людини є гомогаметною, а яка – гетерогаметною? Які хромосоми при цьому присутні?
3. Яким чином визначається стать майбутнього організму під час запліднення у людини?
4. Чим відрізняються Х- та Y-хромосоми за розміром та набором генів?
5. Що таке поліморфні ділянки в Х- і Y-хромосомах, і яке значення вони мають для успадкування ознак?
6. Як успадковуються гени, зчеплені з Y-хромосомою, і які приклади таких генів?
7. Як передаються гени, зчеплені з Х-хромосомою, у випадку, якщо вони є рецесивними?
8. Які закономірності характерні для успадкування генів, локалізованих у гомологічних ділянках Х- та Y-хромосом?
9. Що таке реципрокні схрещування і яке їх значення у вивченні успадкування ознак?
10. Що таке крис-крос (хрест-нахрест) успадкування, і як воно відбувається?
11. Як слід записувати генотипи у схемах схрещування для ознак, зчеплених зі статтю?
12. Які типи хромосомного визначення статі існують і у яких організмів гомогаметною є жіноча стать, а у яких – чоловіча?
13. Як передаються гени, що локалізовані в Y-хромосомі, і хто їх успадковує?
14. Яким чином формуються гамети у гомогаметної та гетерогаметної статі і які особливості успадкування при цьому виникають?

ЧАСТИНА 3. НЕСПАДКОВА (МОДИФІКАЦІЙНА) МІНЛИВІСТЬ

Дослідження модифікаційної мінливості має велике значення для біотехнологів, оскільки дозволяє оцінити реакцію організмів на зміну факторів середовища. У селекції рослин та тварин, наприклад, вивчення норми реакції на агротехнічні умови дозволяє створювати сорти та породи, стійкі до різноманітних екологічних факторів. У ході наступних лабораторних робіт здобувачі вивчатимуть межі модифікаційної мінливості, її причини та значення для адаптації організмів до змін довкілля, а також засвоять методи фіксації таких змін та їхньої кількісної оцінки.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №11. Біометричне вивчення дискретного та безперервного варіювання ознак у рослин і тварин. Вивчення безперервної та дискретної мінливості у рослинних об'єктів

Мета: ознайомитися з поняттям модифікаційної мінливості і норми реакції, сформувати навички біометричного вивчення модифікаційної мінливості.

Теоретичні відомості

Багато відмінностей між особинами одного виду знаходяться у значній залежності від умов навколишнього середовища. Навіть при цілком тотожному генотипі два організми можуть бути фенотипово несхожими, якщо вони протягом свого розвитку по-різному харчувалися, знаходилися при різній температурі або вологості, хворіли на різні хвороби. Такі фенотипові розходження, що викликаються зовнішніми факторами в однакових у спадковому відношенні організмів, називаються **модифікаціями**, а мінливість, яка при цьому виникає, отримала назву **модифікаційної**.

Розмах модифікаційної мінливості, тобто амплітуда коливання ознаки, залежить від **норми реакції** організму. Це означає, що ступінь варіювання кожної ознаки знаходиться в певних межах, які визначаються спадковістю. Різні ознаки мають різну норму реакції. Наприклад, у великої рогатої худоби колір шерсті не змінюється за жодних умов, тобто має *однозначну норму реакції*. Водночас досить *широку норму реакції* має молочна продуктивність, яка значною мірою залежить від умов годівлі.

Норму реакції спостерігати найкраще в організмів з однаковим генотипом, наприклад у рослин, що вегетативно розмножуються, і однопольових близнюків. У цьому випадку можна виявити норму реакції генотипу в найбільш «чистому» вигляді.

Знання норми реакції має важливе практичне значення. У селекції, яка спрямована на створення нових або вдосконалення існуючих форм корисних людині організмів, постійно виникає потреба вивчити реакцію тих або інших сортів вирощуваної рослини на якість ґрунту, терміни посіву, наявність добрив тощо. Чим ширша норма реакції рослин даного сорту, тим більша можливість вирощування його в різноманітних ґрунтово-кліматичних умовах.

Залежно від характеру ознаки, що варіює, розрізняють мінливість **якісну** і **кількісну**. При якісній мінливості різниця між об'єктами виражена якісним показником, який характерний для одних об'єктів і не характерний для інших. Кількість об'єктів з певною якісною ознакою звичайно виражають у відсотках від загальної кількості сукупності.

Кількісна мінливість характеризується різним ступенем прояву ознаки. Розрізняють два види кількісної мінливості: **переривчасту**, або дискретну, і **безперервну**. При *переривчастій* мінливості ознака виражається в цілих абстрактних числах, між якими немає переходів (кількість насінин, кількість листків тощо). При *безперервній* мінливості варіююча ознака виражається у конкретних числах (см, мм, г, мг тощо), між якими можливі будь-які переходи.

При вивченні закономірностей модифікаційної мінливості використовується **статистичний (біометричний) метод**. При використанні цього методу необхідно дотримуватися таких умов:

- ✓ матеріал повинен бути генетично однорідним;
- ✓ виміри і підрахунки повинні проводитися з однаковою точністю;
- ✓ спостереження повинні бути багатократними, тобто аналізувати слід велике число рослин.

Усі рослини, що беруть участь у досліді, називають **генеральною сукупністю**. Якщо таких рослин дуже багато і дослідити їх важко чи практично

неможливо, беруть частину рослин генеральної сукупності – **вибірку**, за якою дається загальна характеристика (вибірковий метод). Дані ознак одержані за вибірками, систематизують, розміщують у **варіаційні ряди**.

Складання варіаційного ряду. Щоб одержати уявлення про розмах модифікаційної мінливості досліджуваної ознаки (наприклад, числа колосків у суцвітті пшениці), необхідно скласти варіаційний ряд. З цією метою в головному колосі кожної із рослин підраховують число колосків і одержують варіанти – можливі значення досліджуваної ознаки, що позначають літерою x .

20, 18, 17, 22, 19, 19, 20, 21, 20, 21, 18, 19, 17, 22, 21, 18, 18, 20, 19, 21, 21, 19, 20, 18, 21, 20, 19, 19, 17, 20, 22, 18, 21, 19, 18, 21, 20, 18, 19, 18, 20, 21, 21, 18, 19, 21, 18, 20, 22, 17, 19, 20, 19, 18, 21, 20, 20, 19, 17, 22, 19, 20, 18, 19, 19, 20, 20, 17, 19, 21, 20, 19, 20, 18, 22, 20, 19, 19, 20, 20, 20, 17, 19, 18, 21, 20, 19, 19, 19, 20, 17, 18, 22, 18, 20, 20, 19, 20, 19, 20.

У наведеному прикладі число колосків варіює від 17 до 22, у зростаючому порядку вони записані в табл. 6. Кількість повторень кожного значення ознаки даного варіаційного ряду називається **частотою** (f). Сума всіх частот дорівнює числу об'єктів у варіаційному ряді, позначають n . Варіаційний ряд являє собою ряд даних, у якому наведені значення варіюючої ознаки у порядку зростання або убутання, а також відповідні їхні частоти. Частіше зустрічаються варіанти, що знаходяться усередині ряду.

Таблиця 6. Варіаційний ряд кількості колосків у колосі пшениці

Кількість колосків у колосі (варіанти x)	17	18	19	20	21	22
Кількість колосів (частота f)	8	17	26	28	14	7

Побудова кривої варіаційного ряду: на горизонтальній осі (осі абсцис дискретного варіювання) відкладають у певному масштабі можливі значення варіюючої ознаки (x) у вигляді точок, з яких ставлять пунктиром перпендикуляри (ординати), довжина яких виражає частоти f . Верхні вільні кінці ординат з'єднують лінією – варіаційною кривою (рис. 21).

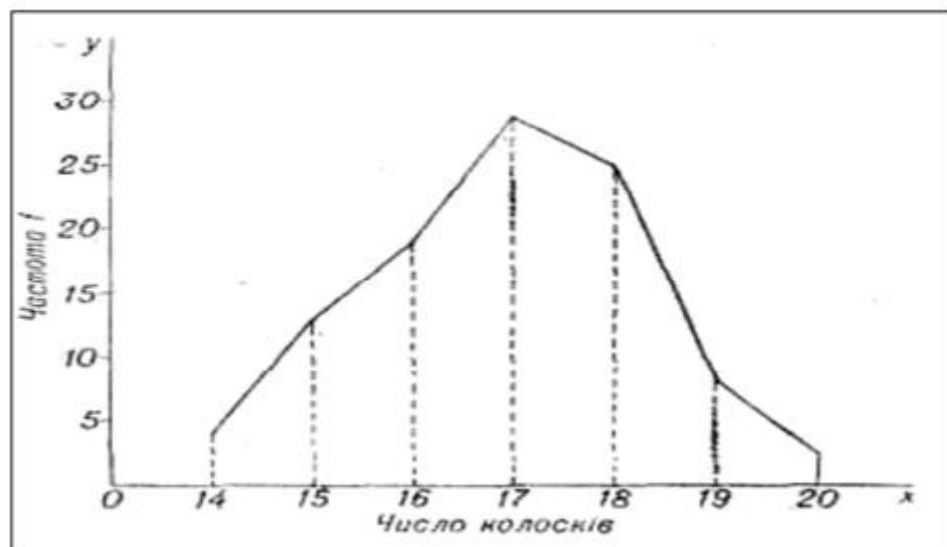


Рис. 21. Крива варіювання числа колосків у колосі пшениці

Маючи варіаційний ряд (наприклад, кількості колосків у колосі), можна одержати достатньо повну характеристику досліджуваної ознаки. Для цього необхідно обчислити такі статистичні показники: середнє арифметичне, стандартне відхилення (або середнє квадратичне відхилення), коефіцієнт варіації або мінливості, похибку середнього арифметичного.

Середнє арифметичне (М) обчислюють за формулою:

$$M = \frac{\sum fx}{n},$$

де f – частота зустрічності варіанта; x – варіанти; Σ – знак суми; n – сума частот, тобто загальний обсяг вибірки.

Для підрахунків користуються табл. 7.

Таблиця 7. Обчислення М числа колосків у суцвітті пшениці

Кількість колосків у колосі (x)	Число колосів (частоти f)	fx	x-M	(x-M) ²	(x-M) ² f
17	8	136	-2,44	5,95	47,6
18	17	306	-1,44	2,07	35,19
19	26	494	-0,44	0,19	4,94
20	28	560	0,56	0,31	8,68
21	14	294	1,56	2,43	34,02
22	7	154	2,56	6,55	45,85
		1944			176,28
n = $\sum f$ = 100					

Для характеристики мінливості використовують **стандартне (середнє квадратичне) відхилення**, позначається літерою δ і виражається в тих самих одиницях, що і середнє арифметичне. Обчислюють за формулою:

$$\delta = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - M)^2 f}{n - 1}}$$

У нашому прикладі $\pm \sqrt{\frac{176,28}{99}} = \pm 1,34$ колоска. Кожний колос у середньому відрізняється від **М** на 1,34 колоска. Стандартне відхилення іноді називають помилкою окремого варіанта, тому що, знаючи значення **М** і δ для даного варіаційного ряду, можна визначити чи належить дана особина до цього ряду. Вона може належати до даного ряду, якщо її відхилення від середнього арифметичного не перевищує 3δ . В аналізованому прикладі $M=19,4$, $\delta=1,34$, найбільше значення варіанта дорівнює 22, найменше – 17. Відхилення складе: $22-19,4=2,6$; $17-19,4=-2,4$. Оскільки відхилення найбільшого і найменшого варіантів від середнього арифметичного не перевищують 3δ , то усі особини належать до даного варіаційного ряду. Отже, межі модифікаційної мінливості визначаються $M \pm 3\delta$.

Для порівняння варіювання ознак різної розмірності, наприклад, кількості зерен у колосі і довжини стебла рослин або мінливості однієї і тієї самої ознаки

в різних сортів, а також, щоб мати можливість судити про ступінь вирівняності досліджуваного матеріалу, обчислюють **коефіцієнт варіації (V)** за формулою:

$$V = \frac{\delta}{M} 100\%$$

У нашому прикладі $V = \frac{1,34}{19,4} 100 = 6,9\%$.

Мінливість варіюючої ознаки у цьому випадку незначна, тому що коефіцієнт варіації менше 10%. Прийнято вважати мінливість середньою, якщо $20\% > V > 10\%$ і великою, якщо $V > 20\%$. Щоб порівняти розмах мінливості різноманітних ознак у рослин того самого сорту, варто обчислити стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (V) для цих ознак. Наприклад, для трьох ознак рослин пшениці M , δ і V мають такі значення:

Ознаки	M	δ	V, %
Вага зернівок з однієї рослини (г)	3,2	1,4	43,8
Кількість зернівок у головному колосі	41	8,0	19,5
Кількість колосків у головному колосі	19,4	1,34	6,9

Найменше варіює число колосків у головному колосі ($V=6,9\%$). Найбільш мінлива ознака – вага зернівок з однієї рослини ($V=43,8\%$).

Похибка середнього арифметичного (m) показує, якої припустилися похибки, вважаючи, що M вибірки дорівнює M генеральної сукупності.

m обчислюють за формулою:

$$m = \frac{\delta}{\sqrt{n}}$$

У нашому прикладі $m = \frac{1,34}{\sqrt{100}} = 0,13$.

Після обчислення m можемо сказати, що сорт пшениці має середнє число колосків $19,4 \pm 0,13$. Якщо виходити з того, що розмах мінливості середніх арифметичних вибірок підпорядковується правилу 3δ , то аналізований сорт має середнє число колосків у колосі $19,4 \pm 3 \times 0,13$ колоска, тобто від 19,0 до 19,8 колоска. Отримані дані заносять у табл. 8.

Таблиця 8. Мінливість елементів структури врожаю пшениці

№, п/п	Культура, сорт	Ознаки, що вивчаються	Статистичні показники				
			M	δ	V	m	$M \pm m$
1	Пшениця озима	Число колосків	19,4	1,34	6,9	0,13	$19,4 \pm 0,13$

Практична частина

Матеріали: колоски ячменю чи пшениці, листки дуба, берези, вишні, яблуні, горобини, робінії білої.

Обладнання: лінійка.

Хід роботи

Завдання 1. Провести статистичне опрацювання запропонованого матеріалу. Для дослідження дискретного варіювання підрахувати кількість колосків у суцвітті пшениці чи ячменю, кількість лопатей у листках дуба чи простих листків у складному листку горобини, чи робінії білої. Для вивчення безперервної мінливості виміряти довжину/ширину листків вишні або берези.

Завдання 2. Скласти варіаційний ряд та побудувати варіаційну криву для однієї із зазначених ознак.

Завдання 3. Обчислити середнє арифметичне (M), стандартне відхилення (δ), коефіцієнт варіації (V) і помилку середнього арифметичного (m).

Контрольні питання

1. Що таке модифікаційна мінливість і які фактори впливають на її прояв?
2. Що означає поняття "норма реакції" організму і як вона проявляється у різних організмів?
3. Як можна спостерігати норму реакції у генетично однорідних організмів?
4. У чому полягає відмінність між якісною і кількісною мінливістю?
5. Які є види кількісної мінливості, і які приклади ознак для кожного виду можна навести?
6. Що таке варіаційний ряд і для чого він використовується у біометричному аналізі?
7. Як будується варіаційна крива і що вона відображає?
8. Що таке стандартне відхилення і як його можна обчислити?
9. Як обчислюється коефіцієнт варіації, і що він показує щодо ступеня мінливості ознак?
10. Яке значення має похибка середнього арифметичного в біометричних дослідженнях, і як її визначити?

ЧАСТИНА 4. МУТАЦІЇ, ХРОМОСОМНІ АБЕРАЦІЇ ТА ПЕРЕБУДОВИ

Наступні лабораторні роботи присвячені вивченню ключових механізмів мутаційної мінливості, які відіграють важливу роль у біологічних і еволюційних процесах. Мутації – це зміни генетичного матеріалу, які можуть виникати спонтанно або бути індукованими зовнішніми факторами, і мають велике значення для розуміння спадковості та розвитку генетичних захворювань. Хромосомні аберації, включаючи делеції, дуплікації, інверсії та транслокації, впливають на функціонування геному і є важливими для досліджень у галузі генетики, біотехнології та медицини.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №12. Дослідження мутаційної мінливості на прикладі *D. melanogaster* L. Види тератологій, індукуючі фактори

Мета: ознайомитись із суттю та особливостями мутаційної мінливості; розглянути можливі мутації дрозофіл, у тому числі індукованих

фізичними мутагенами; розвинути вміння порівнювати біологічні об'єкти та робити відповідні висновки й узагальнення.

Теоретичні відомості

Мутаційна мінливість – це результат появи **мутацій** – відносно стійких структурних змін нуклеїнових кислот, що призводять до виникнення нових алелей генів і навіть більш істотних перебудов у генетичному апараті клітин. Ці перебудови можуть здійснюватися на рівні хромосом та інших носіїв генетичної інформації. В усіх випадках вони повинні бути незворотними і передаватись із покоління у покоління. За вченням де Фріза, мутація – це стрибкоподібна, переривчаста зміна спадкової ознаки.

Згідно із сьогоденними уявленнями мутації – якісні та кількісні зміни генетичного матеріалу певного організму. Організми з мутаційними змінами названі **мутантами**. Розрізняють мутації *генні* або *точкові*, що цитологічно не виявляються, *внутрішньо-* і *міжхромосомні*, при яких спостерігаються перебудови хромосом, і мутації, пов'язані зі зміною числа хромосом (поліплоїдія).

Внутрішньохромосомні перебудови поділяють на *делеції*, *дуплікації* та *інверсії*. Делецією називають утрату ділянки хромосоми. Якщо це кінцева ділянка, то така делеція називається *дефієнсі*. Дуплікація – це подвоєння певної ділянки хромосоми. Інверсія – це зміна на 180° порядку розташування групи генів у хромосомі. Делеції та дуплікації призводять до змін дози (кількості копій) алельних генів або незначущих послідовностей ДНК у геномі, інверсія – до зміни локалізації генів. До міжхромосомних перебудов належать *транслокації* – реципрокні обміни між негомологічними хромосомами, і *транспозиції* – неріципрокні переміщення генетичного матеріалу між хромосомами або в межах однієї хромосоми.

Мутації, що виникають без видимих причин або зусиль з боку експериментатора називають *спонтанними*, а ті, що виникли в результаті якогось впливу – *індукованими*. Фактори, що викликають мутації називають **мутагенами**. Як мутагени використовують фізичний вплив (іонізуючі випромінювання, ультрафіолетові промені й ін.) і вплив хімічними речовинами (етиленімін, диетилсульфат, етилметансульфонат і ін.). У результаті впливу мутагенами можна одержувати різноманітний вихідний матеріал для створення сортів відбором і гібридизацією. Для успішного одержання мутацій важливо підібрати оптимальні для процесу мутування умови (вид мутагену, його доза, фізіологічний стан організму й т. д.). З'ясовано, що більш високі дози мутагенів (як фізичних, так і хімічних) знижують частку господарсько-корисних мутацій.

Мутації – це якісні та структурні зміни генетичного матеріалу, які передаються від покоління до покоління та виникають раптово. Основні положення мутаційної теорії Г. де Фріза (1901 р.): мутації виникають раптово як дискретні зміни ознак; нові форми стійкі; на відміну від неспадкових змін, мутації не утворюють неперервних рядів, не групуються навколо якого-небудь середнього типу і представляють собою якісні зміни; мутації проявляються по-різному і можуть бути як корисними, так і шкідливими; вірогідність виявлення

мутацій залежить від числа досліджуваних особин; подібні мутації можуть виникати неодноразово. Види мутацій дрозофіл (табл. 9):

Таблиця 9. Типи мутацій у дрозофіли

Назва мутації	Фенотипічний прояв	Вид мутації
Bar	Вузькі очі	Хромосомна перебудова – дуплікація
White	Білі очі	Генна мутація
Black	Чорне тіло	Генна мутація
Yellow	Жовте тіло	Генна мутація
Curly	Загнуті наверх крила	Генна мутація
Vestigial	Зачаткові крила	Генна мутація

Мутагени – фізичні й хімічні чинники, що спричинюють мутації. За походженням: ендогенні (утворюються в процесі життєдіяльності організму) та екзогенні (усі інші фактори). За природою виникнення мутагени класифікують на хімічні, біологічні та фізичні. Хімічні мутагени: окисники та відновники (нітрати, нітрити); алкілюючі реагенти; пестициди; деякі харчові домішки (ароматичні вуглеводні); продукти переробки нафти; органічні розчинники; лікарські препарати (препарати ртуті, імунодепресанти). Біологічні мутагени: специфічні послідовності ДНК – деякі віруси (кору, краснухи); продукти обміну речовин (продукти окислення ліпідів); антигени деяких мікроорганізмів. Фізичні мутагени: випромінювання; радіоактивний розпад; надмірно висока/низька температура. Електромагнітне випромінювання при постійній дії індукцією понад 5 мкТл зумовлює фенотипний прояв таких мутацій дрозофіли (рис. 22): деформації частин тіла; зміна пігментації тіла та розмірів організму або складових частин; заміна одного фізіологічного органу іншим.



Рис. 22. Тератології *D. melanogaster* L

а – мутація F_1 – деформація лівого крила самки (мікроскоп 56^x, фотоапарат 3^x, програма 1,5^x); *б* – мутація F_1 – деформація тіла самки (коротке черевце) (мікроскоп 32^x, фотоапарат 3^x, програма 1,5^x); *в* – мутація F_2 – недорозвинене зачаткове крило (мікроскоп 56^x, фотоапарат 3^x, програма 1,5^x); *г* – мутація F_2 – деформація обох крил самки (мікроскоп 48^x,

фотоапарат 3^x, програма 1,5^x); **д** – мутація F_3 – деформація правого крила та завужене черевце самця (мікроскоп 32^x, фотоапарат 3^x, програма 1,5^x); **е** – мутація F_3 – деформація правого крила самця (мікроскоп 32^x, фотоапарат 4^x, програма 2^x); **є** – мутація F_3 – відсутність пігментації тіла (самка-альбінос) (мікроскоп 32^x, фотоапарат 4^x, програма 2^x); **ж** – мутація F_3 – деформація форми та розміщення крил і завужена форма черевця самочки (мікроскоп 32^x, фотоапарат 5^x, програма 1,5^x); **з** – мутація F_3 – деформація форми крил і тіла (мікроскоп 32^x, фотоапарат 5^x, програма 1,5^x).

Практична частина

Матеріали і реактиви: мікропрепарати мутантних та нормальних форм дрозофіл, живі дрозофіли з чистої лінії, агар, манна крупа, цукор, дріжджі, оцет, ампіцилін, вода, ефір.

Обладнання: мікроскоп, електроплитка, електродвигуни промислової частоти, вимірювач шуму DT-805, тестер електромагнітного поля – магнітометр ТМ-191, скляна колба, пробірки, штативи для пробірок.

Хід роботи (1-е заняття)

Завдання 1. Розгляньте мікропрепарати мутантних та нормальних форм дрозофіл. Зверніть увагу на такі фенотипні ознаки як забарвлення очей, колір тіла, наявність крил. Зарисувати основні види мутацій.

Завдання 2. У пробірки на готове агаризоване середовище розселити по дві особини чоловічої та жіночої статі *D. melanogaster* L. чистої лінії.

Завдання 3. Пробірки з тест-об'єктами розташувати у вказаних точках зони дії електромагнітного поля та поставити контроль.

Завдання 4. Виконати вимірювання та записати одержані результати:

- за допомогою ртутного термометра визначити температуру (у °C);
- установити гучність шуму вимірювачем шуму DT-805;
- визначити значення індукції магнітного поля наявного електродвигуна (в експериментальних точках) за допомогою магнітометра ТМ-191.

Хід роботи (2-е заняття)

Завдання 1. Розглянути фотографії тератологій *D. melanogaster* L., зумовлених дією електромагнітного забруднення.

Завдання 2. Дослідити наявність фенотипного прояву мутацій у тестоб'єктів та контрольній групі. Під мікроскопом розглянути наявні тератології, зробити фотографії та вклеїти їх до лабораторного журналу.

Завдання 3. Описати виявлені мутації, зазначивши назву мутації, її фенотипний прояв, можливий тип успадкування.

Контрольні питання

1. Що таке мутаційна мінливість?
2. Яке визначення мутації згідно з вченням Г. де Фріза?
3. Які основні типи мутацій ви можете назвати?
4. Чим відрізняються генні (точкові) мутації від хромосомних перебудов?
5. Що таке делеція, дуплікація та інверсія? Як вони впливають на структуру хромосом?

6. Що таке транслокації та транспозиції? Які їхні особливості?
7. Які фактори викликають мутації? Як їх класифікують за походженням?
8. Які приклади фізичних, хімічних та біологічних мутагенів ви можете назвати?
9. У чому полягає відмінність між спонтанними та індукованими мутаціями?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №13. Аналіз частоти різних типів аберацій хромосом у меристематичних клітинах корінців цибулі-батуну (*Alium fistulosum*)

Мета: дослідити частоти різних типів аберацій хромосом в меристематичних клітинах корінців цибулі батуну (*A. fistulosum* L.)

Теоретичні відомості

Аналіз хромосомних перебудов в меристематичних клітинах рослин широко використовується для оцінки генотоксичних впливів факторів довкілля та в експериментальному мутагенезі при вивченні мутагенних (чи антимутагенних) властивостей фізичних та хімічних факторів. Аберації хромосом підраховують на стадіях метафази, анафази або ранньої телофази мітозу. Метафазний аналіз є більш точним, але він займає багато часу, потребує досконалого знання морфології хромосом досліджуваного об'єкту та високої кваліфікації дослідника, тому частіше в експериментах застосовують простіший ана-телофазний метод. При цьому, детально розглянути морфологію хромосом неможливо і можна побачити лише невелику кількість типів аберації: ацентричні фрагменти, які залишаються в екваторіальній площині клітини та хроматинові тяжі між ана-телофазними групами хромосом – мости (рис. 23).



Рис. 23. Приклади хромосомних аберацій, які можна спостерігати при ана-телофазному методі

При аналізі препаратів клітини з абераціями відносять до наступних типів: клітини з одинарними фрагментами (їх умовно позначають знаком $-$), з парними фрагментами ($=$), з одинарними хроматидними мостами ($\sqcap$), з хромосомними подвійними мостами ($\sqcup$). Клітини з мостами та фрагментами відносять до різних типів та позначають таким чином: $[-$, $\sqcup-$, $\sqcup=$. Якщо в клітині є декілька типів порушень, то таку клітину відносять до

мультиаберантних. Клітини, в яких не вдається чітко визначити тип аберації відносять до класу клітин з невизначеними абераціями.

Практична частина

Матеріали та обладнання: готові препарати корінців цибулі-батуна (*A. fistulosum* L.)

Обладнання: мікроскопи.

Хід роботи

Завдання 1. Проаналізувати препарати корінців цибулі батуна та визначити частоти аберацій різних типів.

1. На препаратах під мікроскопом знайти групу меристематичних клітин.
2. Підрахувати кількість клітин з нормальними анафазами і телофазами та кількість клітин з перебудовами.
3. Визначити тип аберацій та заповнити таблицю.
4. Підрахувати загальний відсоток аномальних клітин та клітин з абераціями кожного типу і записати у таблицю нижче.

Кількість клітин на стадіях анафази та телофази										
без аберацій	з одинарними фрагментами (-)	з подвійними фрагментами (=)	з мостами						НА	МА
			хроматидними			хромосомними				
			[	[-	[=	⌘	⌘ -	⌘ =		

Примітка: НА – клітини з невизначеними абераціями; МА – мультиаберантні клітини.

Контрольні питання

1. Що таке хромосомні аберації та в яких клітинах рослин вони найчастіше аналізуються?
2. Як використовуються аналіз хромосомних перебудов для оцінки генотоксичних впливів довкілля?
3. Які етапи мітозу зазвичай використовуються для підрахунку хромосомних аберацій, і чому?
4. Чому метафазний аналіз вважається точнішим, ніж ана-телофазний метод?
5. Які типи аберацій хромосом можуть бути виявлені при використанні ана-телофазного методу?
6. Що таке ацентричні фрагменти і як вони проявляються в клітині?
7. Які хромосомні аберації відносять до типу мостів і як вони виглядають?
8. Як позначаються різні типи клітин з абераціями, і що означають ці позначення?
9. Що таке мультиаберантні клітини і як їх визначають у препаратах?

МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА

ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №1. Вступне заняття

Мета: ознайомитися з основними правилами техніки безпеки в лабораторії; засвоїти принципи роботи з основним лабораторним обладнанням, а також навчитися користуватися лабораторними дозаторами та проводити розрахунки для приготування одно- та багатокомпонентних розчинів.

Теоретичні відомості

Лабораторія молекулярної генетики: принципи організації роботи. Лабораторія молекулярної генетики є складним і спеціалізованим середовищем для проведення досліджень на молекулярному рівні, що включає роботу з нуклеїновими кислотами (ДНК, РНК) та білками. Ефективна організація роботи лабораторії залежить від чіткого планування, належного обладнання та дотримання суворих правил техніки безпеки.

Чітка організація робочих зон. Лабораторія молекулярної генетики розділена на кілька спеціалізованих зон для проведення різних типів робіт. Така організація дозволяє уникнути перехресної контамінації зразків і забезпечує безпечне та ефективне виконання експериментів.

- **Зона для стерильних операцій.** Тут проводяться роботи з живими культурами клітин, зокрема бактеріями або еукаріотичними клітинами. Для цього використовуються ламінарні бокси, які забезпечують стерильне середовище та захищають зразки від контамінації.

- **Зона для приготування розчинів.** У цій зоні готуються всі розчини та реактиви, які будуть використовуватися в експериментах. Важливою умовою є стерильність та точність вимірювань під час приготування розчинів.

- **Зона для роботи з хімічними реактивами.** Тут зберігаються і використовуються хімічні речовини, включаючи токсичні або агресивні сполуки, такі як фенол, хлороформ, етанол. Використовується витяжна шафа для забезпечення безпеки працівників.

- **Зона для роботи з обладнанням.** Обладнання, яке використовується для аналізу ДНК, РНК та білків (спектрофотометри, центрифуги, термоциклери), повинно розташовуватися в спеціально відведених місцях, з дотриманням всіх правил електробезпеки.

Стерильність і безпека. Стерильність є одним з ключових факторів у роботі з нуклеїновими кислотами та білками. Будь-яка контамінація може суттєво вплинути на результати експериментів, особливо при роботі з ДНК або РНК, де навіть малі домішки можуть порушити точність аналізу.

- **Ламінарні бокси.** Важливі для створення стерильного робочого середовища. У таких боксах проводяться всі маніпуляції, пов'язані з клітинними культурами та зразками ДНК/РНК.

- **Стерилізація інструментів.** Використання автоклавів для стерилізації обладнання та розчинів є обов'язковим перед будь-якими експериментами. Усі інструменти повинні бути стерилізовані перед використанням.

- **Стерильні розчини.** Вода та буфери, що використовуються у молекулярно-генетичних дослідженнях, часто обробляються діетилпірокарбонатом (англ. diethyl pyrocarbonate, DEPC), щоб інактивувати РНКазу.

Організація роботи. Правильна організація та планування роботи є критично важливими для забезпечення точності та ефективності експериментів:

- **Планування експериментів.** Кожен експеримент має бути ретельно спланований, з урахуванням підготовки необхідних матеріалів, реактивів та обладнання.

- **Ведення лабораторного журналу.** Усі результати, включаючи дані про приготування розчинів, параметри роботи обладнання, а також результати експериментів, повинні фіксуватися в лабораторному журналі для забезпечення точності та можливості відтворення експериментів у майбутньому.

Техніка безпеки. Безпека у лабораторії молекулярної генетики є пріоритетом, оскільки робота передбачає взаємодію з потенційно небезпечними хімічними речовинами, біологічними агентами та складним обладнанням.

Засоби індивідуального захисту. Робота в лабораторії потребує використання індивідуальних засобів захисту, таких як рукавички, лабораторні халати, захисні окуляри та маски. Це мінімізує ризики при контакті з хімічними речовинами і біологічними агентами.

Хімічні реагенти. При роботі з токсичними хімічними речовинами, такими як фенол і хлороформ, необхідно використовувати витяжні шафи, оскільки ці речовини можуть бути шкідливими при вдиханні або контакті зі шкірою.

Безпека обладнання. При роботі з центрифугами, термоциклерами, електрофорезними установками необхідно ознайомитися з інструкціями до приладів і дотримуватися правил безпеки, щоб уникнути травм або поломок обладнання.

Лабораторне обладнання. У сучасній лабораторії молекулярної генетики використовують високотехнологічне обладнання для виконання різних видів робіт:

Центрифуга. Центрифуги використовуються для розділення компонентів клітин або молекулярних сумішей (ДНК, РНК, білки). Їх використовують при підготовці зразків до наступних етапів експерименту, таких як виділення ДНК або очищення білків. Сучасні центрифуги дозволяють працювати при різних швидкостях (до 30,000 об/хв) і температурі (від 4°C).

Термоциклер. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є основним методом для ампліфікації ДНК. Термоциклер виконує циклічне нагрівання та охолодження зразків для проведення ПЛР, що дозволяє створювати копії фрагментів ДНК для подальшого аналізу.

Система для електрофорезу. Використовується для розділення молекул ДНК, РНК або білків на основі їх розмірів та заряду. Після електрофорезу

молекули можна візуалізувати, використовуючи барвники або флуоресцентні мітки.

Спектрофотометр. Спектрофотометри використовуються для кількісного визначення ДНК, РНК або білків шляхом вимірювання абсорбції УФ-світла на довжинах хвиль 260 нм (ДНК/РНК) і 280 нм (білки). Наноспектрофотометри, такі як NanoDrop™, дозволяють працювати з дуже малими об'ємами зразків (1-2 мкл), що спрощує та прискорює роботу.

Флуориметр. Цей прилад вимірює рівень флуоресценції зразків, що дозволяє більш чутливо визначати концентрації нуклеїнових кислот або білків. Флуориметри забезпечують більш точне вимірювання концентрацій, особливо при низьких концентраціях.

Ламінарний бокс. Забезпечує стерильне робоче середовище для маніпуляцій з клітинними культурами або зразками ДНК/РНК. Створює потік стерильного повітря, який захищає зразки від контамінації.

Автоклав. Використовується для стерилізації обладнання, розчинів та середовищ під високим тиском та температурою (121°C), що дозволяє ефективно знищувати всі види мікроорганізмів.

Вортекс. Вортекс використовується для інтенсивного перемішування рідин, що забезпечує рівномірне змішування компонентів у розчинах або суспензіях.

Приготування розчинів. Правильне приготування розчинів є критично важливим для точного виконання молекулярно-генетичних експериментів.

Однокомпонентні розчини. Ці розчини містять одну хімічну речовину. Для їх приготування використовується формула:

$$m = C \times V \times M$$

де m – маса речовини (г), C – концентрація розчину (моль/л), V – об'єм розчину (л), M – молярна маса (г/моль).

Багатокомпонентні розчини. Включають кілька речовин. Для приготування такого розчину необхідно розрахувати масу кожного компоненту окремо на основі його концентрації та загального об'єму розчину.

Практична частина

Матеріали і реактиви: дистильована вода; хімічні речовини для приготування розчинів, такі як NaCl (хлорид натрію), Tris-Cl (гідрохлорид трис(гідроксиметил)аміноетану), ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота); індикатори та етикетки для маркування ємностей з розчинами; 70% етанол для дезінфекції робочих поверхонь та інструментів.

Обладнання: центрифуга, інкубатор, термоциклер, мікроскопи, витяжна шафа, бокси біобезпеки, піпетки, пробірки, колби, мірні циліндри, автоклав, УФ-стерилізатор, предметні та накривні скельця, штативи для пробірок і піпеток, лабораторні рукавички, захисні окуляри, маски, аптечка першої допомоги, вогнегасники.

Хід роботи

Завдання 1. Ознайомитися з лабораторією.

Під керівництвом викладача здійсніть огляд лабораторного обладнання та робочого простору.

- Ознайомтеся з основним обладнанням лабораторії. Визначте місця розташування таких приладів, як центрифуга, інкубатор, термоциклер, мікроскопи та витяжна шафа.

- Ознайомтеся з правилами використання боксових систем біобезпеки для роботи з небезпечними речовинами та біологічними зразками.

- Знайдіть місця розташування вогнегасників, аптечки першої допомоги, аварійних виходів.

- Ознайомтеся з розташуванням систем пожежної безпеки та сигналізації.

Завдання 2. Засвоїти техніку безпеки.

- Ознайомтеся з основними вимогами техніки безпеки під час роботи з біологічним матеріалом та обладнанням.

- Ознайомтеся з правилами поведінки з небезпечними речовинами та біологічними зразками.

- Ознайомтеся з правилами поведінки у разі аварійних ситуацій (витоки речовин, розлив рідин, аварійне вимкнення обладнання).

Завдання 3. Відпрацювати навички користування лабораторними мікродозаторами.

- Ознайомтеся з принципом роботи автоматичних мікродозаторів різної місткості.

- Встановіть потрібний об'єм мікродозатора (наприклад, 100 мкл) і наберіть рідину з ємності.

- Акуратно перенесіть рідину в іншу ємність, дотримуючись стерильних умов.

- Повторіть ці кроки кілька разів для різних об'ємів (наприклад, 50 мкл, 10 мкл), щоб відпрацювати точність дозування.

Завдання 4. Провести розрахунки для приготування одно- та багатокомпонентних розчинів.

- *Приготування 1 М розчину NaCl:*

1. Визначте масу NaCl для приготування 100 мл 1 М розчину.

2. Розрахунок: $m = C \times V \times M$, де:

$$C = 1 \text{ М}$$

$$V = 100 \text{ мл} = 0,1 \text{ л}$$

$$\text{Молярна маса NaCl} = 58,44 \text{ г/моль}$$

3. $m = 1 \times 0,1 \times 58,44 = 5,844 \text{ г}$

4. Відважте 5,844 г NaCl і розчиніть у 100 мл дистильованої води.

- *Приготування буферного розчину (наприклад, ТЕ-буфер):*

1. Потрібно приготувати 100 мл 1х ТЕ-буфера (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA).

2. Розрахуйте кількість Tris-Cl і EDTA для приготування розчину.

Для Tris-Cl (молярна маса ~121,14 г/моль): $m = 10 \text{ mM} \times 0,1 \text{ л} \times 121,14 \text{ г/моль} = 0,121 \text{ г}$.

Для ЕДТА (молярна маса $\sim 292,24$ г/моль): $m = 1 \text{ мМ} \times 0,1 \text{ л} \times 292,24 \text{ г/моль} = 0,029 \text{ г}$.

3. Відважте необхідні кількості реагентів, розчиніть їх у дистильованій воді і доведіть до 100 мл.

Контрольні питання

1. Які основні зони організовані в лабораторії молекулярної генетики і для яких типів робіт вони використовуються?
2. Які основні засоби індивідуального захисту необхідно використовувати під час роботи з небезпечними хімічними речовинами у лабораторії?
3. Чому важливо підтримувати стерильність під час роботи з ДНК та РНК?
4. Які основні функції центрифуги у процесах виділення та очищення ДНК і РНК?
5. Як спектрофотометр дозволяє визначати концентрацію ДНК або РНК у зразках? Які довжини хвиль використовуються для цього?
6. У чому полягає різниця між спектрофотометрією і флуориметрією для визначення концентрації нуклеїнових кислот?
7. Які заходи безпеки потрібно дотримуватися при роботі з хімічними речовинами, такими як фенол і хлороформ?
8. Чому важливо вести лабораторний журнал під час виконання експериментів? Яку інформацію в ньому фіксують?
9. Що таке автоклав і як він використовується для забезпечення стерильності в лабораторії?
10. Як правильно розрахувати масу речовини для приготування одного багатокomпонентних розчинів?
11. Яку роль відіграє вортекс у підготовці лабораторних зразків і розчинів?
12. Які типи небезпек існують при роботі з обладнанням, таким як центрифуга або електрофорезний апарат, і як їх уникнути?

ЧАСТИНА 1. ВИДІЛЕННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Виділення нуклеїнових кислот, таких як ДНК та РНК, є одним із ключових етапів у молекулярно-генетичних дослідженнях, оскільки саме ці молекули є носіями генетичної інформації. Виділення чистих зразків нуклеїнових кислот дозволяє здійснювати подальший аналіз їх структури та функцій, і є основою для таких методів, як ПЛР, секвенування геному та аналіз експресії генів. Без якісно виділеної ДНК або РНК більшість сучасних біотехнологічних і медичних досліджень, включаючи діагностику захворювань і розробку нових ліків, було б неможливим.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №2. Екстракція РНК

Мета: ознайомитися з методом виділення сумарної РНК з клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за допомогою методу «гарячого фенолу»;

набути практичних навичок роботи з реагентами, такими як кислий фенол та хлороформ; вивчити основні етапи екстракції РНК, включаючи лізис клітин, виділення та очищення РНК.

Теоретичні відомості

Особливості виділення РНК залежно від типу біологічного матеріалу. Екстракція РНК є складним процесом, оскільки молекули РНК є чутливими до деградації ферментами РНКаз, які присутні практично у всіх клітинах. Виділення РНК ускладнюється особливостями різних типів біологічних матеріалів. Залежно від типу клітин, необхідно враховувати певні нюанси.

Тваринні тканини. Тваринні клітини зазвичай містять значну кількість нуклеаз, зокрема РНКаз, тому під час виділення РНК важливо використовувати інгібітори РНКаз та працювати в умовах, що мінімізують їх активність. Одним із засобів є використання води та розчинів, оброблених DEPC, який інактивує РНКаз. DEPC-оброблена вода допомагає запобігти деградації РНК під час роботи. Тканини, такі як м'язи, містять велику кількість білка, що ускладнює виділення РНК, тому важливо правильно оптимізувати протоколи лізису та очищення, використовуючи реагенти, що ефективно денатурують білки (наприклад, фенол або гуанідинізоціанат у складі TRIzol). Тканини нервової системи та жирові тканини мають високий вміст ліпідів, які можуть взаємодіяти з РНК та ускладнювати її виділення. У таких випадках застосовують додаткові кроки для очищення або специфічні реагенти, що розчиняють ліпіди.

Рослинні тканини. Рослинні клітини характеризуються наявністю жорсткої целюлозної клітинної стінки, яку необхідно зруйнувати перед виділенням РНК. Крім того, полісахариди, фенольні сполуки та інші метаболіти можуть взаємодіяти з РНК, що призводить до зниження якості виділеного матеріалу. Використання фенольних буферів, таких як TRIzol, дозволяє нейтралізувати ці ефекти, оскільки містить гуанідинізоціанат та фенол, які денатурують білки та інактивують РНКаз, забезпечуючи стабільність РНК.

Мікроорганізми. Бактеріальні та грибові клітини мають міцні клітинні стінки, що робить лізис складнішим. Для екстракції РНК з грам-позитивних бактерій та дріжджів використовують ферментативні методи (лізоцим для бактерій) або механічні методи лізису, такі як ультразвукова обробка або використання скляних кульок. Використання фенол-хлороформного методу або TRIzol також ефективно, оскільки ці реагенти допомагають руйнувати клітинні стінки та інгібувати РНКаз.

Віруси. Виділення вірусної РНК може бути складним через низьку концентрацію РНК у зразках та можливу присутність потужних РНКаз у клітинах-господарях. Використання реагентів, що містять гуанідинізоціанат та фенол (наприклад, TRIzol), дозволяє ефективно інгібувати РНКаз та виділити вірусну РНК навіть з невеликих об'ємів зразків.

Огляд методів виділення РНК, їх переваги та недоліки. Існує кілька основних методів виділення РНК, які широко використовуються залежно від типу матеріалу, обсягу зразка, необхідної чистоти та кінцевої мети дослідження.

Фенол-хлороформний метод (метод Чомчинського і Саччі). Це класичний метод, що базується на розділенні РНК, білків та ДНК за допомогою органічних розчинників – фенолу і хлороформу. Фенол денатурує білки та інактивує РНКазу, а хлороформ сприяє розділенню фаз. РНК залишається у водній фазі, тоді як білки та ДНК переходять в органічну фазу або осідають на межі поділу фаз.

- *Переваги:* забезпечує виділення високоякісної РНК, підходить для роботи з великими об'ємами зразків, ефективно очищає від білків і ДНК.

- *Недоліки:* використання токсичних реагентів, таких як фенол і хлороформ, потребує роботи у витяжній шафі та дотримання строгих заходів безпеки. Процес є тривалим і вимагає кількох етапів центрифугування.

Використання реагентів типу TRIzol. TRIzol та подібні реагенти (наприклад, QIAzol, RNAzol) містять гуанідинізоціанат та фенол. Гуанідинізоціанат денатурує білки та інгібує РНКазу, а фенол сприяє поділу фаз при додаванні хлороформу.

- *Переваги:* дозволяє одночасно виділити РНК, ДНК та білки з одного зразка, ефективно інгібує РНКазу, підходить для різних типів біологічних матеріалів.

- *Недоліки:* містить токсичні компоненти, потребує обережного поводження та роботи у витяжній шафі. Може бути менш ефективним для зразків з високим вмістом полісахаридів або ліпідів.

Спін-колонок з силікагелем. Метод базується на сорбції РНК на мембрані з силікагелем у присутності солей гуанідину. Після зв'язування РНК з силікагелем, інші компоненти промиваються, а РНК елюється водним буфером, зазвичай обробленим DEPC для запобігання активності РНКаз.

- *Переваги:* швидкий процес, висока чистота РНК, можливість автоматизації, безпечніший для дослідників через відсутність токсичних органічних розчинників.

- *Недоліки:* висока вартість реагентів і спін-колонок, ризик втрати РНК, особливо при роботі з малими об'ємами зразків.

Магнітні частинки. Використовують магнітні наночастинки з функціональними групами, що зв'язують РНК. Після зв'язування РНК з частинками, магнітом відділяють РНК від інших компонентів.

- *Переваги:* висока ефективність і чистота РНК, підходить для невеликих об'ємів зразків, можливість автоматизації процесу.

- *Недоліки:* висока вартість реагентів і спеціального обладнання.

Прямий лізис. Клітини лізуються у спеціальних буферах, і отримана суміш використовується безпосередньо для аналізу (наприклад, ЗТ-ПЛР). Цей метод не передбачає виділення РНК у чистому вигляді.

- *Переваги:* швидкість і простота, мінімальні втрати матеріалу.

- *Недоліки:* низька чистота РНК, присутність домішок може впливати на точність аналізу.

Основні етапи виділення РНК. Процес виділення РНК, незалежно від методу, зазвичай включає кілька ключових етапів:

1. Лізис клітин. Розрив клітинних мембран для вивільнення РНК. Використовують механічні методи або хімічні буфери, що містять детергенти та інгібітори РНКаз (наприклад, гуанідинізоціанат у TRIzol або додецилсульфат натрію у лізисному буфері). Обробка інструментів і розчинів DEPC допомагає запобігти деградації РНК.

2. Денатурація білків і РНКаз. Використовуються хімічні речовини (фенол, гуанідинізоціанат), які денатурують білки та інактивують РНКаз, захищаючи РНК від деградації.

3. Виділення РНК. Відділення РНК від інших компонентів клітини за допомогою органічних розчинників (фенол, хлороформ) або сорбційних методів (спін-колонки, магнітні частинки). Фенол і хлороформ створюють фазовий розподіл, де РНК залишається у водній фазі.

4. Очищення РНК. Видаляються залишки білків, ДНК та інших домішок. Можуть використовуватися додаткові етапи промивання або ферментативна обробка (наприклад, ДНКаз для видалення ДНК). Використання DEPC-оброблених розчинів на цьому етапі є критичним.

5. Оцінка кількості та якості РНК. Кількість РНК визначається спектрофотометрично шляхом вимірювання абсорбції при 260 нм (OD_{260}), а якість оцінюється співвідношенням OD_{260}/OD_{280} та електрофорезом у агарозному гелі.

Використання екстрагованої РНК для різноманітних молекулярно-генетичних досліджень. Екстрагована РНК використовується в багатьох напрямках молекулярної біології.

Аналіз експресії генів. За допомогою зворотної транскрипції РНК у кДНК та подальшої кількісної ПЛР (qRT-PCR) визначають рівні експресії генів у різних умовах або тканинах.

Секвенування РНК (англ. RNA-seq). Методика високопродуктивного секвенування всього транскриптому для вивчення експресії генів, альтернативного сплайсингу, виявлення нових транскриптів.

Дослідження мікроРНК (англ. miRNA). Вивчення малих некодуючих РНК, які регулюють експресію генів на посттранскрипційному рівні, допомагає зрозуміти механізми регуляції та розвитку захворювань.

Створення кДНК-бібліотек. Зворотна транскрипція РНК для створення кДНК-бібліотек, що використовуються у клонуванні, функціональних дослідженнях генів.

Аналіз РНК-білкових взаємодій. Дослідження взаємодії РНК з білками дозволяє зрозуміти механізми регуляції на рівні транскрипції та трансляції.

Практична частина

Дріжджі виду *S. cerevisiae* є одними з модельних організмів для дослідження молекулярної біології еукаріотів. Виділення РНК з клітин *S. cerevisiae* є критичним етапом у багатьох дослідженнях, зокрема при вивченні експресії генів. Один з ефективних методів для виділення РНК – це метод «гарячого фенолу», який ґрунтується на розділенні клітинних компонентів за допомогою органічних розчинників (фенолу) при високих температурах.

Гарячий фенол ефективно руйнує білкові комплекси та інгібує РНКазу, що дозволяє отримати інтактну РНК для подальших досліджень. Цей метод передбачає екстракцію РНК із застосуванням кислого фенолу (рН 5) та додецилсульфату натрію при температурі 65°C. Завдяки цьому підходу можна отримати відтворювані кількості РНК з багатьох зразків одночасно.

Крім того, у процесі екстракції за допомогою кислого фенолу забруднююча ДНК здебільшого відокремлюється та осідає на межі поділу фаз, що робить отримані РНК-препарати чистішими для подальших молекулярно-генетичних досліджень.

Матеріали і реактиви: культура клітин дріжджів *S. cerevisiae*; лізисний буфер TES, що містить 10 мМ Tris-Cl (рН 7.5), 10 мМ ЕДТА і 0.5% додецилсульфат натрію; кислий фенол (рН ~5) для екстракції РНК; хлороформ для очищення від забруднень; 3 М ацетат натрію (рН 5.3); 100% та 70% охолоджений етанол; вода DEPC або дистильована вода для розчинення осаду РНК.

Обладнання: центрифуга, здатна працювати при швидкості до 12000 об/хв та температурі 4°C; центрифужні пробірки об'ємом 50 мл; мікроцентрифужні пробірки об'ємом 1,5 мл; вортекс для інтенсивного перемішування розчинів і зразків; водяна баня або термостат для інкубації зразків при температурі 65°C; льодяна ванна для охолодження зразків під час екстракції; сухий лід або рідкий азот для заморожування клітинного осаду або зразків РНК.

Хід роботи

Завдання 1. Підготуйте суспензію дріжджових клітин.

- Вирощуйте дріжджові клітини в 10 мл необхідного середовища до середньоекспоненціальної фази ($OD_{600}=1.0$).

Не рекомендується готувати РНК із клітин, що досягли вищої щільності, оскільки з наближенням до стаціонарної фази результати стають менш послідовними, і вихід РНК може варіювати.

- Перенесіть культуру в центрифужну пробірку об'ємом 50 мл і центрифугуйте суспензію клітин 3 хв при 1500×g (7000 об/хв у настільній центрифугі) при 4°C.

Осади клітин можна зберігати кілька місяців при -70°C і розморожувати на льоду безпосередньо перед продовженням процедури.

Заморожування осаду клітин. Осадити клітини шляхом центрифугування, видалити супернатант і, за бажанням, відразу заморозити осад, помістивши пробірку на сухий лід. Для заморожування можна також використовувати рідкий азот. Заморожування корисне, якщо РНК готують з кількох культур або з кількох часових точок даної культури, що дозволяє одночасну обробку зразків.

Завдання 2. Лізуйте клітини.

- Ресуспендуйте осад клітин у 400 мкл лізисного буферу TES. Додайте 400 мкл кислого фенолу і енергійно перемішайте на вортексі протягом 10 секунд.

- Інкубуйте протягом 30-60 хвилин при 65°C з періодичним короткочасним перемішуванням на вортексі.

Дуже важливо інкубувати не менше 30 хвилин (з періодичним перемішуванням) для кількісного виділення як великих, так і малих видів РНК.

- Помістіть на лід на 5 хвилин. Центрифугуйте 5 хвилин при максимальній швидкості при 4°C.

- Перенесіть верхню (водну) фазу в чисту мікроцентрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл, додайте 400 мкл кислого фенолу і енергійно перемішайте. Повторіть процедуру.

Завдання 3. Екстрагуйте РНК хлороформом.

- Перенесіть водну фазу в чисту мікроцентрифужну пробірку і додайте 400 мкл хлороформу.

- Енергійно змішайте і центрифугуйте протягом 5 хвилин при максимальній швидкості при 4°C.

Завдання 4. Осадіть РНК.

- Перенесіть водну фазу в нову пробірку, додайте 40 мкл 3 М ацетату натрію, рН 5.3, і 1 мл охолодженого 100% етанолу. Осадіть РНК, центрифугуючи 5 хвилин при максимальній швидкості при 4°C.

- Промийте осад РНК коротким змішуванням в охолодженому 70% етанолі. Центрифугуйте як раніше для осадження РНК.

- Розчиніть осад у 50 мкл H₂O.

- Зберігайте при -70°C, або при -20°C, якщо планується використати протягом року.

Переконайтеся, що РНК добре розчинена; за необхідності нагрівайте осад при 65°C протягом 10-20 хвилин та/або розбавляйте більшою кількістю води.

Контрольні питання

1. Чому молекули РНК є особливо чутливими до деградації, і які фактори ускладнюють екстракцію РНК?

2. Як активність РНКаз впливає на виділення РНК, і яким чином можна інгібувати їх дію?

3. Яку роль відіграє DEPC-оброблена вода при роботі з РНК і чому вона використовується?

4. Чому рослинні клітини важко піддаються лізису під час виділення РНК, і як це вирішується на практиці?

5. Чому виділення РНК з мікроорганізмів є складним і які методи використовуються для руйнування клітинних стінок бактерій і грибків?

6. Яким чином TRIzol та подібні реагенти сприяють ефективному виділенню РНК з різних біологічних зразків?

7. Які переваги та недоліки фенол-хлороформного методу виділення РНК?

8. Як працюють реагенти типу TRIzol і які переваги вони надають у порівнянні з іншими методами виділення РНК?

9. У чому переваги та недоліки використання сіліка-колонок для виділення РНК?

10. Як працюють магнітні частинки у виділенні РНК і чому цей метод є ефективним?

11. Що таке метод прямого лізису, і чому його використовують для швидкого аналізу експресії генів?

12. Які основні етапи виділення РНК, і чому кожен з них є критично важливим для збереження якості РНК?

13. Як фенол і хлороформ сприяють розділенню компонентів клітин під час екстракції РНК?

14. Які основні застосування екстрагованої РНК у молекулярно-генетичних дослідженнях?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3. Екстракція ДНК

Мета: ознайомитися з методикою виділення геномної ДНК з клітин *Escherichia coli* методом фенол-хлороформної екстракції; набути практичних навичок екстракції ДНК з бактеріальних клітин та ознайомитися з основними етапами екстракції ДНК для її подальшого використання в молекулярно-генетичних дослідженнях.

Теоретичні відомості

Особливості виділення ДНК залежно від типу біологічного матеріалу. Екстракція ДНК є критичним етапом багатьох молекулярно-генетичних досліджень, і її процес може значно варіювати залежно від типу клітин. Кожен тип організму (тварини, рослини, бактерії, віруси) має свої унікальні складові, які впливають на вибір методів та підходів для виділення ДНК.

Тваринні тканини. Тваринні клітини містять велику кількість білків і ліпідів, що ускладнює виділення чистої ДНК. Для вирішення цієї проблеми часто використовуються методи видалення білків, такі як фенол-хлороформна екстракція або ферментативна обробка протеїназами. Ліпіди можуть бути видалені за допомогою хлороформу або інших органічних розчинників.

Рослинні тканини. Рослинні клітини мають жорсткі целюлозні стінки, які ускладнюють доступ до ДНК. Для їх руйнування використовуються механічні методи (гомогенізація) або ферментативні підходи (целюлази або пектинази). Крім того, рослини містять полісахариди, фенольні сполуки та інші метаболіти, які можуть зв'язуватися з ДНК і впливати на її чистоту. Для видалення цих домішок застосовують специфічні реагенти або додаткові етапи очищення.

Бактерії. Грам-позитивні бактерії мають товсті клітинні стінки, що ускладнює лізис. Для їх руйнування використовуються ферменти (наприклад, лізоцим) або механічні методи, такі як ультразвукове розпилення або гомогенізація. У грам-негативних бактерій, таких як *E. coli*, стінка тонша, тому їх лізис є простішим і може бути досягнутий за допомогою лізис-буферів.

Віруси. Виділення вірусної ДНК є складним через невелику кількість ДНК у вірусах і високу чутливість до деградації. У деяких випадках використовуються методи для концентрування вірусних частинок перед екстракцією ДНК. Оскільки віруси можуть знаходитися в різних типах зразків

(кров, тканини, рідини), для виділення ДНК часто використовують спеціальні протоколи.

Огляд методів виділення ДНК, їх переваги та недоліки. Існує кілька основних методів для виділення ДНК, і кожен з них має свої переваги та недоліки залежно від типу зразка, мети дослідження та необхідної чистоти ДНК.

Фенол-хлороформний метод. Це класичний метод, який базується на розділенні білків, ліпідів і нуклеїнових кислот за допомогою органічних розчинників. Фенол денатурує білки, а хлороформ сприяє фазовому розділенню, при якому ДНК залишається у водній фазі.

- *Переваги:* метод забезпечує високу ефективність видалення білків і ліпідів, що дозволяє отримати чисту ДНК.

- *Недоліки:* використання токсичних реагентів, таких як фенол і хлороформ, потребує дотримання заходів безпеки та роботи у витяжній шафі. Метод також є трудомістким і тривалим.

Спін-колонки з силікагелем. Цей метод використовує здатність ДНК зв'язуватися з силікагелем в спін-колонках у присутності солей гуанідину. Після зв'язування, домішки змиваються, а ДНК елюється буфером або водою.

- *Переваги:* швидкий процес, висока чистота ДНК, можливість автоматизації.

- *Недоліки:* висока вартість реагентів та спін-колонок. Ризик втрати ДНК при роботі з малими зразками.

Магнітні частинки. ДНК зв'язується з магнітними частинками, після чого за допомогою магніту її можна відокремити від інших компонентів.

- *Переваги:* висока ефективність, можливість автоматизації, підходить для виділення ДНК з невеликих об'ємів зразків.

- *Недоліки:* висока вартість обладнання та реагентів.

Використання детергентів і протеїназ. У цьому методі детергенти використовуються для руйнування клітинних мембран, а протеїнази – для розщеплення білків.

- *Переваги:* простий і доступний метод, що підходить для обробки великої кількості зразків.

- *Недоліки:* виділена ДНК може бути менш чистою порівняно з іншими методами.

Основні етапи виділення ДНК. Процес виділення ДНК включає кілька ключових етапів, які є спільними для більшості методів:

1. **Лізис клітин.** Клітини піддаються руйнуванню для вивільнення ДНК. Це може бути досягнуто механічними методами (гомогенізація, ультразвук) або хімічними речовинами (детергенти, фенол).

2. **Денатурація білків.** Для видалення білків застосовують фенол або протеїнази. Ці речовини денатурують білки і дозволяють відокремити їх від ДНК.

3. **Виділення ДНК.** ДНК відокремлюється від інших компонентів клітини за допомогою органічних розчинників або сорбційних методів (спін-колонки, магнітні частинки).

4. Очищення ДНК. Після виділення ДНК її очищують від залишкових домішок, таких як білки, ліпіди та РНК. Це можна зробити за допомогою додаткового центрифугування або обробки ферментами (наприклад, РНКазами для видалення РНК).

5. Оцінка кількості та якості ДНК. Чистота та кількість ДНК визначаються спектрофотометрично шляхом вимірювання співвідношення OD_{260}/OD_{280} або за допомогою гель-електрофорезу.

Використання екстрагованої ДНК для молекулярно-генетичних досліджень. Екстрагована ДНК має широкий спектр застосувань у молекулярній біології та генетиці.

ПЛР. Виділена ДНК служить матрицею для ампліфікації специфічних генів або фрагментів ДНК.

Секвенування ДНК. ДНК використовується для визначення послідовності нуклеотидів, що дозволяє ідентифікувати мутації, генетичні варіації або нові гени.

Клонування. ДНК використовується для створення рекомбінантних ДНК-векторів, які можуть бути введені в клітини для експресії нових генів або модифікації існуючих.

Практична частина

E. coli є одним із ключових модельних організмів для дослідження молекулярної біології прокаріотів. Виділення геномної ДНК з клітин *E. coli* є критичним етапом у багатьох дослідженнях, таких як вивчення генетичної структури, геномних змін, а також для подальшої ПЛР, секвенування та інших молекулярно-генетичних методів.

Одним із ефективних методів для виділення ДНК є фенол-хлороформна екстракція, яка базується на розділенні клітинних компонентів за допомогою органічних розчинників (фенолу та хлороформу). Фенол-хлороформна екстракція є прикладом рідинно-рідинної екстракції. Рідинно-рідинна екстракція – це метод, який розділяє суміші молекул на основі різної розчинності окремих молекул у двох різних рідинах, що не змішуються між собою. Рідинно-рідинні екстракції широко використовуються для ізоляції РНК, ДНК або білків. Екстракція нуклеїнових кислот включає додавання рівного об'єму фенол-хлороформу до водного розчину лізованих клітин або гомогенізованої тканини, змішування обох фаз і подальше розділення фаз шляхом центрифугування. Центрифугування суміші призводить до утворення двох фаз: нижньої органічної фази та верхньої водної фази.

Матеріали і реактиви: культура клітин *E. coli*; лізисний буфер, що містить 100 мМ Tris-Cl (pH 8.0), 50 мМ ЕДТА і 1% додецилсульфат натрію; протеїназа K для деградації білків; фенол/хлороформ (1:1) для видалення білків; хлороформ для додаткового очищення від залишків фенолу; 96% етанол (зберігати при -20°C) для осадження ДНК; 70% етанол (кімнатної температури) для промивання осаду ДНК; ТЕ-буфер (Tris-ЕДТА) для розчинення осаду ДНК; РНКаза для видалення РНК при необхідності.

Обладнання: центрифуга, здатна працювати при швидкості до 12000 об/хв та температурі 4°C; мікроцентрифужні пробірки об'ємом 1,5 мл;

вортекс для інтенсивного перемішування розчинів і зразків; інкубатор для підтримання температури 37°C; водяна баня або термостат для інкубації зразків; льодяна ванна для охолодження зразків під час екстракції.

Хід роботи

Завдання 1. Підготувати клітинну суспензію.

- Виростити 1.5 мл культури *E. coli* у середовищі LB до експоненціальної фази (від нічної культури).
- Центрифугуйте культуру на максимальній швидкості 1 хвилину для осадження клітин.
- Видаліть супернатант, не порушуючи осад клітин.

Завдання 2. Лізувати клітини.

- Ресуспендуйте клітинний осад у 600 мкл лізисного буфера, енергійно перемішуючи на вортексі.
- Інкубуйте при 37°C протягом 1 години для руйнування клітинної мембрани.

Завдання 3. Провести фенол-хлороформну екстракцію ДНК.

- Додайте рівний об'єм (600 мкл) фенолу/хлороформу (1:1) до клітинної суспензії.
- Інтенсивно перемішуйте вміст пробірки до повного змішування фаз.
- Центрифугуйте при максимальній швидкості протягом 5 хвилин при кімнатній температурі.
- Обережно перенесіть верхній водний шар у нову пробірку, уникаючи білкового шару на межі поділу фаз. Повторіть цей крок за необхідності, доки білковий шар не зникне.
- Для видалення залишків фенолу додайте рівний об'єм хлороформу до водного шару, змішайте перевертаючи пробірку.
- Центрифугуйте при максимальній швидкості протягом 5 хвилин.
- Перенесіть верхній водний шар у нову пробірку.
- Додайте 2,5 об'єми холодного 96% етанолу. Обережно перемішайте перевертаючи пробірку.
- Інкубуйте пробірку при -20°C протягом 30 хвилин для кращого осадження ДНК.
- Центрифугуйте при максимальній швидкості 15 хвилин при 4°C для осадження ДНК. Виділена ДНК осаджується у вигляді білих ниток або прозорого осаду.
- Видаліть супернатант і промийте осад ДНК 1 мл холодного 70% етанолу.
- Центрифугуйте при максимальній швидкості 2 хвилини.
- Видаліть супернатант і обережно висушіть осад на повітрі або в інкубаторі при 37°C.
- Розчиніть осад ДНК у 50 мкл TE-буфера.
- Якщо у зразку є велика кількість РНК, додайте 1-5 мкл РНКаз до буфера для видалення РНК.

- Якість виділеної ДНК можна оцінити шляхом гель-електрофорезу в агарозному гелі. Під час електрофорезу на агарозному гелі має спостерігатися чітка смуга високої молекулярної маси, що свідчить про успішну екстракцію ДНК.

Контрольні питання

1. Чому процес виділення ДНК є критичним для молекулярно-генетичних досліджень?
2. Як тип біологічного матеріалу впливає на вибір методів для виділення ДНК?
3. Які особливості виділення ДНК з тваринних клітин? Чому ліпіди і білки ускладнюють процес?
4. Які виклики виникають при виділенні ДНК з рослинних тканин, і як їх можна подолати?
5. Чому лізис грам-позитивних бактерій є складнішим, ніж лізис грам-негативних бактерій, таких як *E. coli*?
6. Які методи використовуються для виділення вірусної ДНК, і чому вони відрізняються від методів виділення ДНК з клітин тварин і рослин?
7. У чому полягає суть фенол-хлороформного методу виділення ДНК, і які його переваги та недоліки?
8. Як метод на основі сіліка-колонок полегшує процес виділення ДНК? Які його переваги та обмеження?
9. Як використання магнітних частинок спрощує виділення ДНК, і в яких випадках цей метод є найкращим вибором?
10. Яку роль відіграють детергенти та протеїнази у виділенні ДНК? Чому цей метод є простим, але менш ефективним у порівнянні з іншими?
11. Які основні етапи виділення ДНК, і чому кожен з них є важливим для отримання чистого продукту?
12. Як оцінюють якість і кількість виділеної ДНК?
13. Які молекулярно-генетичні дослідження проводяться з використанням екстрагованої ДНК?

ЧАСТИНА 2. ОЦІНКА КІЛЬКОСТІ ТА ЯКОСТІ ВИДІЛЕНИХ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Оцінка кількості та якості виділених нуклеїнових кислот, таких як ДНК і РНК, є важливим етапом у молекулярно-генетичних дослідженнях, оскільки від точності цього етапу залежить успіх подальших експериментів. Вимірювання концентрації нуклеїнових кислот за допомогою спектрофотометрії або флуориметрії дозволяє дослідникам визначити, чи достатньо матеріалу для аналізу. Оцінка чистоти, зокрема співвідношення OD_{260}/OD_{280} та OD_{260}/OD_{230} , вказує на наявність потенційних домішок, таких як білки або органічні речовини, які можуть вплинути на точність генетичних аналізів. Ці процедури є критичними для забезпечення якості даних у таких методах, як ПЛР, секвенування, клонування і дослідження експресії генів.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4. Спектрофотометрія нуклеїнових кислот

Мета: ознайомитися з основними принципами спектрофотометрії нуклеїнових кислот, навчитися визначати концентрацію і чистоту зразків ДНК та РНК за допомогою спектрофотометричного аналізу, а також розглянути методи оцінки чистоти зразків за співвідношеннями OD_{260}/OD_{280} і OD_{260}/OD_{230} .

Теоретичні відомості

Спектрофотометрія є основним методом оцінки концентрації нуклеїнових кислот (ДНК і РНК) у зразках. Цей метод базується на здатності нуклеїнових кислот поглинати світло на довжині хвилі 260 нм, що дозволяє не лише оцінити кількість нуклеїнових кислот у зразку, а й визначити його чистоту. Для цього розраховуються співвідношення OD_{260}/OD_{280} і OD_{260}/OD_{230} , що дозволяє виявити домішки білків, органічних речовин або реагентів, які можуть впливати на результати подальших молекулярних досліджень.

Типи спектрофотометрів. Класичні УФ-спектрофотометри використовують кварцові кювети для вимірювання абсорбції ультрафіолетового світла. Вони потребують більших об'ємів зразка (50-100 мкл), але забезпечують точний аналіз концентрації нуклеїнових кислот.

Наноспектрофотометри – це сучасні прилади, що дозволяють проводити аналіз малих об'ємів зразка (1-2 мкл). Вони уможливають швидкісне та точне вимірювання концентрації та чистоти зразків без використання кювет. Приклади таких приладів:

- NanoDrop™ (Thermo Scientific) – популярний інструмент для швидкого визначення концентрації та чистоти ДНК і РНК.
- QIAxpert (QIAGEN) – точний спектрофотометр з розширеними можливостями аналізу.

Флуориметри використовуються для точнішого вимірювання концентрацій ДНК або РНК за допомогою флуоресцентних барвників. Цей метод є більш чутливим, ніж спектрофотометрія, і дозволяє точніше вимірювати низькі концентрації нуклеїнових кислот.

Оцінка концентрації та чистоти нуклеїнових кислот. Концентрацію нуклеїнових кислот визначають за допомогою абсорбції при 260 нм (OD_{260}).

Для розрахунку концентрації ДНК використовується формула:

$$C = OD_{260} \times \text{коефіцієнт розведення} \times 50 \text{ мкг/мл}$$

Для розрахунку концентрації РНК використовується формула:

$$C = OD_{260} \times \text{коефіцієнт розведення} \times 40 \text{ мкг/мл}$$

Чистота зразка оцінюється за допомогою співвідношень:

- OD_{260}/OD_{280} : оптимальне значення для чистої ДНК становить 1,8, а для РНК – 2,0. Показники нижче свідчать про наявність білкових домішок.
- OD_{260}/OD_{230} : співвідношення для чистих зразків має бути в межах 2,0-2,2. Знижені значення можуть вказувати на наявність органічних домішок або залишків реагентів, таких як фенол чи гуанідин.

Методика проведення спектрофотометричного аналізу.

1. Підготувати зразки екстрагованих ДНК або РНК.
2. Для класичного УФ-спектрофотометра – помістити 50-100 мкл зразка в кварцову кювету; для наноспектрофотометра – нанести 1-2 мкл зразка на вимірювальну поверхню.
3. Виміряти абсорбцію при 260, 280 і 230 нм.
4. Зафіксувати значення та розрахувати співвідношення OD_{260}/OD_{280} і OD_{260}/OD_{230} .
5. Проаналізувати концентрацію зразка, використовуючи відповідні множники.

Застосування спектрофотометрії нуклеїнових кислот.

Оцінка якості зразків для ПЛР та секвенування: чисті та концентровані ДНК або РНК є важливими для успішної ампліфікації генів або аналізу геномних даних.

Підготовка зразків для трансформації або клонування: чистота зразків ДНК впливає на ефективність генетичних маніпуляцій.

Перевірка якості нуклеїнових кислот перед експресійними дослідженнями: точні результати аналізу залежать від якості виділених нуклеїнових кислот.

Практична частина

Матеріали і реактиви: зразки екстрагованої ДНК або РНК з попередніх лабораторних робіт; ТЕ-буфер або вода для розведення зразків (якщо потрібно).

Обладнання: спектрофотометр (класичний або наноспектрофотометр); кварцова кювета (для класичного спектрофотометра); мікропіпетки і наконечники.

Хід роботи

1. Підготуйте зразки екстрагованої ДНК або РНК для аналізу.
2. Виміряйте абсорбцію при 260 нм, 280 нм та 230 нм.
3. Розрахуйте концентрацію ДНК або РНК за допомогою нижченаведених формул:

Для ДНК:

$$C = OD_{260} \times \text{коефіцієнт розведення} \times 50 \text{ мкг/мл}$$

Для РНК:

$$C = OD_{260} \times \text{коефіцієнт розведення} \times 40 \text{ мкг/мл}$$

4. Оцініть чистоту зразка за допомогою співвідношень OD_{260}/OD_{280} та OD_{260}/OD_{230} .

5. Запишіть отримані значення концентрації та чистоти кожного зразка.

6. Проаналізуйте чистоту зразків. Якщо співвідношення OD_{260}/OD_{280} нижче 1,8 для ДНК або 2,0 для РНК, то це може вказувати на наявність білкових забруднень. Якщо OD_{260}/OD_{230} менше 2,0 – зразок може містити органічні домішки, такі як фенол або гуанідин.

7. Зробіть висновки.

Контрольні питання

1. Що таке спектрофотометрія і як вона застосовується для оцінки концентрації нуклеїнових кислот?
2. На якій довжині хвилі нуклеїнові кислоти мають максимум поглинання світла?
3. Які типи спектрофотометрів використовуються для аналізу нуклеїнових кислот і в чому їх особливості?
4. У чому полягає різниця між класичними УФ-спектрофотометрами та наноспектрофотометрами?
5. Які основні прилади можна використовувати для швидкого та точного вимірювання концентрації ДНК і РНК?
6. Які переваги флуориметрії порівняно зі спектрофотометрією при вимірюванні концентрації нуклеїнових кислот?
7. Як розраховується концентрація ДНК та РНК за допомогою показника OD_{260} ?
8. Які оптимальні співвідношення OD_{260}/OD_{280} та OD_{260}/OD_{230} для чистої ДНК і РНК?
9. Що може свідчити про наявність білкових домішок у зразку при спектрофотометричному аналізі?
10. Як співвідношення OD_{260}/OD_{230} допомагає оцінити наявність органічних домішок у зразку?
11. Опишіть кроки методики спектрофотометричного аналізу нуклеїнових кислот.

ЧАСТИНА 3. МЕТОДИ АМПЛІФІКАЦІЇ ТА АНАЛІЗУ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Методи ампліфікації та аналізу нуклеїнових кислот є ключовими інструментами в молекулярно-генетичних дослідженнях, оскільки вони дозволяють вивчати структуру, функцію та варіативність генетичного матеріалу. Ампліфікація ДНК з використанням ПЛР, дозволяє швидко і точно збільшувати кількість специфічних фрагментів ДНК, що необхідно для подальших досліджень, таких як секвенування, клонування та генетична діагностика. Ці методи є основою для вивчення генетичних захворювань, виявлення інфекційних агентів, ідентифікації мутацій та вивчення експресії генів, що робить їх незамінними в сучасній біотехнології та медицині.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5. Полімеразна ланцюгова реакція

Мета: підбір праймерів для ампліфікації гена АСТВ (бета-актин), розрахувати компоненти реакційної суміші для ПЛР, вибрати оптимальний температурний режим та провести ПЛР.

Теоретичні відомості

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це метод ампліфікації ДНК, що дозволяє отримати мільйони копій конкретної ділянки ДНК з мінімальної кількості вихідного матеріалу. ПЛР проводиться *in vitro*, що означає, що

ампліфікація ДНК відбувається в лабораторних умовах, без необхідності клітинних процесів.

Принцип ПЛР. ПЛР складається з трьох основних етапів, які повторюються циклічно:

1. *Денатурація*: при 94-98°C дволанцюгова ДНК розділяється на два одноланцюгові фрагменти.

2. *Відпал праймерів*: при температурі 50-65°C специфічні короткі фрагменти ДНК (праймери) зв'язуються з комплементарними ділянками на мішеневій ДНК.

3. *Елонгація*: при 72°C ДНК-полімераза синтезує нові ланцюги ДНК, додаючи нуклеотиди до праймерів.

Компоненти ПЛР.

- *Матрична ДНК*: ДНК, яку потрібно ампліфікувати.
- *ДНК-полімераза*: фермент, який синтезує нові ланцюги ДНК (наприклад, Taq-полімераза).
- *Праймери*: короткі олігонуклеотиди, що специфічно зв'язуються з мішеневими ділянками ДНК.
- *Нуклеотиди (dNTP)*: будівельні блоки для синтезу нових ланцюгів ДНК.
- *Буфер*: підтримує оптимальні умови для роботи ДНК-полімерази.

Етапи ПЛР.

1. *Підготовка реакційної суміші*: включає шаблонну ДНК, праймери, ДНК-полімеразу, нуклеотиди та буфер.

2. *Проведення ПЛР*: реакція проходить у термоциклері, що змінює температуру відповідно до циклів денатурації, відпалу праймерів і елонгації.

3. *Аналіз результатів*: після ампліфікації результат перевіряють шляхом електрофорезу на агарозному гелі, що дозволяє візуалізувати ампліфіковані фрагменти ДНК.

Аналіз результатів ПЛР. Після завершення ПЛР продукти ампліфікації аналізують на агарозному гелі з використанням електрофорезу. Позитивний результат представлений у вигляді смуги ДНК на гелі, яка відповідає розміру ампліфікованого фрагмента. Якщо реакція успішна, смуга з'являється на передбаченій відстані згідно з молекулярною вагою продукту.

Переваги і обмеження методу ПЛР.

Переваги:

- Висока чутливість і специфічність.
- Можливість ампліфікації мінімальних кількостей ДНК.
- Швидкість і ефективність методу.

Обмеження:

- Чутливість до контамінації.
- Необхідність ретельного підбору праймерів для уникнення неспецифічної ампліфікації.
- Вимагає чистоти та якості вихідного матеріалу.

Огляд варіантів ПЛР.

- *Класична ПЛР*: стандартний метод для ампліфікації ДНК.

- *Кількісна ПЛР (англ. qPCR):* метод для кількісного визначення ДНК у режимі реального часу.
- *Мультиплексна ПЛР:* одночасна ампліфікація кількох мішеней у одній реакції.
- *Зворотна ПЛР (RT-PCR):* ампліфікація РНК через перетворення її у кДНК.

Застосування ПЛР для молекулярно-генетичних досліджень. ПЛР широко використовується в молекулярно-генетичних дослідженнях для:

- Діагностики генетичних захворювань.
- Виявлення мутацій у генах.
- Ідентифікації збудників інфекцій.
- Клонування генів і генетичних конструкцій.

Практична частина

Матеріали та матеріали: ДНК-матриця: зразки ДНК, що містять ген АСТВ (наприклад, геномна ДНК людини або мРНК, перетворена в кДНК); праймери для гена АСТВ: Forward праймер 5'-GGCATGGGTCAGAAGGATT-3' і Reverse праймер 5'-AGTCCGCCTAGAAGCATTTG-3'; Taq ДНК-полімераза; дНТФ (дезоксинуклеотидтрифосфати), буфер з MgCl₂; стерильна дистильована вода; етидій бромід або SYBR Green для візуалізації продуктів ампліфікації під УФ-лампю; молекулярний маркер для електрофорезу: 100 пн ДНК-маркер для визначення розміру ампліфікованих фрагментів ДНК; 1,5% агарозний гель для розділення ампліфікованих фрагментів ДНК.

Обладнання: термоциклер; мікропіпетки різного об'єму (2-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл) та одноразові наконечники; центрифуга для ПЛР-пробірок; електрофоретична установка; УФ-трансілюмінатор для візуалізації ДНК після електрофорезу; Ламінарний бокс для роботи з зразками ДНК в стерильних умовах; льодяна ванна для зберігання чутливих до температури реагентів (РНК, ферментів) під час роботи; окуляри для захисту очей при роботі з УФ-трансілюмінатором.

Хід роботи

Завдання 1. Отримайте послідовність гена АСТВ.

- Відкрийте базу даних NCBI:
 - Перейдіть за посиланням: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Пошук послідовності гена АСТВ:
 - У полі пошуку введіть назву гена: АСТВ (бета-актин).
 - Виберіть опцію "Gene" з випадаючого меню, щоб звузити пошук.
 - Натисніть на посилання на ген АСТВ у результатах пошуку.
- Копіювання нуклеотидної послідовності:
 - Перейдіть до розділу "GenBank" на сторінці гена АСТВ.
 - Скопіюйте повну нуклеотидну послідовність цього гена для використання в подальших кроках.

Завдання 2. Підберіть праймери у Primer3.

- Перейдіть на сайт Primer3:
 - Використайте наступне посилання: <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>.

2. Введення послідовності:

- Вставте скопійовану послідовність гена АСТВ у поле "SEQUENCE TEMPLATE" на сторінці Primer3.

3. Налаштування параметрів праймерів:

- Встановіть бажану довжину амплікона (продукту ПЛР) у полі "PRIMER PRODUCT SIZE RANGE" (наприклад, 150-300 пар основ).

- Задайте діапазон температур плавлення праймерів (зазвичай 58-62°C).

- Інші параметри можна залишити за замовчуванням або налаштувати відповідно до вимог вашого експерименту.

4. Запуск програми для підбору праймерів:

- Натисніть кнопку "Pick Primers" для початку процесу підбору праймерів.

Завдання 3. Оцініть параметри праймерів.

1. Перегляд результатів:

- Після завершення процесу на екрані з'являться підібрані пари праймерів з інформацією про їх параметри.

- Перегляньте основні параметри:

- ✓ Length (довжина праймера)

- ✓ Tm (температура плавлення)

- ✓ GC content (вміст GC)

- ✓ Product Size (довжина амплікона)

2. Вибір найбільш підходящої пари праймерів:

- Виберіть пару праймерів з оптимальними значеннями параметрів (наприклад, довжина 18-25 нуклеотидів, температура плавлення 58-62°C, вміст GC 40-60%).

Завдання 4. Збережіть результати.

1. Збереження праймерів:

- Скопіюйте послідовності підібраних праймерів, а також їх параметри для подальшого використання в експериментах.

2. Завантаження результатів:

- Ви можете зберегти результат у вигляді текстового файлу або зробити знімок екрану з результатами підбору праймерів.

Завдання 5. Розрахуйте компоненти реакційної суміші для ПЛР.

Підготуйте реакційну суміш об'ємом 20 мкл для ПЛР:

- 10 мкл Taq PCR Master Mix (що містить дНТФ і буфер).

- 1 мкл форвардного праймер (концентрація 10 пмоль/мкл).

- 1 мкл реверсного праймер (концентрація 10 пмоль/мкл).

- 2 мкл матричної ДНК (10-100 нг/мкл).

- 6 мкл стерильної дистильованої води.

Завдання 6. Підберіть температурний і часовий режими для ПЛР.

- Денаурація: 95°C протягом 2 хвилин.

- 30 циклів:

- ✓ Денаурація: 95°C – 30 секунд.

- ✓ Відпал праймерів: 58°C – 30 секунд.

- ✓ Елонгація: 72°C – 1 хвилина.
- *Завершальна елонгація: 72°C – 5 хвилин.*

Завдання 7. Проведіть ПЛР.

- Завантажте реакційні пробірки в термоциклер і запустіть програму з обраними температурними і часовими параметрами.
- Після завершення циклів проведіть аналіз ампліфікованих продуктів.

Завдання 8. Проаналізуйте результати.

- Проведіть електрофорез на 1,5% агарозному гелі з використанням молекулярного маркера (100 пн ДНК-маркер).
- Очікувана довжина ампліфікованого фрагмента для гена *АСТВ* – приблизно 150-200 пар основ.
- Візуалізуйте продукти ампліфікації під УФ-лампою за допомогою етидію броміду або іншого барвника.

Контрольні питання

1. Який принцип методу ПЛР?
2. Опишіть три основні етапи ПЛР та їхні температурні режими.
3. Що таке денатурація ДНК і при якій температурі вона відбувається в ПЛР?
4. Для чого використовуються праймери в ПЛР?
5. Яка роль ДНК-полімерази в процесі ПЛР?
6. Як забезпечується специфічність ампліфікації в ПЛР?
7. Яка функція буфера в реакційній суміші ПЛР?
8. Яким чином аналізують результати ПЛР після завершення ампліфікації?
9. Які переваги ПЛР роблять цей метод таким популярним у молекулярній біології?
10. Які фактори можуть призвести до неспецифічної ампліфікації під час ПЛР?
11. Які обмеження має метод ПЛР?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №6. ПЛР із зворотною транскрипцією

Мета: виконати аналіз рівня експресії гена *ВАН* у клітинах, підданих апоптозу, порівняно з контрольними клітинами, використовуючи *RT-qPCR*; провести нормалізацію результатів до рівня експресії гена «домашнього господарства» *GAPDH*.

Теоретичні відомості

ЗТ-ПЛР (англ. *RT-PCR*) – це метод, який дозволяє визначати рівень експресії генів через аналіз мРНК. Цей метод поєднує зворотну транскрипцію (перетворення мРНК у комплементарну ДНК, кДНК) з ПЛР для кількісного аналізу експресії генів.

Різновиди ЗТ-ПЛР.

- *ЗТ-ПЛР у реальному часі* (англ. *RT-qPCR*): кількісний метод, що дозволяє безперервно стежити за ампліфікацією кДНК під час ПЛР за допомогою флуоресцентних барвників.

- **ЗТ-ПЛР класична (англ. end-point RT-PCR):** якісний метод, де результати аналізують після завершення ПЛР на гелі.

Принцип, компоненти та етапи ЗТ-ПЛР.

1. Принцип:

- Спочатку мРНК перетворюється на кДНК за допомогою ферменту зворотної транскриптази.
- Потім кДНК ампліфікується за допомогою ПЛР з використанням специфічних праймерів для цільового гена.

2. Основні компоненти:

- **мРНК:** досліджуваний зразок.
- **Фермент зворотної транскриптази:** перетворює мРНК на кДНК.
- **ДНК-полімераза:** синтезує нові ланцюги ДНК під час ПЛР.
- **Праймери:** специфічні до цільової послідовності гена.
- **Нуклеотиди (дНТФ):** будівельний матеріал для синтезу ДНК.
- **Буфер для ПЛР:** підтримує оптимальні умови для реакції.

3. Етапи ЗТ-ПЛР:

- ✓ **Виділення мРНК** з клітин або тканин.
- ✓ **Зворотна транскрипція** мРНК у кДНК.
- ✓ **Ампліфікація** кДНК за допомогою ПЛР.
- ✓ **Аналіз результатів:** кількісне визначення рівня експресії гена за допомогою RT-qPCR або якісний аналіз на агарозному гелі.

Аналіз результатів ЗТ-ПЛР.

- **Кількісний аналіз:** RT-qPCR дозволяє вимірювати кількість кДНК в реальному часі завдяки флуоресцентному барвнику (SYBR Green) або зонду (TaqMan).
- **Якісний аналіз:** У класичній ЗТ-ПЛР результати аналізують на гелі після ПЛР, оцінюючи наявність або відсутність ампліфікованого фрагменту ДНК.

Переваги і обмеження методу ЗТ-ПЛР.

Переваги:

- Висока чутливість та специфічність.
- Швидкий і надійний спосіб оцінки експресії генів.
- Можливість кількісного вимірювання рівнів мРНК у зразках.

Обмеження:

- Вимагає високої якості РНК.
- Чутливість до контамінації та специфічності праймерів.

Застосування ЗТ-ПЛР для молекулярно-генетичних досліджень. ЗТ-ПЛР використовується для вивчення експресії генів у різних біологічних системах, включаючи дослідження раку, генетичних захворювань, впливу ліків на експресію генів, а також для діагностики вірусних інфекцій.

Практична частина

Матеріали та реактиви: клітинні зразки: контрольні клітини (не піддані апоптозу), експериментальні клітини, індуковані до апоптозу (можна використовувати хімічні індуктори, такі як стравоспори, або інші методи);

РНК-зразки: сумарна РНК, виділена з контрольних та експериментальних клітин; праймери для гена GAPDH: Forward 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' Reverse 5'-GAAGATGGTGGTGGGATTTC-3'; специфічні праймери для гена BAX: Forward 5'-TGAAGACAGGGGCCTTTTG-3', Reverse 5'-AATTCGCCGGAGACACTCG-3'; набір для виділення РНК: наприклад, TRIzol або комерційні набори для ізоляції РНК (RNeasy Kit); фермент для зворотної транскрипції: RevertAid Reverse Transcriptase або SuperScript III; ДНК-полімераза для RT-qPCR: набір для RT-qPCR з SYBR Green або TaqMan мастером для кількісного визначення кДНК; буфери та реагенти для RT-qPCR: дНТФ (дезоксинуклеотидтрифосфати); ДНКаза для видалення залишкової ДНК із РНК-зразків; вода: дистильована, стерильна, для підготовки зразків і реакційних сумішей.

Обладнання: система для кількісної ПЛР у реальному часі (RT-qPCR); центрифуга; спектрофотометр для визначення концентрації та якості виділеної РНК; термоблок для зворотної транскрипції; електрофоретична установка (опціонально); ламінарний бокс; мікропіпетки та одноразові наконечники; льодяна ванна для зберігання чутливих до температури реагентів (наприклад, РНК, ферментів); лабораторні рукавички та захисний одяг.

Хід роботи

Завдання 1. Виділіть РНК зі зразків.

- Підготуйте два набори клітинних зразків:
 - ✓ **Контрольні клітини** – неапоптичні клітини.
 - ✓ **Експериментальні клітини** – апоптичні клітини (можна індукувати апоптоз за допомогою хімічних агентів або інших стимулів).
- Виділіть сумарну РНК із кожної групи клітин за допомогою комерційного набору для ізоляції РНК (наприклад, TRIzol або інший реагент).
 - ✓ Додайте лізуючий буфер до клітинних осадів.
 - ✓ Видаліть ДНК, використовуючи ДНК-азу.
 - ✓ Очистіть РНК шляхом спиртової преципітації або за допомогою колонок для очищення.
- Перевірте якість та концентрацію РНК за допомогою спектрофотометра (наприклад, Nanodrop) або електрофорезу на агарозному гелі.

Завдання 2. Проведіть реакцію зворотної транскрипції (перетворення мРНК у кДНК).

- Виконайте зворотну транскрипцію мРНК в кДНК за допомогою набору для зворотної транскрипції, що містить фермент зворотної транскриптази (наприклад, RevertAid або SuperScript III). У реакційній суміші повинні бути:
 - ✓ виділена РНК (встановленої концентрації, зазвичай 1 мкг на реакцію),
 - ✓ праймери для зворотної транскрипції (практично використовують оліго(dT) праймери або праймери на основі випадкових гексамерів),
 - ✓ ДНК-нуклеотиди (дНТФ),
 - ✓ буфер для зворотної транскриптази,
 - ✓ зворотна транскриптаза.

- Інкубуйте реакцію при 42°C протягом 1 години для синтезу кДНК.

Завдання 3. Підготовка RT-qPCR реакцій.

- Для кожного зразка (контрольні та експериментальні клітини) підготуйте дві RT-qPCR реакції:

1. Для гена *BAX*.
2. Для гена *GAPDH* (як контрольний ген для нормалізації).

Реакційна суміш для RT-qPCR:

- ✓ 5 мкл кДНК з попереднього етапу.
- ✓ 10 мкл SYBR Green або TaqMan мастера (комерційні набори для qPCR).
- ✓ 1 мкл праймерів для *BAX* або *GAPDH* (встановленої концентрації, наприклад, 10 пмоль/мкл).
- ✓ 4 мкл води (для загального об'єму реакції 20 мкл).

Праймери для гена *BAX*:

- ✓ Forward: 5'- TGAAGACAGGGGCCTTTTGTG-3'
- ✓ Reverse: 5'- AATTCGCCCGGAGACACTCG -3'

Праймери для гена *GAPDH* (контрольний ген):

- ✓ Forward: 5'- GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3'
- ✓ Reverse: 5'- GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

Завдання 4. Проведіть RT-qPCR.

- Завантажте зразки на систему для реального часу ПЛР (наприклад, Bio-Rad CFX96 або Applied Biosystems).
- Виберіть програму для RT-qPCR:
 - ✓ Денаурація: 95°C протягом 2 хвилин.
 - ✓ Ампліфікація (40 циклів):
 - 95°C — 15 секунд (денаурація).
 - 60°C — 30 секунд (відпал і ампліфікація).
 - ✓ Запис сигналу флуоресценції під час фази відпалу.
- Після завершення циклів проаналізуйте криві ампліфікації для кожного гена (як *BAX*, так і *GAPDH*).

Завдання 5. Проаналізуйте результати, проведіть нормалізацію.

- Після завершення ампліфікації отримайте значення C_t (англ. Cycle threshold) для кожного зразка.
 - ✓ C_t для гена *BAX* у контрольних клітинах.
 - ✓ C_t для гена *BAX* у клітинах, підданих апоптозу.
 - ✓ C_t для контрольного гена *GAPDH* у контрольних і експериментальних зразках.
- Виконайте нормалізацію результатів за допомогою методу ΔC_t для порівняння експресії гена *BAX* між зразками:
 - ✓ Обчисліть ΔC_t для кожного зразка: $\Delta C_t = C_{t_{BAX}} - C_{t_{GAPDH}}$
 - ✓ Для експериментальної групи: $\Delta \Delta C_t = \Delta C_{t_{експеримент}} - \Delta C_{t_{контроль}}$
 - ✓ Розрахуйте відносну експресію: $експресії = 2^{-\Delta \Delta C_t}$ складове співвідношення

Завдання 6. Інтерпретуйте результати.

- Якщо $\Delta \Delta C_t < 0$, це означає підвищену експресію гена *BAX* в експериментальних клітинах порівняно з контрольними.

- Якщо $\Delta\Delta Ct > 0$, це свідчить про знижену експресію гена *BAH*.
- Підвищена експресія гена *BAH* вказує на активацію апоптозу у клітинах.

Приклад інтерпретації. Якщо у клітинах, підданих апоптозу, Ct для гена *BAH* становить 22, а для контрольних клітин 28, при цьому Ct для контрольного гена *GAPDH* становить 18 у обох групах, то розрахунок буде таким:

- ΔCt (апоптоз) = $22 - 18 = 4$
- ΔCt (контроль) = $28 - 18 = 10$
- $\Delta\Delta Ct = 4 - 10 = -6$

Відносна експресія гена *BAH* = $2^6 = 64$ рази вища в апоптисних клітинах.

Контрольні питання

1. Що таке ЗТ-ПЛР і яке його основне призначення в молекулярно-генетичних дослідженнях?
2. Які існують різновиди ЗТ-ПЛР і в чому полягають відмінності між RT-qPCR та класичною end-point RT-PCR?
3. Який принцип дії ЗТ-ПЛР?
4. Які компоненти необхідні для проведення ЗТ-ПЛР?
5. Які етапи включає процес ЗТ-ПЛР?
6. Як відбувається зворотна транскрипція мРНК у кДНК?
7. Що таке праймери, і чому їхня специфічність є критично важливою для успішного проведення ЗТ-ПЛР?
8. Як проводиться кількісний аналіз результатів ЗТ-ПЛР?
9. Чим відрізняється кількісний аналіз за допомогою RT-qPCR від якісного аналізу на агарозному гелі?
10. Які переваги ЗТ-ПЛР у порівнянні з іншими методами вивчення експресії генів?
11. Які обмеження має ЗТ-ПЛР?
12. Чому якість РНК є важливим фактором для успішного проведення ЗТ-ПЛР?
13. Які основні застосування ЗТ-ПЛР у медичних і біологічних дослідженнях?
14. Як RT-qPCR дозволяє кількісно визначити рівень експресії гена?
15. Які фактори можуть впливати на точність та надійність результатів ЗТ-ПЛР?

ЧАСТИНА 3. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ НУКЛЕЙНОВИХ КИСЛОТ

Методи дослідження нуклеїнових кислот є основою для молекулярно-генетичних досліджень, оскільки вони дозволяють аналізувати структуру, послідовність і функціональну активність ДНК та РНК. Ці методи включають виділення, ампліфікацію, секвенування, гібридизацію та аналіз експресії генів. Завдяки цим підходам науковці можуть виявляти генетичні мутації, вивчати регуляцію генів, ідентифікувати патогенні мікроорганізми та розробляти нові методи генетичної діагностики і терапії. Вони є основними інструментами для розуміння молекулярних механізмів розвитку захворювань і створення нових біотехнологічних рішень.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №7. Секвенування ДНК

Мета: порівняти нуклеотидні послідовності, отримані методом секвенування, для пошуку гомологій і ідентифікації мутацій у базах даних SNP.

Теоретичні відомості

Секвенування ДНК – це процес визначення послідовності нуклеотидів (А, Т, Г, Ц) у молекулі ДНК. Цей метод є основою для розуміння геномної інформації, що дозволяє ідентифікувати гени, мутації та визначати еволюційні зв'язки між організмами.

Огляд методів секвенування першого, другого і третього покоління. Визначення нуклеотидної послідовності ДНК стало можливим у другій половині 1970-х років завдяки стрімкому розвитку методів молекулярної біології (використання ендонуклеаз рестрикції, плазмідних векторів, молекулярного клонування та електрофоретичного розділення нуклеїнових кислот тощо). На сьогодні виділяють три основні покоління розвитку методів секвенування нуклеїнових кислот.

1. Методи секвенування першого покоління (метод Сенгера):

- найперший метод секвенування, розроблений Фредеріком Сенгером,
- використовує модифіковані нуклеотиди (дидезоксинуклеотиди), які зупиняють подовження ланцюга під час синтезу ДНК,
- послідовності визначаються за допомогою електрофорезу і флуоресцентного маркування.

2. Методи секвенування другого покоління (англ. next-generation sequencing, NGS – секвенування нового покоління):

- використовує паралельну секвенцію мільйонів фрагментів ДНК одночасно.
- основні платформи: Illumina, Roche 454, Ion Torrent.

3. Методи секвенування третього покоління (одномолекулярне секвенування):

- платформи, такі як PacBio і Oxford Nanopore, можуть секвенувати довгі фрагменти ДНК,
- використовують одномолекулярні технології, що дозволяють зчитувати довгі послідовності ДНК без попередньої ампліфікації.

Етапи секвенування ДНК.

1. Підготовка зразків:

- виділення ДНК з біологічного матеріалу,
- фрагментація ДНК на короткі фрагменти (для NGS) або підготовка для одномолекулярного секвенування (для технологій третього покоління),
- додавання адаптерів для подальшої ампліфікації або секвенування.

2. Процес секвенування:

- секвенування може здійснюватися різними методами залежно від платформи. Для NGS це синтез ДНК з флуоресцентно міченими нуклеотидами, для технологій третього покоління – зчитування в режимі реального часу.

3. Аналіз результатів:

- зчитані послідовності збираються і порівнюються з референтними геномами,
- ідентифікація мутацій, однонуклеотидних поліморфізмів (англ. single nucleotide polymorphism, SNP) і пошук гомологій.

Переваги та обмеження різних методів секвенування ДНК.

- *Перше покоління (метод Сенгера):* висока точність, але низька пропускна здатність і висока вартість для секвенування великих геномів.
- *Друге покоління (NGS):* швидкість і масштабність, проте обробка даних є складною.
- *Третє покоління:* можливість секвенувати довгі фрагменти і виявляти епігенетичні модифікації, але висока похибка порівняно з NGS.

Застосування секвенування ДНК для молекулярно-генетичних досліджень. Секвенування ДНК використовується для:

- ідентифікації мутацій, що пов'язані з генетичними захворюваннями,
- вивчення геномів мікроорганізмів, ракових клітин, а також еволюційних змін,
- персоналізованої медицини та генетичного тестування.

Однонуклеотидні поліморфізми (англ. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) – це найпоширеніший тип генетичних варіацій серед організмів, який полягає в заміні одного нуклеотиду в послідовності ДНК на інший. SNP виникає, коли в певному локусі геному відбувається зміна одного нуклеотиду (А, Т, Г, Ц) на інший. Така зміна може бути природною або індукованою, і виявляється у більш ніж 1% популяції, що робить SNP однією з основних форм генетичної мінливості.

SNP можуть бути розташовані як у кодуючих, так і в некодуючих ділянках геному. Коли вони виникають у кодуючих ділянках, вони можуть призвести до зміни амінокислотної послідовності білка, що може впливати на його функцію. Такий тип SNP називається **неконсервативною заміною** і може призводити до різних наслідків, зокрема до розвитку захворювань або адаптаційних змін. SNP, які не змінюють амінокислотну послідовність, називаються **синтетичними** і зазвичай не мають значного впливу на фенотип.

У некодуючих ділянках геному SNP можуть впливати на регуляцію експресії генів або стабільність мРНК. Наприклад, деякі SNP у промоторних ділянках можуть змінювати рівень експресії гена, що призводить до змін у кількості виробленого білка.

SNP мають велике значення в генетичних дослідженнях, оскільки вони можуть використовуватися як **генетичні маркери** для виявлення асоціацій між певними генами і хворобами або іншими фенотипічними ознаками. SNP також широко використовуються у фармакогеноміці для прогнозування індивідуальних реакцій на лікарські препарати. Крім того, аналіз SNP є основою багатьох генетичних досліджень популяцій, які вивчають еволюційні процеси та зв'язок генетичної варіації з фенотипічними ознаками.

Технології секвенування та генотипування дозволяють швидко і точно виявляти SNP у геномах різних організмів. Інформація про велику кількість SNP міститься у базах даних, таких як **dbSNP**, яка забезпечує відкритий доступ до даних про поліморфізми в геномах людини та інших видів.

Таким чином, однонуклеотидні поліморфізми є важливим об'єктом дослідження в сучасній генетиці та молекулярній біології, оскільки вони сприяють розумінню генетичної різноманітності, її ролі у розвитку хвороб і адаптації організмів до змін довкілля.

Практична частина

Матеріали: послідовність гена *CFTR* (мутація у гені призводить до розвитку муковісцидозу) у форматі FASTA, яку можна отримати з бази даних NCBI Gene (наприклад, ізоформа мРНК NM_000492.4.); онлайн-інструменти: NCBI Gene для отримання послідовності гена *CFTR* ([NCBI Gene](#)), NCBI BLAST для порівняння нуклеотидних послідовностей та пошуку гомологій ([NCBI BLAST](#)), dbSNP для ідентифікації мутацій у гені *CFTR* за допомогою баз даних однонуклеотидних поліморфізмів ([dbSNP](#)).

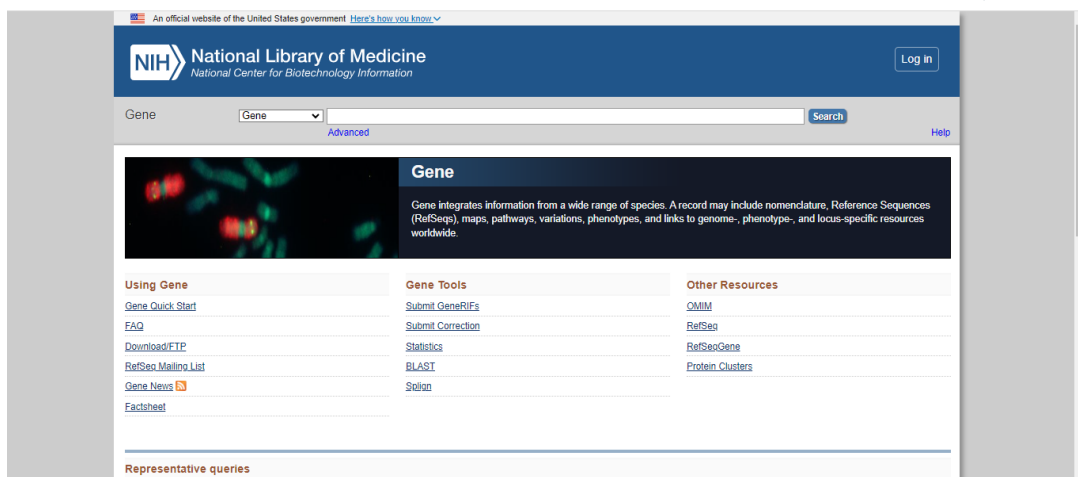
Обладнання: комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернет, веб-браузер, текстовий редактор або офісний пакет (наприклад, Notepad, Microsoft Word, Google Docs) для збереження послідовностей і результатів аналізу.

Хід роботи

Приклад дослідження: ідентифікація мутацій у гені *CFTR*, що пов'язані з розвитком муковісцидозу, та їх аналіз у базах даних для SNP.

Завдання 1. Отримати послідовність гена *CFTR*.

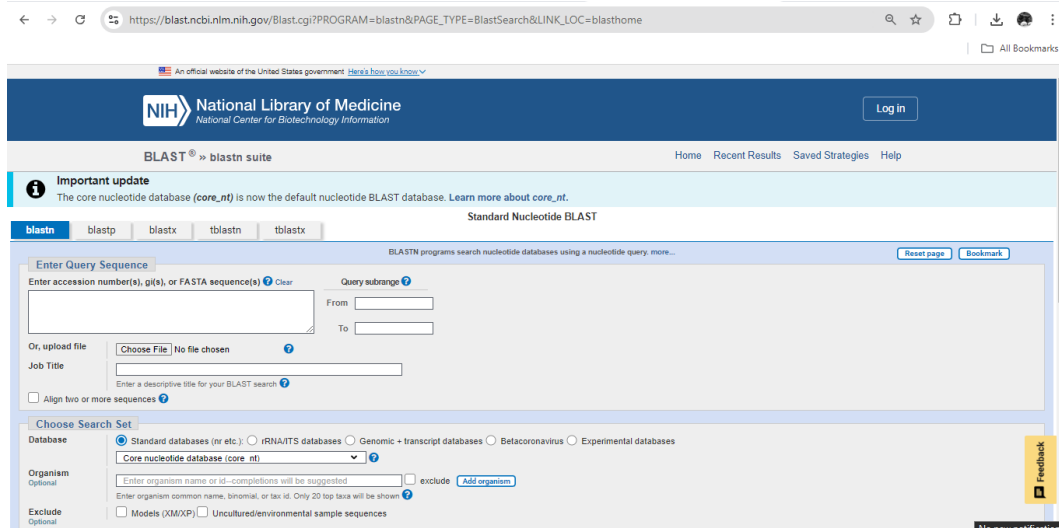
- Перейдіть на сайт [NCBI Gene](#) і знайдіть ген *CFTR*, який асоціюється з муковісцидозом.



- Скопіюйте послідовність мРНК або ДНК у форматі FASTA.

Завдання 2. Використати BLAST для пошуку гомологій.

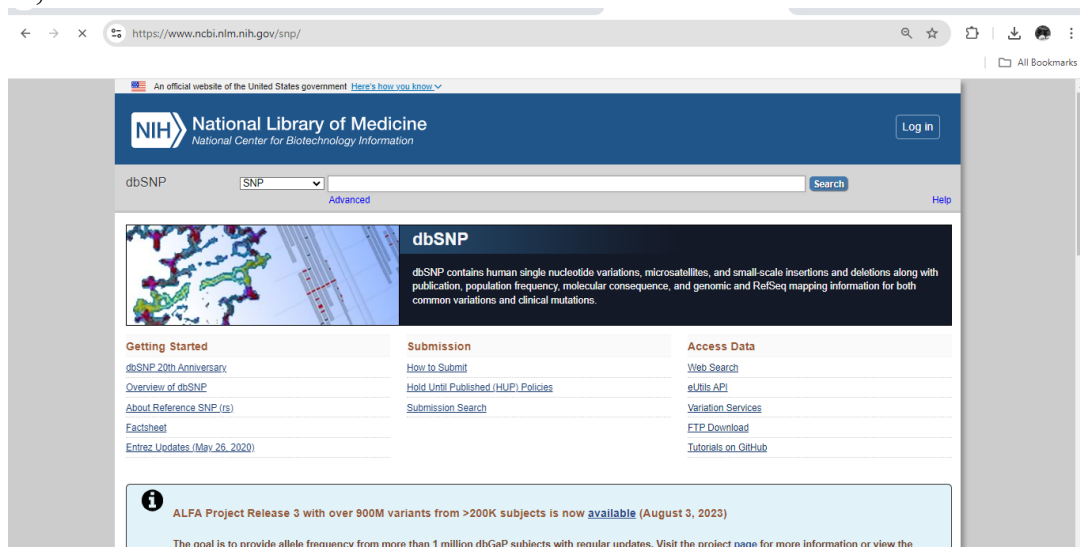
- Перейдіть на [NCBI BLAST](#) і вставте послідовність гена *CFTR* у поле для запиту.



• Виберіть відповідну базу даних, наприклад **nr/nt**, і виконайте пошук для визначення гомологій.

Завдання 3. Проаналізувати мутації у базах SNP.

- Після завершення аналізу BLAST зверніть увагу на результати, які показують збіги з іншими послідовностями. Оцініть E-value та ідентичність.
- Використайте бази даних, такі як [dbSNP](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/), для ідентифікації одонуклеотидних поліморфізмів у гені *CFTR*. Порівняйте отримані мутації з варіантами, наявними в SNP базах.



Завдання 4. Інтерпретувати отримані результати.

- Визначте гомології між геном *CFTR* людини і іншими організмами.
- Ідентифікуйте мутації, що можуть бути асоційовані з муковісцидозом, і порівняйте їх з варіантами у базі SNP.

Контрольні питання

1. Що таке секвенування ДНК і яку інформацію воно дозволяє отримати?
2. Які методи секвенування належать до першого покоління і як працює метод Сенгера?
3. Які основні особливості секвенування другого покоління (NGS) і які платформи використовуються для цього?
4. У чому полягає принцип секвенування третього покоління і які технології використовуються для цього?

5. Які основні етапи процесу секвенування ДНК?
6. Які переваги та обмеження мають методи секвенування першого, другого і третього поколінь?
7. Як SNP впливають на функцію генів і білків?
8. Де можуть бути розташовані SNP у геномі і як це впливає на їхню функцію?
9. Як SNP використовуються у генетичних дослідженнях для виявлення асоціацій між генами та хворобами?
10. Які бази даних використовуються для зберігання інформації про однонуклеотидні поліморфізми і яке їхнє значення для наукових досліджень?
11. Яку роль відіграють технології секвенування у виявленні та аналізі SNP?
12. Які типи SNP існують і чим вони відрізняються за впливом на генетичний матеріал?
13. Як SNP можуть впливати на регуляцію експресії генів у некодуючих ділянках ДНК?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №8. Аналіз послідовностей ДНК за допомогою Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

***Мета:** пошук гомологічних послідовностей гена TP53 (ген-супресор пухлинного росту) серед різних організмів за допомогою BLAST.*

Теоретичні відомості

Поняття гомології: ортологи і паралоги. Гомологія – це схожість між послідовностями ДНК або білків, що виникає внаслідок спільного еволюційного походження. Гомологічні гени можуть бути двох типів:

- *ортологи:* гени, що походять від загального предка і зберігають подібну функцію в різних видах.
- *паралоги:* гени, що виникли в результаті дуплікації всередині одного виду і можуть виконувати нові функції.

Значення пошуку гомологічних послідовностей для дослідження функцій генів та білків. Пошук гомологічних послідовностей дозволяє дослідникам передбачати функції невідомих генів або білків на основі їхньої схожості з уже відомими послідовностями. Це важливо для:

- аналізу еволюційних зв'язків,
- вивчення генетичних змін, що лежать в основі захворювань,
- ідентифікації потенційних терапевтичних мішеней.

BLAST як інструмент для аналізу нуклеотидних і амінокислотних послідовностей. BLAST (англ. Basic Local Alignment Search Tool) – це інструмент для порівняння нуклеотидних або білкових послідовностей з базами даних для пошуку гомологічних послідовностей. Він використовує локальне вирівнювання, що дозволяє знаходити часткові збіги між послідовностями, що важливо для ідентифікації консервативних ділянок генів або білків.

Принцип роботи BLAST: локальне вирівнювання послідовностей. Принцип роботи BLAST заснований на пошуку локальних вирівнювань, що знаходять найбільш подібні ділянки між введеною послідовністю і

послідовностями в базі даних. Це дозволяє швидко і точно визначати гомологічні ділянки навіть за наявності мутацій або інсерцій.

Різновиди BLAST. Існує кілька версій BLAST:

- BLASTN – для порівняння нуклеотидних послідовностей.
- BLASTP – для пошуку гомологій між білковими послідовностями.
- BLASTX – для порівняння нуклеотидних послідовностей з білковими базами даних (перетворює ДНК у білки).
- TBLASTN – для порівняння білкових послідовностей з нуклеотидними базами даних.
- TBLASTX – для порівняння білкових послідовностей між перекладеними ДНК.

Основні етапи роботи з BLAST.

1. Постановка задачі для пошуку гомологій:

- визначте, що саме потрібно знайти (гомологічні послідовності, функціональні ділянки тощо).

2. Підготовка запиту:

- виберіть послідовність для аналізу (ДНК, мРНК або білок) та підготуйте її у форматі FASTA.

Бази даних для пошуку за допомогою BLAST. BLAST використовує кілька баз даних:

- *GenBank*: велика база даних нуклеотидних послідовностей,
- *RefSeq*: база даних зі стандартизованими, добре охарактеризованими послідовностями,
- *PDB*: база даних тривимірних структур білків.

Алгоритм BLAST і його функціональні особливості. BLAST використовує алгоритм, що розбиває послідовність на короткі фрагменти (слова) та порівнює їх із базою даних, шукаючи часткові збіги (локальне вирівнювання). Після цього BLAST розширює ці збіги для отримання повних вирівнювань.

Інтерпретація результатів BLAST. Результати BLAST включають:

- *Score (бал)*: міра схожості між послідовностями,
- *E-value*: кількість вирівнювань такого рівня випадково, чим менше E-value, тим значущіший збіг,
- *Identities*: кількість точно співпадаючих нуклеотидів чи амінокислот.

Розширені функції та варіанти використання BLAST. BLAST має функції для налаштування:

- *режим чутливості*: для складних вирівнювань або швидшого аналізу.
- *фільтрація повторів*: видалення повторюваних послідовностей для уникнення неспецифічних збігів.

Переваги та обмеження BLAST.

Переваги:

- швидкість і ефективність пошуку гомологій,
- гнучкість у роботі з різними типами послідовностей.

Обмеження:

- можливість пропуску слабких гомологій,
- BLAST працює лише з базами даних, тому нові або невідомі послідовності можуть бути не ідентифіковані.

Практична частина

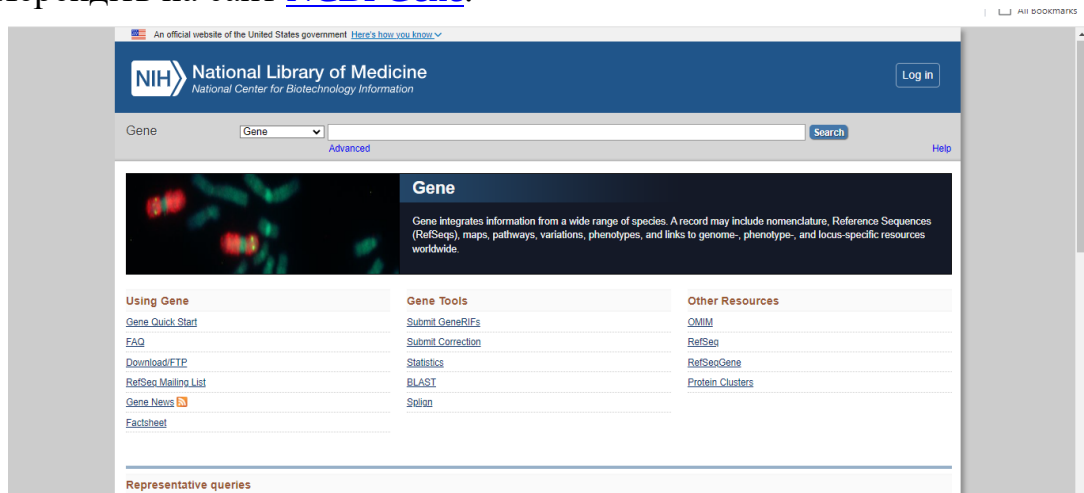
Матеріали: послідовність мРНК або ДНК гена TP53, скопійована з бази даних NCBI Gene у форматі FASTA (наприклад, послідовність для ізоформи NM_000546.6.); онлайн-інструменти: NCBI Gene для отримання послідовності гена TP53 ([NCBI Gene](#)); NCBI BLAST для пошуку гомологічних послідовностей за допомогою BLASTN ([NCBI BLAST](#)); база даних: nr/nt неповторювані нуклеотидні послідовності, які використовуються для пошуку гомологій.

Обладнання: комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернет, веб-браузер, текстовий редактор або офісний пакет (наприклад, Notepad, Microsoft Word, Google Docs) для збереження послідовностей і результатів аналізу.

Хід роботи

Завдання 1. Отримати послідовність гена TP53.

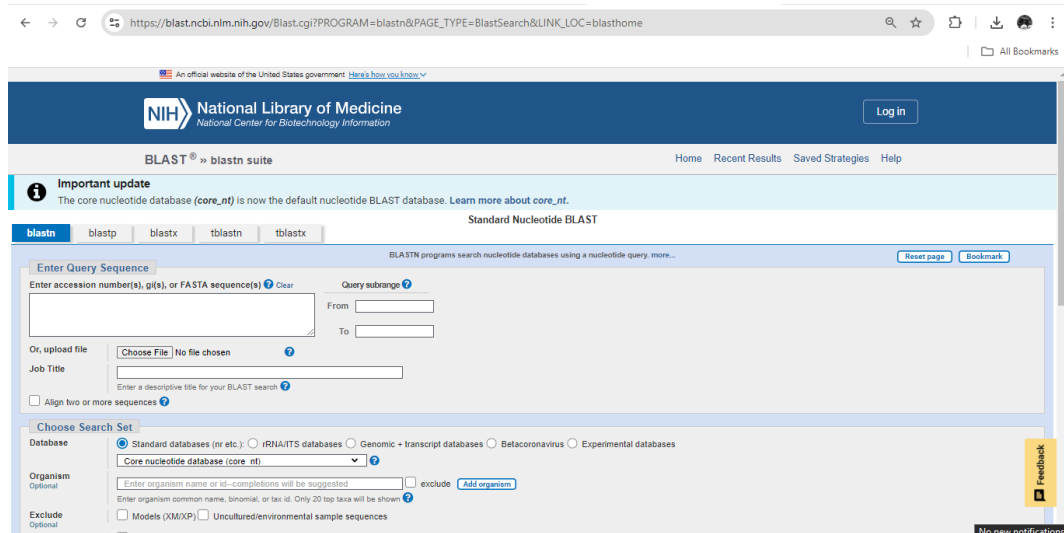
- Перейдіть на сайт [NCBI Gene](#).



- У пошуковому рядку введіть TP53 та виберіть людську версію гена.
- На сторінці гена скопіюйте послідовність мРНК або кодуючу послідовність ДНК у форматі FASTA (наприклад, для ізоформи NM_000546.6).

Завдання 2. Використати BLAST для пошуку гомологій.

- Перейдіть на сайт [NCBI BLAST](#).



- Виберіть інструмент **BLASTN** для порівняння нуклеотидних послідовностей.
- Вставте скопійовану послідовність гена *TP53* у поле для введення запиту.
- Виберіть базу даних **nr/nt** (неповторювані нуклеотидні послідовності) для пошуку гомологічних послідовностей.
- Запустіть аналіз.

Завдання 3. Проаналізувати результати.

- Після завершення пошуку проаналізуйте результати. Зверніть увагу на E-value та процент схожості.
- Визначте, які організми мають гомологічні послідовності гена *TP53*. Високий рівень подібності може свідчити про консервативність функції гена серед різних видів.

Завдання 4. Інтерпретувати результати.

- Ортологи гена *TP53* в інших організмах можуть свідчити про схожі механізми контролю клітинного циклу і пригнічення пухлин.
- Паралоги гена можуть вказувати на гени, що виникли внаслідок дуплікації і виконують додаткові або нові функції.

Контрольні питання

1. Що таке гомологія і які типи гомологічних генів існують?
2. У чому полягає різниця між ортологами і паралогами?
3. Яке значення має пошук гомологічних послідовностей для дослідження функцій генів і білків?
4. Які інструменти використовуються для пошуку гомологічних послідовностей?
5. Що таке BLAST і для чого він використовується в генетичних дослідженнях?
6. Як працює алгоритм BLAST і що означає "локальне вирівнювання послідовностей"?
7. Які версії BLAST існують і які завдання виконує кожна з них?
8. Які основні етапи роботи з BLAST і як підготувати запит для пошуку?

9. Які бази даних використовуються для пошуку гомологічних послідовностей за допомогою BLAST?

10. Як інтерпретуються результати BLAST: що означають Score, E-value та Identities?

11. Які функціональні особливості BLAST дозволяють налаштовувати чутливість та фільтрацію повторів?

12. Які переваги та обмеження має інструмент BLAST під час аналізу послідовностей?

13. Як можна використовувати результати пошуку гомологій для аналізу еволюційних зв'язків та ідентифікації мутацій?

14. Яке практичне значення має пошук гомологічних послідовностей для ідентифікації потенційних терапевтичних мішеней?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №9. Нозерн-блот

Мета: підбір специфічних зондів для гібридизації з РНК гена GAPDH за допомогою онлайн-інструментів NCBI та BLAST.

Теоретичні відомості

Нозерн-блот – це метод молекулярної біології, призначений для виявлення та кількісного аналізу специфічних молекул РНК у зразках. Він дозволяє досліджувати експресію генів на рівні транскрипції, аналізуючи наявність та рівень експресії конкретних мРНК або інших типів РНК.

Принцип Нозерн-блоту. Нозерн-блот заснований на гібридизації комплементарних нуклеотидних послідовностей. Спочатку РНК фрагменти розділяють за розміром за допомогою гелевого електрофорезу, потім переносять на спеціальну мембрану і інкубують зі специфічним зондом, який гібридизується зі знайденою РНК. Використання міченого зонда (флуоресцентного або радіоактивного) дозволяє візуалізувати гібридизовані фрагменти.

Етапи проведення Нозерн-блоту.

1. *Виділення РНК:* РНК виділяють із зразків тканин або клітин за допомогою реагентів або комерційних наборів.

2. *Гелевий електрофорез:* виділену РНК розділяють за розміром на агарозному гелі, зазвичай із додаванням формальдегіду для збереження структури РНК.

3. *Перенос на мембрану:* розділену РНК переносять на нейлонову або нітроцелюлозну мембрану методом капілярного переносу або за допомогою електрофорезу.

4. *Гібридизація з зондом:* мембрану інкубують зі специфічним зондом, який мічений флуоресцентною або радіоактивною міткою. Зонд зв'язується з комплементарними фрагментами РНК на мембрані.

5. *Виявлення результатів:* за допомогою автордіографії або флуоресцентного сканування ідентифікують сигнали, які вказують на наявність специфічних молекул РНК.

Переваги Нозерн-блоту.

- **Специфічність:** Нозерн-блот дозволяє виявляти конкретні молекули РНК у складних сумішах,
- **Напівкількісний аналіз:** метод дає можливість оцінити рівень експресії генів, оскільки інтенсивність сигналу прямо корелює з кількістю РНК,
- **Стабільність даних:** результати є надійними, особливо для довгих РНК, і можуть бути використані для порівняння між різними зразками.

Обмеження Нозерн-блоту.

- **Чутливість:** метод є менш чутливим порівняно з ПЛР та іншими сучасними методами, такими як RNA-seq,
- **Трудомісткість:** виконання експерименту займає багато часу, і необхідно працювати з великими кількостями РНК,
- **Низька роздільна здатність:** гелевий електрофорез може обмежити розділення невеликих РНК або ізоформ РНК.

Значення і застосування Нозерн-блоту. Нозерн-блот використовується для дослідження експресії генів, вивчення регуляції транскрипції, аналізу стабільності мРНК та визначення рівнів експресії специфічних генів у різних умовах (наприклад, у нормальних і патологічних тканинах). Він також застосовується для діагностики генетичних і вірусних інфекцій.

Порівняння з іншими методами аналізу РНК.

- **RT-qPCR:** більш чутливий та швидкий метод для кількісного аналізу експресії генів, однак Нозерн-блот дозволяє одночасно аналізувати різні ізоформи РНК.
- **RNA-seq:** секвенування РНК надає глибший та детальніший аналіз експресії генів, але є дорожчим і потребує складнішої обробки даних.
- **In situ гібридизація:** використовується для визначення локалізації РНК в клітинах і тканинах, але менш ефективний для кількісного аналізу.

Практична частина

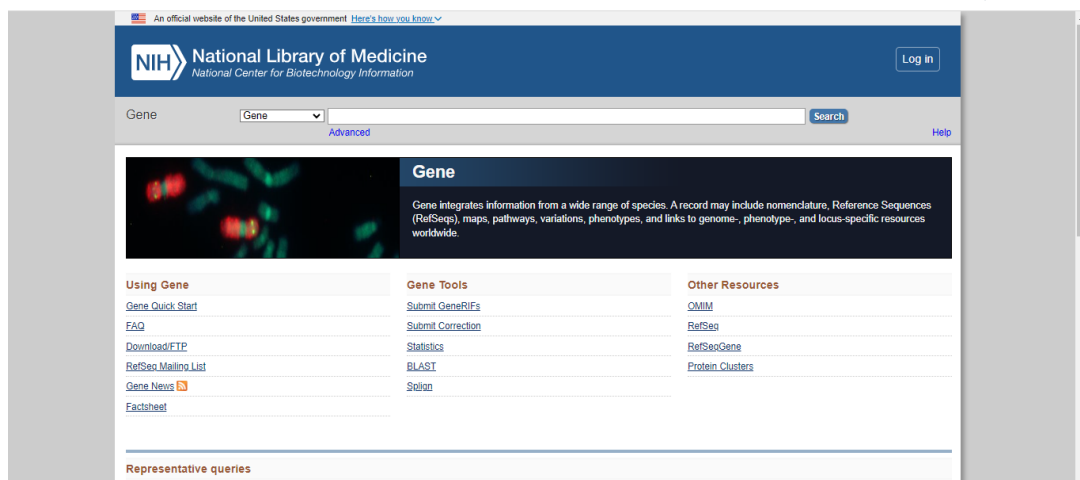
Матеріали: послідовність мРНК гена GAPDH (Gene ID: 2597), яку можна завантажити або скопіювати з бази даних NCBI RefSeq (наприклад, ізоформа NM_002046.7); онлайн-інструменти: NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) для пошуку та отримання інформації про ген GAPDH, NCBI BLAST (Nucleotide BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) для аналізу послідовності мРНК та вибору специфічного зонда.

Обладнання: комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернет, веб-браузер, текстовий редактор або офісний пакет (наприклад, Notepad, Microsoft Word, Google Docs) для збереження послідовностей та результатів аналізу

Хід роботи

Завдання 1. Вибрати ген для дослідження.

- Перейдіть на сайт [NCBI Gene](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/) і введіть у пошук назву гена: GAPDH (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа), широко використовуваний як контрольний ген у дослідженнях експресії.



- Виберіть людський ген *GAPDH* зі списку результатів (Gene ID: 2597).

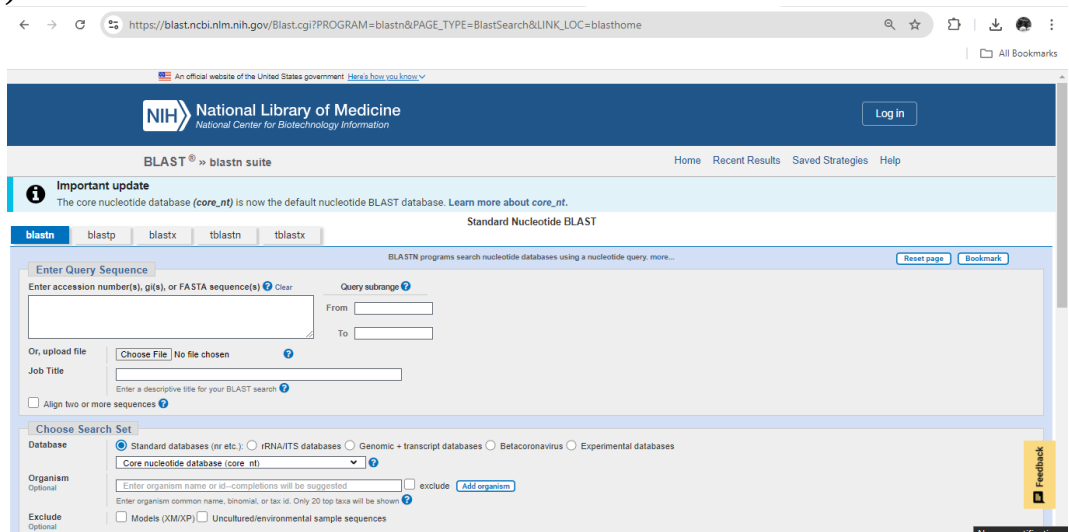
Завдання 2. Проаналізувати послідовності мРНК гена *GAPDH*.

- На сторінці гена перейдіть до розділу NCBI Reference Sequences (RefSeq) і знайдіть послідовність мРНК. Виберіть найбільш поширену ізоформу мРНК гена *GAPDH*.

- Завантажте або скопіюйте послідовність мРНК для подальшого аналізу. Наприклад, послідовність для ізоформи NM_002046.7.

Завдання 3. Використати BLAST для вибору специфічного зонда.

- Перейдіть на [NCBI BLAST](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) і виберіть інструмент Nucleotide BLAST (BLASTN).



- Вставте скопійовану послідовність мРНК гена *GAPDH* в поле для введення послідовності.

- Налаштуйте параметри для пошуку у людському геномі (*Homo sapiens*) та запустіть BLAST-аналіз.

Завдання 4. Проаналізувати результати BLAST.

- Після завершення пошуку перегляньте результати BLAST. Ви побачите ділянки послідовності мРНК, що унікально співпадають із *GAPDH* і не мають схожості з іншими генами.

- Виберіть фрагмент мРНК, довжиною близько 20-30 нуклеотидів, який є специфічним для гена *GAPDH*. Наприклад, можна вибрати послідовність:

5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGTTCG-3'

Цей фрагмент може слугувати специфічним зондом для виявлення *GAPDH* у Нозерн-блоті.

Завдання 5. Перевірити унікальність зонда.

- Переконайтесь, що обраний зонд не має схожості з іншими генами у геномі людини, щоб уникнути неспецифічної гібридизації під час експерименту.
- Якщо фрагмент є унікальним, збережіть його для подальшого використання у лабораторній роботі.

Завдання 6. Підготувати зонд для гібридизації.

- Закажите синтез обраної послідовності зонда у комерційній лабораторії, забезпечивши його мічення радіоактивним ізотопом (^{32}P) або флуоресцентною міткою для візуалізації результатів гібридизації.

Контрольні питання

1. Що таке Нозерн-блот і для яких досліджень він використовується?
2. Який принцип лежить в основі методу Нозерн-блоту?
3. Які етапи включає проведення Нозерн-блоту?
4. Для чого використовується гелевий електрофорез у Нозерн-блоті?
5. Яким чином здійснюється перенос РНК на мембрану?
6. Як здійснюється гібридизація РНК з міченим зондом і для чого вона потрібна?
7. Які типи міток використовуються для зонда в Нозерн-блоті і як вони допомагають у виявленні результатів?
8. Які переваги має метод Нозерн-блот порівняно з іншими методами аналізу РНК?
9. Які основні обмеження Нозерн-блоту?
10. Як Нозерн-блот дозволяє оцінити рівень експресії генів?
11. У яких випадках Нозерн-блот використовується для діагностики генетичних або вірусних інфекцій?
12. Як Нозерн-блот порівнюється з RT-qPCR у контексті чутливості та точності аналізу?
13. Які відмінності між Нозерн-блотом та RNA-seq?
14. Для яких досліджень краще використовувати Нозерн-блот, а не інші методи аналізу РНК?
15. Як інтенсивність сигналу в Нозерн-блоті пов'язана з рівнем експресії РНК?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №10. Саузерн-блот

Мета: розробити експериментальний план для виявлення специфічної мутації в гені *BRCA1* у зразках ДНК за допомогою методу Саузерн-блот.

Теоретичні відомості

Саузерн-блот – це метод молекулярної біології, що дозволяє виявити специфічні послідовності ДНК у складних зразках, таких як геномна ДНК. Цей метод був розроблений Едвіном Саузерном у 1975 році і широко

використовується для ідентифікації специфічних генів, виявлення мутацій, а також аналізу генетичних змін, пов'язаних із захворюваннями.

Принцип Саузерн-блоту. Основою методу є гібридизація комплементарних нуклеотидних послідовностей. Після розділення ДНК фрагментів за допомогою електрофорезу, вони переносяться на спеціальну мембрану та гібридизуються з міченим зондом, який специфічно зв'язується з шуканою послідовністю ДНК. Зонд містить мітку (радіоактивну або флуоресцентну), яка дозволяє візуалізувати результати.

Етапи проведення Саузерн-блоту.

1. *Екстракція ДНК:* виділення ДНК з досліджуваного матеріалу (наприклад, клітинної культури, тканин).

2. *Рестрикційний розріз:* ДНК піддають дії рестриктаз, які розщеплюють її на фрагменти специфічної довжини.

3. *Електрофорез:* фрагменти ДНК розділяються за розміром за допомогою агарозного гелевого електрофорезу.

4. *Перенос на мембрану:* після електрофорезу ДНК фрагменти переносяться на нітроцелюлозну або нейлонову мембрану методом капілярного переносу або за допомогою електрофорезу.

5. *Гібридизація з зондом:* мембрана інкубується зі специфічним ДНК-зондом, який мічений флуоресцентною або радіоактивною міткою. Зонд зв'язується з комплементарними послідовностями ДНК на мембрані.

6. *Виявлення результатів:* за допомогою автордіографії (для радіоактивних зондів) або флуоресцентного сканування (для флуоресцентних зондів) визначають ділянки мембрани, де зонд зв'язався з ДНК.

Переваги Саузерн-блоту.

- Можливість точного виявлення специфічних послідовностей ДНК.
- Надійний метод для ідентифікації мутацій або структурних змін у геномі.
- Можна досліджувати великі фрагменти ДНК.

Обмеження Саузерн-блоту.

- Відносно низька чутливість порівняно з сучасними методами, такими як ПЛР або секвенування нового покоління (NGS).
- Вимагає великих кількостей ДНК і є трудомістким та повільним процесом.
- Використання радіоактивних зондів може бути небезпечним і потребує особливих заходів безпеки.

Значення і застосування Саузерн-блоту. Саузерн-блот використовується для:

- виявлення генетичних мутацій, включаючи делеції або дуплікації.
- дослідження геномної організації, таких як кількість копій генів (копійний поліморфізм).
- діагностики спадкових захворювань та онкологічних мутацій.
- виявлення специфічних генетичних маркерів.

Практична частина

Матеріали: зразки нормальних і патологічних тканин (наприклад, біопсійні зразки молочної залози пацієнтів із підозрою на мутацію в гені *BRCA1* або клітинні лінії); геномна ДНК, виділена з клітинних ліній або тканин; буфер для рестрикції (підходить для обраних ферментів); маркер молекулярної маси ДНК для електрофорезу; нітроцелюлозна або нейлонова мембрана для переносу ДНК; ДНК-зонд, специфічний до гена *BRCA1*, мічений радіоактивним ізотопом або флуоресцентним барвником; ТЕ-буфер; етидієвий бромід або альтернативний флуоресцентний барвник для фарбування ДНК в гелі; 1x TBE буфер (для електрофорезу); фенол-хлороформ для виділення ДНК; етанол (100% та 70%) для осадження ДНК; рестрикційні ферменти (наприклад, *EcoRI* або *HindIII*); лізисний буфер (наприклад, ТЕ-буфер); гібридизаційний буфер для зонда; промивні буфери для очищення мембрани після гібридизації.

Обладнання: центрифуга для осадження клітин, мікроцентрифуга для осадження ДНК; піпетки і мікродозатори (10, 100, 1000 мкл); вортекс для змішування реакційних сумішей; спектрофотометр або наноспектрофотометр для вимірювання концентрації ДНК; вакуумна система або капілярна установка для переносу ДНК з гелю на мембрану; термостат для інкубації зразків при 37°C; електрофоретична система для розділення фрагментів ДНК на гелі; УФ-лампа для візуалізації фрагментів ДНК на гелі; автордіограф для виявлення сигналу з радіоактивно мічених зондів або флуоресцентний сканер для аналізу флуоресцентно мічених зондів; інкубатор для гібридизації.

Хід роботи

Завдання 1. Виділити геномну ДНК з клітинних ліній або тканин пацієнтів (наприклад, біопсійні зразки тканин молочної залози).

- Візьміть зразки нормальних і патологічних тканин (тканини пацієнтів з підозрою на мутацію в *BRCA1*).
- Виділіть геномну ДНК за допомогою стандартних методів (наприклад, фенол-хлороформна екстракція або за допомогою комерційних наборів для виділення ДНК).
- Перевірте концентрацію і якість ДНК за допомогою спектрофотометрії або електрофорезу.

Завдання 2. Розрізати геномну ДНК на фрагменти певного розміру для подальшого аналізу.

- Виберіть відповідні рестрикційні ферменти, що розрізають ДНК поблизу або всередині ділянки гена *BRCA1*. Наприклад, можна використовувати ферменти *EcoRI* або *HindIII*, якщо їхні сайти розташовані в геномі поруч із цікавим маркером.
- Інкубуйте виділену ДНК із рестрикційними ферментами при відповідній температурі (наприклад, 37°C) протягом 1-2 годин для ефективного розрізання ДНК.

Завдання 3. Розділити фрагменти ДНК за розміром, щоб ідентифікувати фрагменти з цікавими послідовностями.

- Підготуйте 0,8-1% агарозний гель із буфером TBE.

- Завантажте фрагменти ДНК у лунки гелю разом із маркером молекулярної ваги для визначення розмірів фрагментів.
- Проведіть електрофорез при напрузі 100-120 В до досягнення достатнього розподілу фрагментів за розміром.
- Офарбуйте гель етидієм бромідом або альтернативним барвником для візуалізації фрагментів ДНК під УФ-лампю.

Завдання 4. *Перенести розділені фрагменти ДНК з гелю на нейлонову або нітроцелюлозну мембрану для подальшої гібридизації з зондом.*

- Підготуйте нітроцелюлозну або нейлонову мембрану відповідного розміру.
- Перенесіть фрагменти ДНК з агарозного гелю на мембрану методом капілярного переносу або за допомогою вакуумного або електрофоретичного переносу.
- Після переносу обробіть мембрану для фіксації ДНК (наприклад, шляхом УФ-опромінення або термічної фіксації).

Завдання 5. *Виявити специфічні фрагменти ДНК, пов'язані з геном BRCA1, за допомогою міченого зонда.*

- Підготуйте ДНК-зонд, специфічний до гена *BRCA1*, мічений радіоактивним ізотопом (наприклад, ^{32}P) або флуоресцентним барвником.
- Інкубуйте мембрану з зондом у відповідних умовах (температура і буферна система) протягом 12-16 годин для забезпечення повної гібридизації зонд-ДНК.
- Після гібридизації промийте мембрану для видалення неспецифічно зв'язаного зонда.

Завдання 6. *Візуалізувати фрагменти ДНК, що зв'язалися із зондом, і проаналізувати результати.*

- Для радіоактивно мічених зондів: використовуйте автордіографію — покладіть мембрану на рентгенівську плівку для виявлення сигналу.
- Для флуоресцентно мічених зондів: використовуйте флуоресцентний сканер для зчитування результатів.
- Порівняйте розміри та інтенсивність сигналу між зразками з нормальними та патологічними тканинами.

Завдання 7. *Проаналізувати отримані дані та виявити наявність або відсутність мутацій у гені BRCA1.*

- Визначте розміри фрагментів, що зв'язалися із зондом. Наявність додаткового або зміненого фрагмента може свідчити про мутацію або структурну зміну в гені *BRCA1*.
- Порівняйте результати між контрольними (нормальними) і патологічними зразками для виявлення відмінностей у геномній організації.

Очікувані результати:

- У нормальних зразках повинні спостерігатися стандартні фрагменти гена *BRCA1*, відповідні його нормальній структурі.
- У патологічних зразках (у разі наявності мутації) можуть бути виявлені додаткові або відсутні фрагменти, що свідчать про генетичні зміни в *BRCA1*, які можуть асоціюватися з розвитком раку молочної залози.

Контрольні питання

1. Хто розробив метод Саузерн-блот і в якому році це сталося?
2. Які основні етапи проведення Саузерн-блоту?
3. Що є основним принципом методу Саузерн-блот?
4. Яка роль рестрикційних ферментів у процесі Саузерн-блот аналізу?
5. Яким чином фрагменти ДНК переносяться на мембрану після електрофорезу?
6. Що таке ДНК-зонд і для чого він використовується в Саузерн-блоті?
7. Які типи міток можуть використовуватися для зондів і які методи їх виявлення?
8. Які переваги має Саузерн-блот перед іншими методами дослідження ДНК?
9. Чому робота з радіоактивними зондами вимагає особливих заходів безпеки?
10. Чому Саузерн-блот залишається важливим методом, незважаючи на появу сучасніших методів?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №11. ДНК-мікрочіп

Мета: виконати порівняльний аналіз експресії генів між нормальними і патологічними тканинами на прикладі дослідження раку молочної залози, використовуючи дані ДНК-мікрочіпів з бази даних GEO і інструмент GEO2R.

Теоретичні відомості

ДНК-мікрочіпи (англ. DNA microarrays) – це високопродуктивна технологія, що дозволяє одночасно вимірювати експресію тисяч генів у різних клітинних умовах. Вона базується на гібридизації комплементарних нуклеотидних послідовностей, що дозволяє вивчати зміни в рівнях експресії генів у нормальних та патологічних тканинах.

Принцип роботи ДНК-мікрочіпа. ДНК-мікрочіп складається з тисяч специфічних ДНК-зондів, прикріплених на твердій поверхні (скло, кремій), кожен з яких відповідає певному гену або його частині. При проведенні експерименту мРНК з клітин зворотно транскрибується у кДНК, мічену флуоресцентними барвниками, і гібридується з мікрочіпом. Інтенсивність флуоресцентного сигналу на кожному зонді відображає рівень експресії відповідного гена.

Типи ДНК-мікрочіпів.

1. **Олігонуклеотидні мікрочіпи:** використовують короткі олігонуклеотиди (звичайно 20-25 нуклеотидів), специфічні для кожного гена.
2. **кДНК-мікрочіпи:** використовують довші кДНК-зонди, які є комплементарними до великих фрагментів генів.
3. **SNP-мікрочіпи:** дозволяють аналізувати SNP і використовуються для генотипування.

Методика проведення експерименту з використанням ДНК-мікрочіпів.

1. Підготовка зразків: виділення мРНК із зразків тканин або клітин (нормальних і патологічних). Потім мРНК зворотно транскрибується у кДНК за допомогою ферменту зворотної транскриптази.

2. Маркування: мічення кДНК флуоресцентними барвниками. Зазвичай використовуються два різних барвники (наприклад, червоний для патологічних зразків і зелений для нормальних).

3. Гібридизація: змішані кДНК зі зразків наносять на ДНК-мікрочіп, де вони гібридизуються з відповідними зондами.

4. Сканування і аналіз: після гібридизації мікрочіп сканується флуоресцентним сканером, і дані аналізуються для визначення рівнів експресії генів. Зміна кольору або інтенсивності сигналу на кожному зонді вказує на зміни у рівні експресії відповідних генів.

Переваги та обмеження технології ДНК-мікрочіпів.

Переваги:

- можливість одночасного аналізу тисяч генів,
- відносно швидке і ефективне дослідження експресії генів на великому масштабі,
- застосування в різних біологічних і медичних дослідженнях, включаючи онкологію, генетичні дослідження та діагностику.

Обмеження:

- обмежена кількість генів на чіпі (не всі можливі гени представлені),
- низька чутливість до малих змін в експресії генів порівняно з технологіями секвенування нового покоління (RNA-seq),
- висока вартість чіпів та обладнання.

Застосування ДНК-мікрочіпів для молекулярно-генетичних досліджень. ДНК-мікрочіпи застосовуються для дослідження генетичних змін, пов'язаних із захворюваннями, такими як рак, діабет та серцево-судинні хвороби. Вони також використовуються для виявлення генетичних поліморфізмів, дослідження експресії генів у відповідь на лікування або вплив зовнішніх факторів, а також для діагностики генетичних захворювань.

Практична частина

Матеріали: набір даних з публічної бази GEO (Gene Expression Omnibus). Наприклад, набір даних GSE15852, який містить інформацію про експресію генів у нормальних і патологічних зразках молочної залози; вбудований інструмент GEO2R для аналізу експресії генів на основі даних ДНК-мікрочіпів, доступний на платформі NCBI GEO; таблиці з даними експресії генів у форматі, готовому для аналізу; функціональні анотації генів (Enrichr або DAVID).

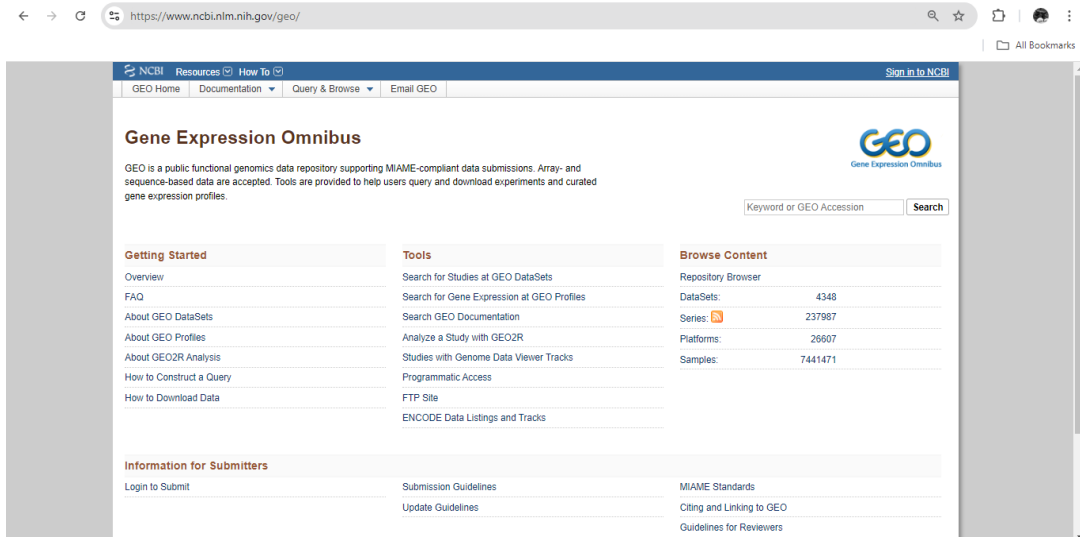
Обладнання: комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернет, веб-браузер, програмне забезпечення для обробки та візуалізації даних (Microsoft Excel, R, або GraphPad).

Хід роботи

Приклад дослідження: набір даних: GSE15852 (дослідження експресії генів у зразках раку молочної залози і нормальних тканинах).

Завдання 1. Отримати дані із бази GEO.

- Перейдіть на сайт [NCBI GEO](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/).



- У рядку пошуку введіть номер набору даних: *GSE15852*.
- Ознайомтеся з описом дослідження: набір даних містить профілі експресії генів у зразках тканин раку молочної залози порівняно з нормальними тканинами.

Завдання 2. Використати інструмент GEO2R.

- На сторінці набору даних *GSE15852* перейдіть до вкладки "Analyze with GEO2R" (Аналіз за допомогою GEO2R).
- У списку зразків виберіть нормальні тканини як одну групу ("Define Group 1") і зразки раку молочної залози як іншу групу ("Define Group 2").
- Запустіть аналіз, щоб порівняти рівні експресії генів між нормальними та патологічними тканинами.

Завдання 3. Проаналізувати результати.

- Після завершення аналізу ви отримаєте таблицю результатів із наступними колонками:
 - ✓ **Gene symbol:** назва гена.
 - ✓ **log₂ fold change (logFC):** зміна рівня експресії гена у логарифмічному масштабі (позитивні значення – підвищення експресії, негативні – зниження).
 - ✓ **Adjusted p-value:** скориговане значення *p*, яке показує статистичну значущість змін.
- Вивчіть гени з найбільшими змінами в експресії, звертаючи увагу на ті, що мають значення logFC більше 1 (підвищення експресії) або менше -1 (зниження експресії) і значення *p*-value < 0,05 (статистична значущість).

Завдання 4. Інтерпретувати результати.

- Визначте ключові гени, що змінюють свою експресію. Наприклад, у дослідженні раку молочної залози можуть бути виявлені підвищені рівні експресії онкогенів, таких як *HER2*, *MYC* або *CCND1*, а також знижені рівні експресії генів-супресорів пухлин, таких як *TP53* або *BRCA1*.
- Зробіть висновки щодо можливих механізмів, які можуть бути залучені в розвиток пухлини на основі змін у рівнях експресії цих генів.

Завдання 5. Візуалізувати дані.

- Використовуйте вбудовані інструменти GEO2R для створення графіків, таких як теплові карти або графіки експресії, для візуалізації змін у рівнях експресії генів між нормальними і патологічними зразками.
- Створіть теплову карту для найбільш значущих генів, щоб наочно продемонструвати різницю в експресії між нормальними і раковими тканинами.

Завдання 6. Збережіть результати.

- Після аналізу ви можете завантажити результати в форматі таблиці для подальшого використання або публікації.
- Збережіть отримані графіки та теплові карти для презентації або обговорення результатів у науковій роботі.

Контрольні питання

1. Що таке ДНК-мікрочіп і для яких досліджень використовується ця технологія?
2. У чому полягає принцип роботи ДНК-мікрочіпа?
3. Які типи ДНК-мікрочіпів існують і чим вони відрізняються між собою?
4. Як проводиться підготовка зразків для експерименту з використанням ДНК-мікрочіпів?
5. Яким чином мРНК трансформується в кДНК для подальшого аналізу на ДНК-мікрочіпах?
6. Які флуоресцентні барвники використовуються при маркуванні зразків і чому їх використовують?
7. Як відбувається гібридизація кДНК з зондами на ДНК-мікрочіпі?
8. Які етапи включає сканування і аналіз результатів ДНК-мікрочіпа?
9. Які переваги має технологія ДНК-мікрочіпів порівняно з іншими методами генетичних досліджень?
10. Які основні обмеження ДНК-мікрочіпів?
11. У яких сферах медицини та біології застосовується технологія ДНК-мікрочіпів?
12. Як ДНК-мікрочіпи використовуються для дослідження генетичних змін, пов'язаних із захворюваннями?
13. Яке значення мають ДНК-мікрочіпи у вивченні експресії генів у відповідь на лікування або вплив зовнішніх факторів?
14. Як ДНК-мікрочіпи порівнюються з RNA-seq у контексті чутливості та можливостей аналізу?
15. Які обмеження виникають через обмежену кількість генів на ДНК-мікрочіпі?

ЧАСТИНА 4. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ БІЛОК-НУКЛЕЇНОВИХ ВЗАЄМОДІЙ

Вивчення білок-нуклеїнових взаємодій є важливим напрямом сучасної молекулярної генетики, оскільки ці взаємодії відіграють ключову роль у регуляції генетичних процесів, таких як реплікація, транскрипція, рекомбінація та репарація ДНК. Дослідження таких взаємодій дозволяє розкрити механізми, за допомогою яких білки регулюють активність генів, впливають на

стабільність геному та визначають структурні зміни у нуклеїнових кислотах. Такі методи, як імунопреципітація хроматину (англ. ChIP), імунопреципітація РНК (англ. RIP), а також ChIP-seq і RIP-seq, які поєднують традиційні підходи з високопродуктивним секвенуванням, забезпечують можливість вивчення цих взаємодій на молекулярному рівні, що є важливим для молекулярної генетики, біотехнології та медицини.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №12. Імунопреципітація хроматину

Мета: визначити зміни в активності гістонових модифікацій (наприклад, H3K27me3) під час диференціації стовбурових клітин у нейрональні клітини на основі ChIP-seq даних.

Теоретичні відомості

Імунопреципітація хроматину (англ. Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) – це метод, що дозволяє вивчати взаємодії білків з ДНК у контексті хроматину. ChIP дозволяє ідентифікувати місця на ДНК, де білки, такі як транскрипційні фактори або гістони, зв'язуються з ДНК у живих клітинах. Це важливий метод для дослідження регуляції генів, епігенетичних модифікацій та структури хроматину.

Етапи проведення ChIP.

1. **Фіксація білок-ДНК взаємодій:** живі клітини піддаються обробці формальдегідом, який ковалентно з'єднує білки з ДНК, що дозволяє зберегти їхні взаємодії під час подальшого лізису клітин.

2. **Лізис клітин та подрібнення хроматину:** клітини лізують, і хроматин піддається фрагментації, зазвичай за допомогою ультразвуку, для отримання невеликих фрагментів ДНК.

3. **Імунопреципітація:** антитіла до конкретного білка додаються до фрагментованого хроматину, зв'язуючи білок разом із асоційованою з ним ДНК. Антитіла зв'язуються з білком, після чого комплекс антитіло-білок-ДНК осаджується.

4. **Очищення ДНК:** осаджений комплекс очищується, а білки розщеплюються ферментами або теплом, залишаючи зв'язану ДНК.

5. **Аналіз ДНК:** виділена ДНК аналізується за допомогою різних методів, таких як qPCR, секвенування (ChIP-seq) або мікроматриці (ChIP-chip), для визначення ділянок ДНК, що взаємодіють з білком.

Аналіз результатів ChIP. Після виділення фрагментів ДНК, які зв'язуються з білком, вони можуть бути піддані аналізу:

- **ChIP-qPCR:** використовується для кількісного визначення конкретних ділянок ДНК, що зв'язуються з білком.

- **ChIP-seq:** глобальне секвенування ДНК, що дозволяє ідентифікувати всі ділянки ДНК, які взаємодіють із білком у всьому геномі.

- **ChIP-chip:** використання мікроматриць для аналізу взаємодії білків з ДНК у геномі.

Різновиди ChIP.

- **ChIP-seq:** використовує технології секвенування нового покоління для ідентифікації білок-ДНК взаємодій по всьому геному.

- *ChIP-qPCR*: метод для вивчення специфічних ділянок ДНК із високою точністю та чутливістю.
- *ChIP-ехо*: модифікована версія ChIP, яка дозволяє точно ідентифікувати місця зв'язування білків завдяки використанню екзонуклеаз для кращого виділення зв'язаних ділянок.

Переваги та обмеження методу ChIP.

Переваги:

- визначає взаємодії білків з ДНК у живих клітинах,
- може бути застосований до різних білків і генів,
- дозволяє досліджувати як загальні, так і специфічні взаємодії в масштабі всього геному.

Обмеження:

- залежність від якості антитіл,
- можливість отримання фальшивих результатів через неспецифічне зв'язування,
- вимагає оптимізації експериментальних умов для кожного білка.

Значення і застосування ChIP. ChIP має велике значення для вивчення механізмів регуляції експресії генів, модифікації хроматину, епігенетичних змін та транскрипційних процесів. Його застосовують для дослідження ракових захворювань, диференціації клітин, реакції на зовнішні впливи та інших біологічних процесів.

Порівняння з іншими методами дослідження взаємодій ДНК-білок.

- *EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)*: дозволяє виявити взаємодію білка з ДНК, але не на рівні хроматину і не в живих клітинах.
- *DNase footprinting*: ідентифікує ділянки ДНК, захищені від розщеплення ДНК-зв'язуючими білками, але не дає повної картини у живих клітинах.
- *FAIRE-seq*: дозволяє виявляти вільні від нуклеосом ділянки ДНК, але не конкретні білок-ДНК взаємодії.

Практична частина

Матеріали: набір даних ChIP-seq для H3K27me3 під час диференціації стовбурових клітин у нейрональні клітини (завантажується з публічних баз даних, таких як NCBI GEO або ENCODE); референсний геном (наприклад, людський або мишачий геном), який використовується для вирівнювання ридів і точного визначення піків зв'язування гістонових модифікацій; файли анотацій генів (наприклад, GTF або BED-файли), які використовуються для ідентифікації геномних регіонів та регуляторних елементів; база даних, що містить інформацію про гістонові модифікації та регуляторні елементи (наприклад, ENCODE або Roadmap Epigenomics).

Обладнання: комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернет; програмне забезпечення для аналізу та візуалізації даних: Galaxy (для попередньої обробки даних ChIP-seq), IGV (для візуалізації піків зв'язування H3K27me3 з ДНК), MACS2 (для ідентифікації піків зв'язування), Cistrome або HOMER (для функціональної анотації піків і аналізу змін у регуляторних елементах).

Хід роботи

Завдання 1. *Отримайте дані ChIP-seq.*

- Завантажте відкриті ChIP-seq дані з бази даних ENCODE або NCBI GEO для H3K27me3 у стовбурових клітинах та після їх диференціації у нейрональні клітини.
- Скачайте відповідні контрольні дані (input DNA) для обох умов, щоб використати їх для нормалізації.

Завдання 2. *Попередня обробка даних.*

- Використовуйте програму FASTQC для оцінки якості ридів з ChIP-seq даних, щоб переконатися, що дані мають відповідний рівень якості.
- Проведіть вирівнювання ридів до референсного геному людини (hg38), використовуючи інструмент Bowtie2 у Galaxy або іншій обраній платформі.
- Виконайте фільтрацію даних, видаляючи низькоякісні риди та адаптери для збереження високої точності аналізу.

Завдання 3. *Проаналізуйте піки зв'язування.*

- Використовуйте інструмент MACS2 для аналізу піків у ChIP-seq даних для H3K27me3 у стовбурових клітинах і після диференціації.
- Визначте регіони геному, де спостерігається значне накопичення гістонових модифікацій H3K27me3, які є маркерами репресованих генів.

Завдання 4. *Проведіть порівняльний аналіз.*

- Порівняйте піки для H3K27me3 у стовбурових клітинах та нейрональних клітинах, щоб оцінити, як змінюється епігенетичний профіль під час диференціації.
- Використовуйте дані про зміни в піках H3K27me3, щоб оцінити регуляцію ключових генів, відповідальних за нейрональну диференціацію.

Завдання 5. *Візуалізуйте дані.*

- Відкрийте результати аналізу у програмі IGV (Integrative Genomics Viewer) для візуалізації піків H3K27me3 на різних етапах диференціації клітин.
- Створіть графіки або теплові карти, щоб продемонструвати зміни в активності гістонових модифікацій у стовбурових клітинах та після диференціації.

Завдання 6. *Інтерпретуйте результати.*

- На основі отриманих даних про H3K27me3 визначте, які гени залишаються репресованими, а які активуються під час диференціації стовбурових клітин у нейрональні клітини.
- Оцініть роль гістонових модифікацій у регуляції ключових генів, пов'язаних із нейрогенезом, та запропонуйте можливі механізми епігенетичної регуляції.

Контрольні питання

1. Що таке ChIP і для чого вона використовується?
2. Які етапи включає метод ChIP?
3. Яка роль формальдегіду в процесі імунопреципітації хроматину?
4. Для чого використовується ультразвукова обробка у методі ChIP?
5. Яку роль відіграють антитіла під час імунопреципітації хроматину?

6. Як проводиться очищення ДНК після імунопреципітації?
7. Які методи використовуються для аналізу ДНК після ChIP?
8. Що таке ChIP-seq і як його використовують для аналізу взаємодій білків з ДНК?
9. Які відмінності між ChIP-qPCR та ChIP-seq?
10. Що таке ChIP-ехо, і в чому полягає його відмінність від класичного ChIP?
11. Які переваги має метод ChIP у порівнянні з іншими методами дослідження білок-нуклеїнових взаємодій?
12. Які можливі обмеження ChIP, і як вони можуть вплинути на результати експерименту?
13. У яких біологічних дослідженнях і галузях застосовується метод ChIP?
14. Як ChIP допомагає у вивченні регуляції генів та епігенетичних змін?
15. Як ChIP можна порівняти з іншими методами дослідження білок-нуклеїнових взаємодій, такими як EMSA або DNase footprinting?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №13. Імунопреципітація РНК

Мета: провести порівняльний біоінформатичний аналіз експресії генів, пов'язаних із білком HuR (РНК-зв'язуючий білок), за нормальних та патологічних умов; використати доступні онлайн-інструменти для аналізу даних RIP-seq з метою визначення диференційно експресованих генів і дослідження їхньої ролі у клітинних процесах, зокрема при розвитку онкологічних захворювань.

Теоретичні відомості

Імунопреципітація РНК (англ. RNA Immunoprecipitation, RIP) – це метод для вивчення взаємодій між білками та РНК у живих клітинах. RIP дозволяє визначити, які РНК зв'язуються з певними білками, що є важливим для дослідження процесів регуляції генів, стабільності РНК, транспорту та трансляції.

Принцип методу RIP. Основою методу є використання антитіл для специфічного зв'язування білка, що цікавить, разом із пов'язаними з ним РНК. Цей білок, у комплексі з РНК, може бути імунопреципітований із клітинного лізату, а потім РНК із цього комплексу може бути проаналізована для ідентифікації та кількісної оцінки зв'язування.

Етапи проведення RIP.

1. Лізис клітин: клітини або тканини лізують у буфері, що зберігає білок-РНК взаємодії.

2. Імунопреципітація: специфічні антитіла до білка, що цікавить, додаються до лізату. Антитіла разом із білком і пов'язаною РНК осаджуються за допомогою білок-А або білок-Г агарових носіїв.

3. Виділення РНК: після осадження білок-РНК комплексу РНК виділяють за допомогою фенол-хлороформної екстракції або спеціальних реагентів для виділення РНК.

4. Аналіз РНК: РНК може бути піддана кількісному аналізу за допомогою RT-qPCR, секвенування (RIP-seq), або мікроаналізу (microarray).

Методи аналізу РНК після імунопреципітації.

- **RT-qPCR:** дозволяє кількісно оцінити специфічні молекули РНК, що взаємодіють з білком.

- **RIP-seq:** секвенування пов'язаних РНК для глобального аналізу всіх РНК, що зв'язуються з певним білком.

- **Мікроматричний аналіз (англ. microarray):** дозволяє аналізувати зв'язування білків із відомими РНК у масштабах всього геному.

Переваги та обмеження методу RIP.

Переваги:

- можливість дослідження білок-РНК взаємодій у живих клітинах,
- висока специфічність до білка за рахунок використання антитіл,
- можливість вивчення широкого спектра РНК за допомогою RIP-seq.

Обмеження:

- залежність від якості та специфічності антитіл,
- втрата слабких або тимчасових білок-РНК взаємодій під час лізису клітин,
- можливість неспецифічного зв'язування РНК з антитілами або агаровими носіями.

Значення і застосування RIP. RIP використовується для дослідження регуляції експресії генів, стабільності РНК, механізмів сплайсингу, взаємодій з довгими некодуючими РНК та малими інтерферуючими РНК. Він допомагає виявити роль білків-регуляторів у розвитку захворювань, таких як рак, нейродегенеративні та імунні хвороби.

Різновиди і модифікації RIP.

- **CLIP (англ. Cross-linking Immunoprecipitation):** використовується хімічне або УФ-зшивання для фіксації білок-РНК взаємодій до лізису клітин.

- **PAR-CLIP:** модифікація CLIP, де використовуються фотореактивні рибонуклеозиди для покращення точності визначення білок-РНК взаємодій.

- **eRIP (англ. enhanced RIP):** вдосконалена версія RIP, яка включає додаткові етапи для підвищення ефективності та зменшення фонових сигналів.

Порівняння з іншими методами дослідження взаємодій РНК-білок.

- **CLIP:** використовує крослінкінг для підвищення стабільності білок-РНК взаємодій, але складніший у виконанні порівняно з RIP.

- **HITS-CLIP:** подібний до CLIP, але дозволяє аналізувати білок-РНК взаємодії на геномному рівні.

Практична частина

Матеріали: оброблені дані експресії генів у форматі таблиць (доступні на платформі NCBI GEO або інших базах даних), список генів: список диференційно експресованих генів після аналізу даних; функціональні анотації генів для подальшого аналізу шляхів та біологічних процесів, пов'язаних із змінами в експресії.

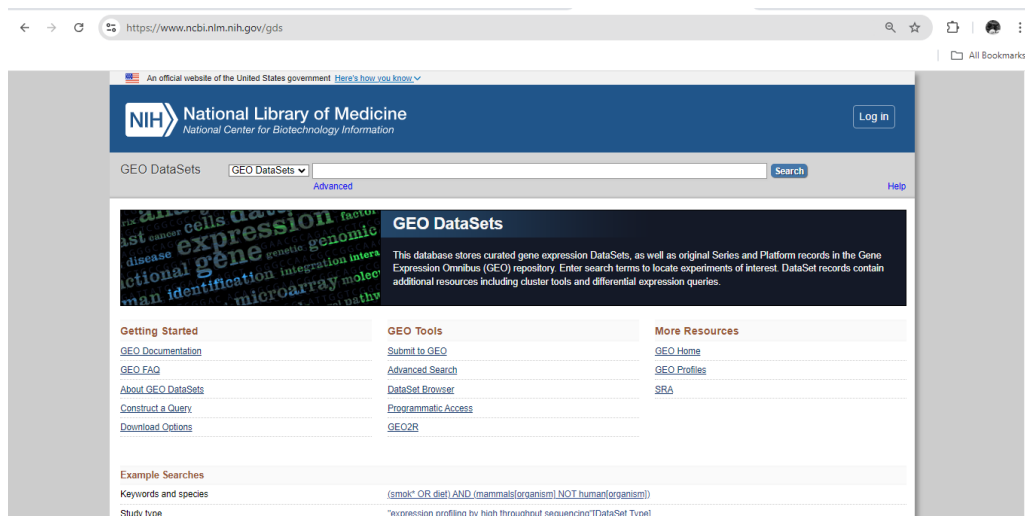
Обладнання: комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернет, веб-браузер для використання таких ресурсів, як: GEO DataSets

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) для пошуку та завантаження даних RIP-seq, GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) для аналізу диференційної експресії генів, Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) для функціонального аналізу та анотації генів, Metascape (<https://metascape.org/>) для візуалізації та створення теплових карт, STRING (<https://string-db.org/>) для аналізу білково-білкових взаємодій серед диференційно експресованих генів.

Хід роботи

Завдання 1. Отримайте дані RIP-seq.

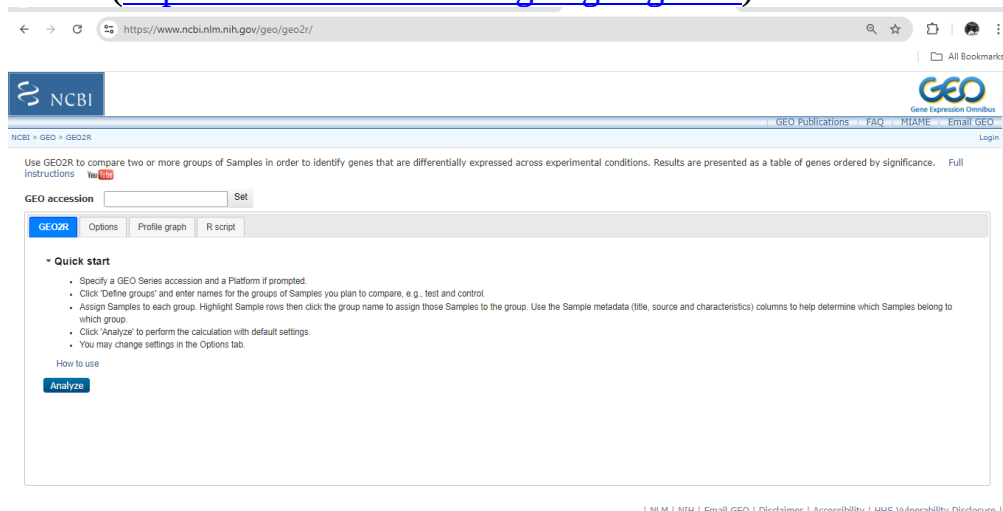
- Використайте публічні ресурси, такі як GEO DataSets (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>), щоб знайти набори даних RIP-seq, наприклад, дані про білок HuR або інші РНК-зв'язуючі білки у нормальних і патологічних клітинах.



- Знайдіть набір даних, який цікавить, і завантажте вже оброблені дані у вигляді таблиць із рівнями експресії РНК.

Завдання 2. Використайте онлайн-інструменти для аналізу даних.

- Для аналізу експресії генів використовуйте інтуїтивні онлайн-інструменти, які не потребують знань програмування.
 - GEO2R** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>):



- ✓ завантажте оброблені дані з GEO.
- ✓ виберіть нормальні та патологічні зразки для порівняння.

✓ використовуйте інструмент GEO2R для аналізу диференційної експресії генів.

✓ після обчислень отримайте список генів із їхніми змінами в експресії (значення fold change) і статистично значимі результати.

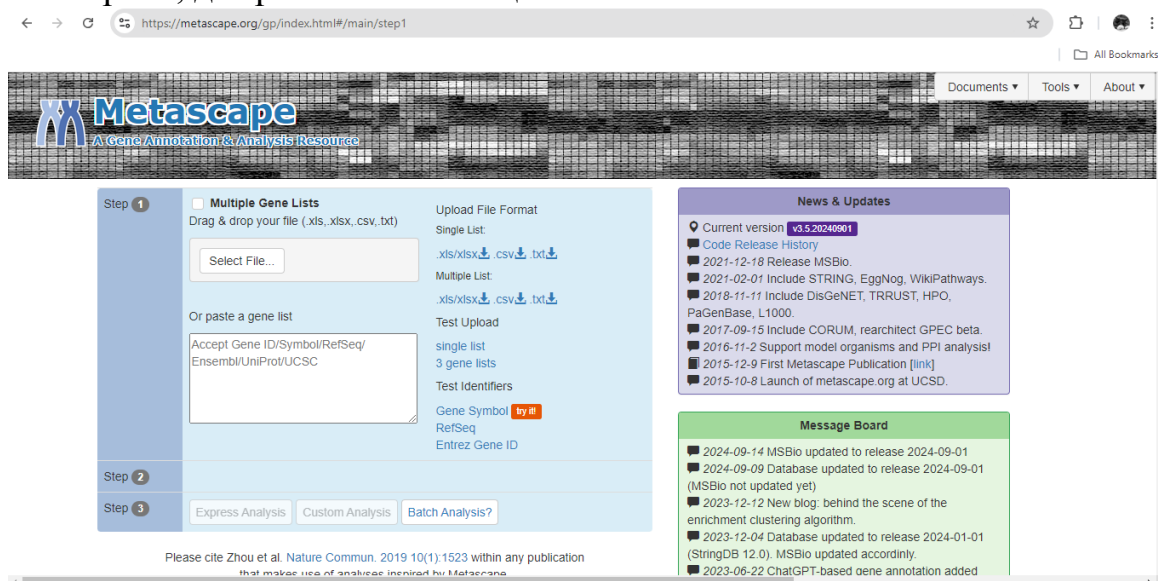
- **Enrichr** (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>):

✓ для подальшого аналізу результатів можна використати Enrichr. Після отримання списку генів з GEO2R, завантажте їх до Enrichr для функціонального аналізу.

✓ інструмент надасть аналіз функцій і шляхів, що пов'язані з генами, експресія яких змінена у вашому дослідженні.

Завдання 3. Візуалізуйте дані.

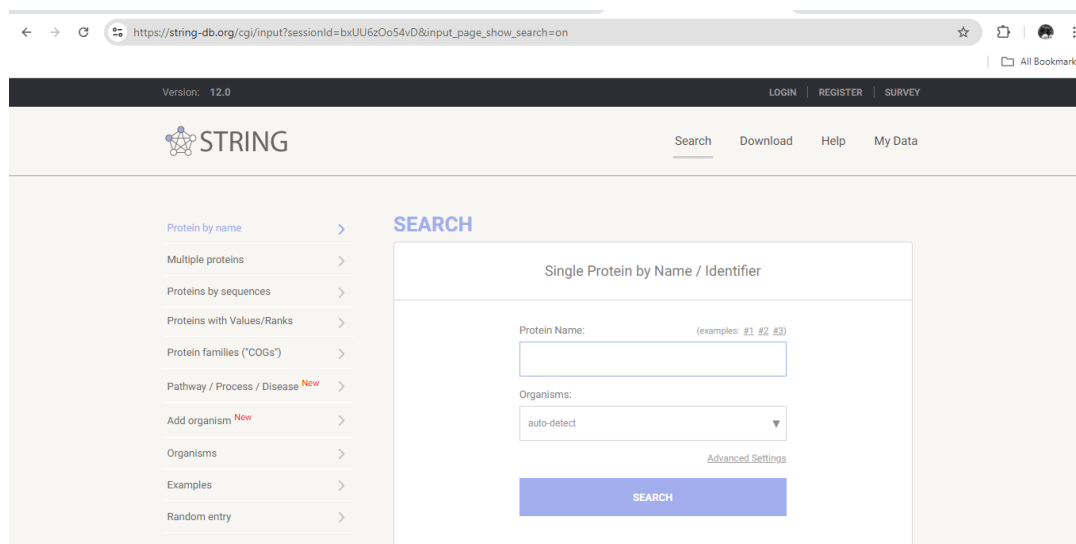
- Завантажте список диференційно експресованих генів у Metascape (<https://metascape.org/>) для створення візуалізацій, таких як теплові карти, графіки експресії, діаграми GO-анотацій.



- Використайте цей інструмент для створення кластерів генів, що змінюють експресію, та отримання детальної функціональної інформації.

Завдання 4. Проведіть функціональний аналіз.

- Після отримання диференційно експресованих генів використайте STRING (<https://string-db.org/>) для аналізу білково-білкових взаємодій серед цих генів.



✓ завантажте список генів у STRING і досліджуйте, чи є білки, які взаємодіють один з одним, що може вказувати на важливі біологічні шляхи, залучені у патологічний процес;

✓ інструмент надасть вам мережі білкових взаємодій з візуалізаціями, що допоможуть оцінити, як змінені білки взаємодіють між собою.

Завдання 5. Інтерпретуйте результати.

- Оцініть, чи є білки-регулятори РНК, взаємодія яких з РНК суттєво змінюється за патологічних умов.

- Проаналізуйте, які біологічні процеси або шляхи порушені в результаті змін у взаємодіях білок-РНК, що можуть свідчити про розвиток патологій, таких як онкологічні захворювання або нейродегенеративні процеси.

Контрольні питання

1. Що таке RIP і для чого вона використовується?
2. Який принцип лежить в основі методу RIP?
3. Які основні етапи проведення RIP?
4. Які типи РНК можна досліджувати за допомогою методу RIP?
5. Які методи використовують для аналізу РНК після імунопреципітації?
6. Як RT-qPCR застосовується для кількісного аналізу РНК після RIP?
7. У чому полягає метод RIP-seq і для чого він використовується?
8. Які переваги і обмеження має метод RIP?
9. Чому якість антитіл є критично важливою для проведення RIP?
10. Що таке eRIP і чим він відрізняється від класичного RIP?
11. Які можливості дає RIP для дослідження регуляції експресії генів і стабільності РНК?
12. У яких захворюваннях може бути корисним застосування методу RIP?
13. Як RIP порівнюється з іншими методами дослідження взаємодій РНК-білок, такими як CLIP або HITS-CLIP?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №14. Аналіз структури ДНК-зв'язуючих білків за допомогою Protein Data Bank (PDB)

Мета: ознайомитися з методами аналізу тривимірної структури ДНК-зв'язуючих білків за допомогою Protein Data Bank (PDB), вивчити основні інструменти для пошуку, перегляду та аналізу структур білків, які взаємодіють з ДНК, і провести функціональний аналіз їхньої взаємодії з ДНК. Дослідити конкретні приклади білок-ДНК комплексів та оцінити їхню біологічну роль.

Теоретичні відомості

Основні різновиди ДНК-зв'язуючих білків. ДНК-зв'язуючі білки виконують важливі функції у клітинних процесах, пов'язаних з реплікацією, репарацією, транскрипцією та регуляцією генів. До основних типів ДНК-зв'язуючих білків належать:

- **Гістони:** білки, що формують нуклеосоми – основну одиницю упаковки ДНК в ядрах еукаріот. Взаємодіють з ДНК неспецифічно, забезпечуючи її компактизацію.

- **Транскрипційні фактори:** регуляторні білки, що специфічно зв'язуються з регуляторними ділянками ДНК для активації або репресії транскрипції.

- **Полімерази:** ферменти, що синтезують нові ланцюги ДНК або РНК на матриці ДНК під час реплікації або транскрипції.

- **Нуклеази:** ферменти, що розщеплюють ДНК, беруть участь у репарації пошкоджень та деградації чужорідної ДНК.

Специфічні і неспецифічні ДНК-білкові взаємодії.

- **Неспецифічні взаємодії:** білки, такі як гістони або деякі репараційні ферменти, зв'язуються з ДНК незалежно від послідовності, забезпечуючи загальну стабілізацію або упаковку ДНК.

- **Специфічні взаємодії:** транскрипційні фактори та інші регуляторні білки розпізнають конкретні послідовності ДНК, забезпечуючи регуляцію генів.

Структурні мотиви в білках, що взаємодіють з ДНК.

- **Цинковий палець (англ. zinc finger):** невеликий структурний мотив, що містить атом цинку, який стабілізує структуру для зв'язування з ДНК.

- **«Спіраль-петля-спіраль» (англ. helix-turn-helix):** поширений мотив у транскрипційних факторах, де одна спіраль зв'язується з основною борозною ДНК.

- **«Лейцинова застібка» (англ. leucine zipper):** мотив, що включає два альфа-спіральні домени, які формують димер, взаємодіючи з ДНК специфічно.

Експериментальні та теоретичні методи визначення структури білків.

• Експериментальні методи:

- ✓ **Рентгеноструктурний аналіз:** дозволяє отримати тривимірну структуру білка з високою роздільною здатністю.

- ✓ **ЯМР (ядерний магнітний резонанс):** використовується для вивчення структур малих білків у розчині.

- ✓ **Кріоелектронна мікроскопія:** ефективний метод для вивчення великих білкових комплексів.

• Теоретичні методи:

- ✓ **Молекулярний докінг:** дозволяє передбачати взаємодії білків і ДНК на основі відомих структур.

- ✓ **Гомологічне моделювання:** використовується для передбачення структури білків на основі відомих подібних структур.

Значення структурного аналізу білків для біотехнологій та медицини.

Структурний аналіз білків є важливим для розуміння механізмів роботи білків та їх взаємодії з ДНК, що є критичним для розробки нових терапевтичних стратегій, таких як генна терапія, дизайн ліків, лікування раку та генетичних захворювань.

PDB як ресурс для аналізу структури білків. Protein Data Bank (PDB) – це всесвітня база даних, що містить тривимірні структури білків та інших біологічних макромолекул. PDB є незамінним інструментом для

біоінформатиків і дослідників, оскільки надає доступ до великої кількості структур білків, що взаємодіють з ДНК, і можливостей для їхнього аналізу.

Практична частина

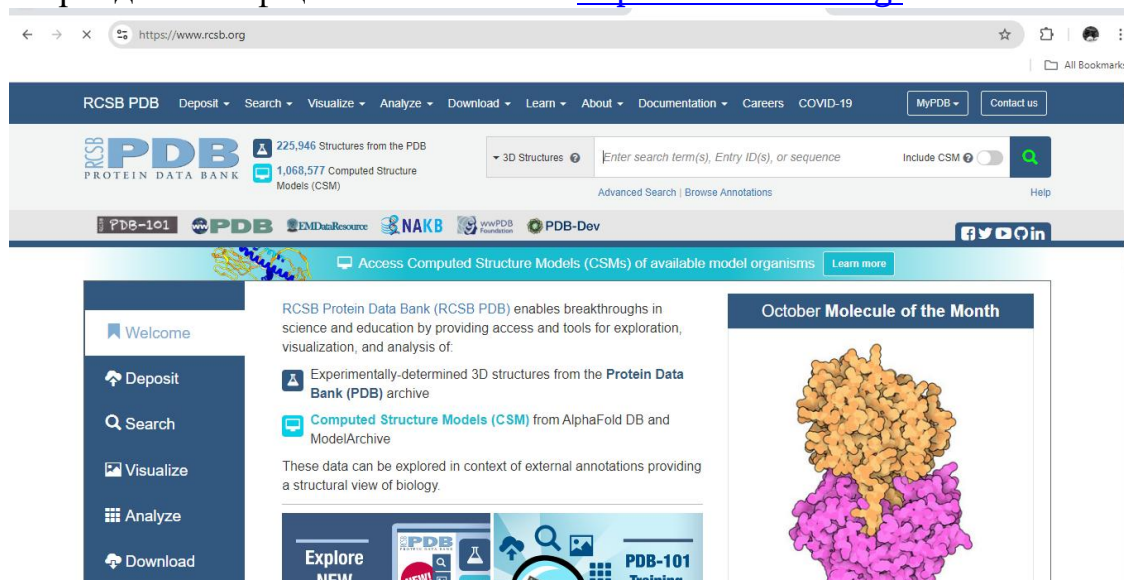
Матеріали: доступ до PDB, ідентифікатори структур (PDB ID) для білка p53 (1TUP) та нуклеази EcoRI (1ERI), навчальні або допоміжні матеріали для глибшого розуміння теоретичних аспектів (наприклад, статті або підручники з біохімії та молекулярної біології), програми для обробки зображень, наприклад, Photoshop або GIMP, для створення і редагування зображень або анімацій структури білків, текстовий редактор, наприклад, Microsoft Word або Google Docs, для оформлення звіту та результатів аналізу.

Обладнання: комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернет, Програмне забезпечення для візуалізації білків: JSmol або Mol Viewer (інтегровані у сайт PDB), PyMOL для детальної візуалізації та анімації білкових структур, Chimera як альтернатива PyMOL для детального аналізу та моделювання тривимірних структур.

Хід роботи

Завдання 1. Пошук структури ДНК-зв'язуючого білка у PDB.

- Перейдіть на офіційний сайт PDB: <https://www.rcsb.org/>.



- У рядку пошуку введіть назву або ID цікавого білка. Наприклад, для аналізу транскрипційного фактора p53 введіть “p53” або оберіть конкретну структуру білка, наприклад, ID: 1TUP.

- Серед отриманих результатів оберіть структуру, яка містить білок у комплексі з ДНК. Натисніть на вибрану структуру для перегляду деталей.

Завдання 2. Огляд інформації про білок.

- На сторінці структури ви отримаєте інформацію про білок, його функцію, взаємодії з іншими молекулами, метод визначення структури (наприклад, рентгенівська кристалографія).

- Зверніть увагу на наступні елементи:
 - ✓ класифікація білка (наприклад, транскрипційний фактор, нуклеаза),
 - ✓ методи отримання структури (рентгенівська кристалографія, ЯМР, криоелектронна мікроскопія),

- ✓ розмірність та точність структури (роздільна здатність).

Завдання 3. Візуалізуйте тривимірну структуру білка.

- Для перегляду тривимірної структури білка скористайтесь інтегрованими інструментами для візуалізації (наприклад, *JSmol* або *Mol Viewer*).

- Розгляньте взаємодії білка з ДНК: знайдіть ДНК-зв'язуючий домен, визначте, як білок зв'язується з молекулою ДНК, а також специфічні амінокислоти, що беруть участь у цій взаємодії.

- Під час візуалізації можна обертати структуру, змінювати масштаб, виділяти окремі частини молекули (білки, ДНК, ліганди тощо) для детального аналізу.

- Досліджуйте різні типи зв'язків: водневі зв'язки, іонні взаємодії, гідрофобні ефекти між білком і ДНК.

Завдання 4. Дослідіть важливі структурні мотиви.

- Ідентифікуйте структурні мотиви, що беруть участь у взаємодії білка з ДНК, наприклад:

- ✓ **цинковий палець**: невеликий стабілізаційний мотив, що використовує іон цинку для підтримки структури,

- ✓ **спіраль-петля-спіраль**: взаємодіє з великою борозною ДНК,

- ✓ **лейцинова застібка**: характерний для білків, що утворюють димери та зв'язуються з ДНК.

- У конкретному прикладі з білком р53, зверніть увагу на ділянки, що контактують з ДНК, і вивчіть, які амінокислоти беруть участь у специфічній взаємодії.

Завдання 5. Проаналізуйте взаємодію білка з ДНК.

- Використовуючи інструменти візуалізації, проаналізуйте, як білок зв'язується з ДНК:

- ✓ визначте, які амінокислоти безпосередньо контактують з основами або фосфатним остовом ДНК,

- ✓ визначте тип взаємодії (специфічна чи неспецифічна), а також ключові зони, що відповідають за регуляцію транскрипції або інших функцій.

- Наприклад, у випадку білка р53 вивчіть, як він зв'язується з певною послідовністю ДНК, що відповідає за регуляцію експресії генів, що пригнічують ріст пухлин.

Завдання 6. Проведіть функціональний аналіз білок-ДНК комплексів.

- Для практичного аналізу оберіть інший приклад білок-ДНК комплексу, наприклад, структуру нуклеази *EcoRI* у комплексі з ДНК (PDB ID: 1ERI).

- Вивчіть, як рестрикційний фермент зв'язується з ДНК і розпізнає специфічні нуклеотидні послідовності для здійснення розрізу. Знайдіть амінокислоти, відповідальні за каталіз та розщеплення ДНК.

- Оцініть роль цього білка в біотехнологічних методах, таких як генноінженерні маніпуляції.

Завдання 7. Візуалізуйте результати.

- Використайте програми *RyMOL* або *Chimera* для створення тривимірних моделей взаємодії білка з ДНК.

- Виділіть ключові амінокислоти, що беруть участь у специфічних взаємодіях, та створіть зображення для звіту, яке наочно демонструє білок-ДНК взаємодію.

- Можна також створити анімацію або покрокову демонстрацію механізму зв'язування білка з ДНК.

Завдання 8. Оцініть біологічне значення.

- Виходячи з аналізу структури білка, зробіть висновки щодо його біологічної функції. Наприклад, для білка р53 оцініть його роль у контролі клітинного циклу та апоптозі шляхом зв'язування з ДНК.

- Для нуклеази *EcoRI* розгляньте, як її здатність розпізнавати специфічні послідовності ДНК використовується в лабораторних техніках генної інженерії, таких як створення рекомбінантних ДНК.

Контрольні питання

1. Які основні функції виконують ДНК-зв'язуючі білки в клітинних процесах?

2. Що таке гістони і яку роль вони відіграють у структурі ДНК?

3. Як транскрипційні фактори взаємодіють з ДНК і яке їхнє значення в регуляції генів?

4. Яку роль полімераз у процесах реплікації і транскрипції?

5. Що таке нуклеази, і які функції вони виконують під час репарації та деградації ДНК?

6. У чому різниця між специфічними та неспецифічними ДНК-білковими взаємодіями?

7. Які білки беруть участь у неспецифічних взаємодіях з ДНК?

8. Як транскрипційні фактори розпізнають специфічні послідовності ДНК?

9. Що таке цинковий палець і яку роль він відіграє у взаємодії білків з ДНК?

10. Опишіть структурний мотив «спіраль-петля-спіраль» і його роль у зв'язуванні білків з ДНК.

11. Як працює лейцинова застібка і в яких білках вона зустрічається?

12. Які експериментальні методи використовуються для визначення тривимірної структури ДНК-зв'язуючих білків?

13. Як рентгеноструктурний аналіз допомагає визначити структуру білків?

14. Які переваги кріоелектронної мікроскопії у дослідженні білкових комплексів?

15. Які теоретичні методи використовуються для передбачення взаємодії білків і ДНК?

16. Як структурний аналіз білків може сприяти розробці нових терапевтичних методів?

17. Які можливості надає база даних PDB для аналізу структури білків?

18. Чому структурний аналіз білків важливий для біотехнологій і медицини?

19. Яку інформацію можна отримати з база даних PDB для дослідження ДНК-зв'язуючих білків?

ЧАСТИНА 5. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ МОДИФІКАЦІЙ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ

Методи дослідження модифікацій нуклеїнових кислот є важливим інструментом для розуміння епігенетичних механізмів регуляції геному. Модифікації ДНК і РНК, такі як метилювання, ацетилювання та інші хімічні зміни, впливають на експресію генів, стабільність генетичного матеріалу та клітинну диференціацію. Дослідження цих модифікацій дозволяє виявити нові шляхи контролю генетичної активності, що має велике значення для біології розвитку, онкології, нейронаук та інших сфер медицини. Зокрема, такий метод як бісульфітне секвенування забезпечують глибоке вивчення цих процесів на молекулярному рівні.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №15. Бісульфатне секвенування

Мета: ознайомитися з біоінформатичними інструментами для аналізу метилювання ДНК за допомогою даних бісульфітного секвенування та навчитися базовим етапам аналізу метильованих сайтів у геномі; провести аналіз метилювання ДНК на прикладі набору даних бісульфітного секвенування для вивчення змін у метилюванні промоторних областей генів у ракових та нормальних клітинах.

Теоретичні відомості

Метилювання ДНК – це важливий епігенетичний механізм, що регулює експресію генів і бере участь у контролі багатьох біологічних процесів, таких як диференціація клітин, розвиток організму, підтримання геномної стабільності та захист від вірусних інфекцій. Найчастіше метилювання відбувається на цитозині в контексті CpG ділянок, що може призводити до репресії генів. Порушення патернів метилювання ДНК пов'язане з багатьма захворюваннями, включаючи рак, нейродегенеративні хвороби, а також аутоімунні і серцево-судинні патології. У біотехнологіях аналіз метилювання ДНК дозволяє вивчати механізми регуляції генів та створювати нові терапевтичні підходи, наприклад, для ранньої діагностики і прогнозування захворювань.

В медицині цей аналіз відіграє ключову роль у виявленні епігенетичних маркерів для діагностики хвороб, таких як рак, оскільки зміни метилювання часто є ранніми ознаками патологічних процесів. Метилювання також може впливати на відповідь на терапію, тому вивчення цього процесу важливе для персоналізованої медицини.

Бісульфітне секвенування (англ. *bisulfite sequencing*) – це основний метод для аналізу метилювання ДНК. Він заснований на хімічній обробці ДНК бісульфітом натрію, який перетворює неметильовані цитозини на урацил, залишаючи метильовані цитозини незміненими. Після цього ДНК піддається секвенуванню, і порівняння секвенованих послідовностей із референсним

геномом дозволяє ідентифікувати метильовані сайти. Завдяки цьому методу можна аналізувати патерни метилювання на рівні окремих нуклеотидів у всьому геномі або в конкретних ділянках, таких як промотори генів або CpG-острівці.

Бісульфітне секвенування включає кілька підходів:

- *Цільове бісульфітне секвенування*: фокусується на специфічних генах або регуляторних ділянках.
- *Глобальне бісульфітне секвенування* (англ. Whole Genome Bisulfite Sequencing, WGBS): дозволяє аналізувати метилювання в усьому геномі.
- *Reduced Representation Bisulfite Sequencing* (RRBS): фокусується на певних регіонах геному з високою густиною CpG.

Цей метод є дуже точним і чутливим, дозволяючи досліджувати динаміку метилювання під впливом різних умов і змін у клітинах.

Бісульфітне секвенування є важливим інструментом для вивчення епігенетичних змін, які виникають у відповідь на зовнішні чинники, такі як стрес, харчування, токсичні речовини та інфекції. Воно дозволяє дослідникам визначати, як ці фактори впливають на метилювання генів і їх подальшу експресію. Наприклад, вивчення метилювання ДНК у клітинах, що зазнають стресу або впливу токсичних речовин, допомагає зрозуміти, як зміни в епігеномі сприяють розвитку хвороб.

Цей метод також активно використовується для дослідження епігенетичних змін під час диференціації клітин. Метилювання ДНК є ключовим механізмом, що контролює включення та вимкнення генів під час перетворення стовбурових клітин у спеціалізовані клітини, такі як нейрони або кардіоміоцити. Аналіз патернів метилювання під час диференціації допомагає краще зрозуміти механізми клітинної специфічності та пластичності.

Індивідуальний розвиток організму також тісно пов'язаний із динамікою метилювання. Бісульфітне секвенування дозволяє вивчати зміни у метилюванні ДНК під час ембріонального розвитку та старіння. Наприклад, з віком метильованість ДНК може змінюватися, що призводить до дисфункцій у регуляції генів і появи вікових захворювань.

Таким чином, бісульфітне секвенування є важливим інструментом для вивчення епігенетичних змін, що допомагає краще зрозуміти регуляторні процеси в клітинах та розробити нові стратегії лікування різних захворювань.

Практична частина

Матеріали: набір даних бісульфітного секвенування для нормальних та ракових клітин (завантажується з публічних баз даних, таких як NCBI GEO або ENCODE); референсний геном людини (hg38) для вирівнювання ридів із метою точного визначення метильованих сайтів у геномі; файли анотацій генів (GTF або BED-файли) для ідентифікації регуляторних елементів і промоторних областей; програмні засоби для контролю якості даних: FastQC для перевірки якості ридів секвенування; програмні засоби для тримінгу: Trim Galore! для видалення низькоякісних ридів і адаптерних послідовностей; програмні засоби для вирівнювання ридів: Bismark для вирівнювання ридів бісульфітного секвенування та ідентифікації метильованих сайтів;

інструменти для візуалізації даних: IGV (Integrative Genomics Viewer) для перегляду результатів вирівнювання та візуалізації метильованих і неметильованих сайтів; R або Python з відповідними бібліотеками для обробки даних і побудови теплових карт або інших графічних візуалізацій.

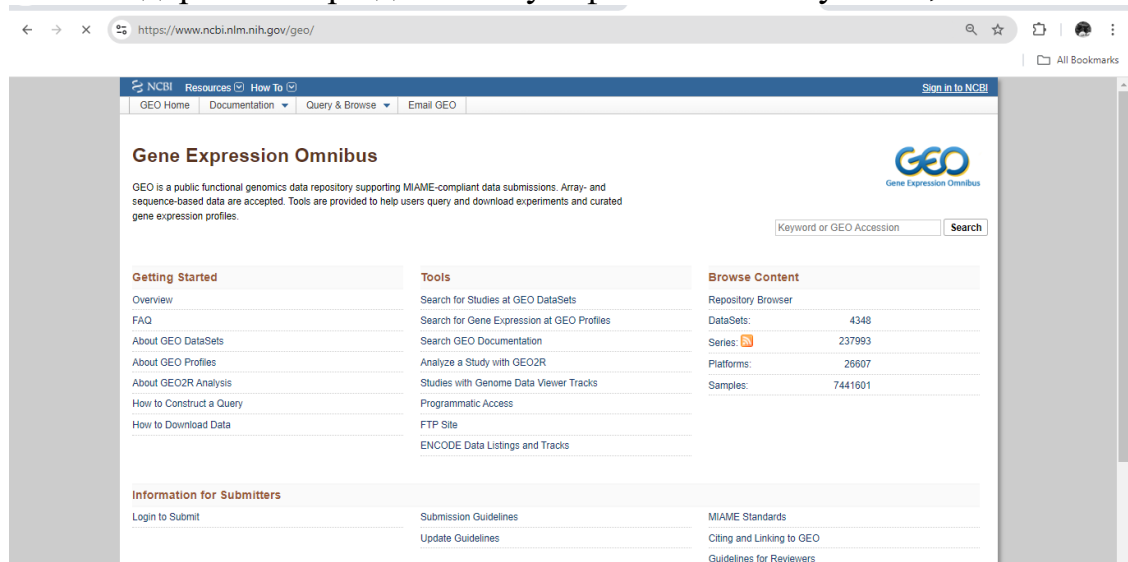
Обладнання: комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернет; програмне забезпечення для обробки та аналізу даних секвенування: FastQC для перевірки якості сирих ридів, Bismark для вирівнювання ридів і аналізу метилювання, R/Bioconductor або Python для подальшої обробки та статистичного аналізу даних, IGV для візуалізації геномних даних і перегляду метильованих сайтів; онлайн-інструменти для функціонального аналізу генів: Enrichr або DAVID для аналізу функціональної значимості генів із зміненою метильованістю.

Хід роботи

Завдання 1. Отримайте дані бісульфитного секвенування.

- Завантаження даних:

✓ перейдіть на вебсайт NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), щоб отримати відкриті набори даних бісульфитного секвенування,



✓ наприклад, використайте набір даних із дослідження метилювання ДНК у нормальних клітинах епітелію легенів та ракових клітинах легенів (GEO Accession: GSE123456),

✓ завантажте файли FASTQ, що містять сирі дані секвенування.

Завдання 2. Контроль якості даних.

- Аналіз якості даних за допомогою FastQC:

✓ використайте **FastQC** для перевірки якості сирих ридів,
✓ проаналізуйте такі параметри, як якість баз по ридях, наявність адаптерних послідовностей, розподіл GC-вмісту,
✓ переконайтеся, що дані відповідають необхідним стандартам для подальшого аналізу.

- Фільтрація низькоякісних ридів:

✓ видаліть низькоякісні риди та адаптерні послідовності за допомогою інструмента Trim Galore! або іншого підходящого інструмента для тримінгу.

Завдання 3. Вирівнювання ридів на референсний геном.

- Вирівнювання ридів за допомогою Bismark:
 - ✓ завантажте референсний геном людини (hg38) з публічних баз даних,
 - ✓ використайте програмне забезпечення Bismark для вирівнювання ридів бісульфітного секвенування на референсний геном,
 - ✓ запустіть Bismark з такими параметрами: вирівнювання ридів і розпізнавання метильованих та неметильованих цитозинів.
- Оцінка якості вирівнювання:
 - ✓ перевірте, який відсоток ридів було вирівняно до референсного геному, і переконайтеся, що кількість вирівняних ридів є достатньою для подальшого аналізу.

Завдання 4. Виявіть метильовані сайти.

- Аналіз метильованих сайтів:
 - ✓ використайте Bismark для аналізу рівня метилювання цитозинів у контексті CpG острівців,
 - ✓ отримайте таблицю із значеннями відсоткового метилювання для кожного CpG сайту у нормальних та ракових клітинах.
- Ідентифікація метильованих сайтів у регуляторних областях:
 - ✓ фокусуйтеся на аналізі промоторних ділянок генів, які регулюють експресію важливих генів у легеневиких клітинах,
 - ✓ ідентифікуйте, які гени мають значні зміни в метилюванні промоторів у ракових клітинах порівняно з нормальними.

Завдання 5. Візуалізуйте результати.

- Візуалізація результатів у IGV:
 - ✓ завантажте результати вирівнювання (BAM файли) у Integrative Genomics Viewer (IGV).
 - ✓ перегляньте розподіл метильованих і неметильованих CpG сайтів у промоторних ділянках генів, що цікавлять.
 - ✓ зверніть увагу на різницю в метилюванні між раковими та нормальними клітинами.
- Побудова теплових карт:
 - ✓ для візуалізації загального рівня метилювання в різних зразках використайте R з пакетом pheatmap для побудови теплових карт.
 - ✓ створіть теплові карти для порівняння рівнів метилювання у нормальних та ракових клітинах.

Завдання 6. Проведіть порівняльний аналіз.

- Порівняння рівня метилювання:
 - ✓ використайте R/Bioconductor з пакетом bsseq для порівняльного аналізу рівнів метилювання між нормальними та раковими зразками.
 - ✓ визначте гени, у промоторних ділянках яких спостерігається гіперметилювання або гіпометилювання у ракових клітинах.
- Функціональний аналіз метильованих генів:
 - ✓ використайте інструменти, такі як Enrichr або DAVID, для аналізу функцій та шляхів, пов'язаних із метильованими генами.

✓ визначте, які біологічні процеси або шляхи можуть бути порушені внаслідок змін у метилюванні.

Завдання 7. Інтерпретуйте результати.

- Аналіз отриманих результатів:
 - ✓ проаналізуйте, які зміни у метилюванні могли призвести до змін експресії генів у ракових клітинах порівняно з нормальними.
 - ✓ оцініть можливий вплив цих змін на розвиток та прогресування ракових захворювань.
- Зробіть висновки:
 - ✓ визначте ключові гени, у яких зміни метилювання промоторів корелюють зі змінами їхньої експресії у ракових клітинах.
 - ✓ обговоріть значення отриманих результатів для розуміння механізмів епігенетичної регуляції в патологічних процесах.

Контрольні питання

1. Що таке метилювання ДНК, і яку роль воно відіграє у регуляції експресії генів?
2. Як метилювання цитозину в CpG-острівцях впливає на транскрипційну активність генів?
3. Які біологічні процеси контролюються метилюванням ДНК?
4. Як порушення патернів метилювання ДНК пов'язані з виникненням захворювань, таких як рак?
5. Чому метилювання ДНК є важливим для підтримання геномної стабільності?
6. Як бісульфітне секвенування використовується для вивчення метилювання ДНК?
7. Які етапи включає бісульфітне секвенування, і як відбувається хімічне перетворення цитозину?
8. Чим відрізняється цільове бісульфітне секвенування від глобального (WGBS)?
9. Які переваги має Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)?
10. Як бісульфітне секвенування допомагає вивчати епігенетичні зміни під впливом зовнішніх факторів?
11. Яким чином метилювання ДНК впливає на диференціацію стовбурових клітин?
12. Як зміни у метилюванні ДНК відбуваються протягом індивідуального розвитку та старіння організму?
13. Яке значення аналізу метилювання ДНК у персоналізованій медицині та діагностиці захворювань?
14. Які епігенетичні маркери можуть бути виявлені за допомогою аналізу метилювання ДНК?

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Базалій В. В. Спеціальна генетика. Херсон: Олді-Плюс, 2019. 360 с.
- Гиль М. І., Сметана О. Ю., Юлевич О. І., Нежлукченко Т. І. Молекулярна генетика та технології дослідження генома / за ред. М. І. Гиль. Херсон: Олді-Плюс, 2015. 320 с.
- Гриб С. Ф., Андреева О. Ю. Збірник задач і вправ з генетики та селекції: розв'язки, відповіді, пояснення : навч.-метод. посіб. – Житомир: Полісся, 2014. – 415 с.
- Маруненко І. М., Тимчик О. В., Неведомська Є. О. Основи генетики людини: навчальний посібник для студ. вищ. пед. навч. закл. Київ: КМПУ, 2013. 230 с.
- Помогайбо В. М., Петрушенко А. В. Генетика людини: навч. посіб. – Київ: Академія, 2014. 278 с.
- Сиволоб А. В., Рушковський С. Р., Кир'яченко С. С. та ін. Генетика: підручник. Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. 320 с.
- Трофименко О. Л., Гиль М. І., Сметана О. Ю. Генетика популяцій: підручник / за ред. М. І. Гиль; МНАУ. – Миколаїв: Видавничий дім «Гельветика», 2018. 254 с.
- Alberts B., Heald R., Johnson A., et al. Molecular Biology of the Cell. 7th ed. New York: W. W. Norton & Company, 2022. 1464 p.
- Armstrong L. Epigenetics. 1st ed. New York: Garland Science, 2014. 300 p.
- Griffiths A. J. F., Doebley J. F., Peichel C. L., Wassarman D. A. Introduction to Genetic Analysis. 12th ed. New York, NY: Macmillan Learning, 2020. 796 p.
- Hartl D. L. Essential Genetics and Genomics. 7th ed. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning, 2020. 632 p.
- Hancock J. T. Cell Signalling. Oxford: Oxford University Press, 2021. 166 p.
- Klug W. S., Cummings M. R., Spencer C. A., Palladino M. A., Killian D. Essentials of Genetics. 10th ed. New York: Pearson, 2020. 611 p.
- Krupak V., Malysheva K., Pavlenko O., Shafranska G., de Rooij K., Löwik C., Stoika R., Korchynskyi O. G. The PTTG1 is a novel inhibitor of osteogenic differentiation of mouse mesenchymal stem cells. Animal Biology. 2016. Vol. 18, no. 1. P. 61–68.
- Kwaśniak K., Czarnik-Kwaśniak J., Malysheva K., Pogoda K., Korchynskyi O., Rybojad P., Karczmarek-Borowska B., Tabarkiewicz J. LncCDH5-3:3 Regulates Apoptosis, Proliferation, and Aggressiveness in Human Lung Cancer Cells. Cells. 2022. Vol. 11, no. 3. P. 378.
- Madison P. Cell Signaling. New York: States Academic Press, 2022. 320 p.
- Malysheva K., de Rooij M., Lowik C., Baeten D., Rose-John S., Stoika R., Korchynskyi O. Interleukin 6/Wnt signaling interaction in rheumatoid arthritis: interleukin 6 inhibits Wnt signaling in synovial fibroblasts and osteoblasts. Croatian Medical Journal. 2016. –Vol. 57, no. 2. P. 89–98.
- Paro R., Grossniklaus U., Santoro, R. Wutz, A. Introduction to Epigenetics. New York: Springer, 2021. 215 p.

Passarge E., Wirth J. Color Atlas of Genetics. 5th ed., revised and updated. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag KG, 2017. 474 p.

Pierce B. A. Genetics Essentials: Concepts and Connections. 5th ed. Austin: Macmillan Learning, 2021. 400 p.

Sambrook J., Russell D. W., Cold Spring Harbor Laboratory. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

Strachan T., Read A. P. Human Molecular Genetics. 5th ed. New York: CRC Press, 2019. 784 p.

ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ

Львівська національна наукова бібліотека України імені В. Стефаника.
URL: <https://www.lsl.lviv.ua/index.php/uk/golovna2/>

Львівська обласна універсальна наукова бібліотека.
URL: <http://www.lounb.org.ua/>

Національна бібліотека України ім. В. І. Вернадського.
URL: <http://www.nbuv.gov.ua/>

Genetic Science Learning Center.
URL: <https://learn.genetics.utah.edu/content/basics/>

The National Center for Biotechnology Information.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

WorldCat. The world's largest library catalog. URL: <https://www.worldcat.org/>
Wiley. Online Library. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/>

GenomeWeb – Genetics, Genomics & Molecular Diagnostics News.
URL: <https://www.genomeweb.com/>

GEN News. URL: <https://www.genengnews.com/>

Genetics. URL: <https://learn.genetics.utah.edu/>

Genes. URL: <http://www.genomenewsnetwork.org/>

Structural Genomics Knowledgebase. URL: <https://psi-structuralgenomics.org/>
BioInteractive. URL: <https://www.biointeractive.org/>

Biozone. URL: <https://www.biozone.co.nz/>

Khan Academy. URL: <https://www.khanacademy.org/>

Coursera. URL: <https://www.coursera.org/>

CSHL DNA Learning Center. URL: <https://dnlc.cshl.edu/about/index.html>

MIT Genetics Course. URL: <https://ocw.mit.edu/courses/7-03-genetics-fall-2004/>

Moodle. Загальна та молекулярна генетика. URL: <http://moodle.lvet.edu.ua/moodle/course/view.php?id=3126>